Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ) *Original Article*
2014; 17(83): 73-81

Bioinformatic evaluation of the miR-124 effect on transcription factors involved in neorogenesis process

Mondanizadeh M[1], Mosayebi G[2], Arefian E[3], Saidijam M[1]*, Khansarinejad B[4]

1. Department of Molecular Medicine and Genetics, Molecular Medicine Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
2. Department of Microbiology and Immunology, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
3. Department of Biology and Microbiology, Tehran University, Tehran, Iran
3. Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

Received: 21 Jan 2014 ,Accepted: 5 March 2014

Abstract

Background: Although miR-124 molecule has been known as an inducer of neurogenesis, few researches have been done on the targets of this molecule and its functional mechanisms in differentiation toward neurons and maintaining neuronal state. The microarray technique has been established as the reference method for studying the genes under the control of miRNAs. However, the high cost of this method has hampered its use in most research centers. On the other hand, the improvement of bioinformatical algorithms and computer modeling systems has led to the development of the bioinformatical softwares that can predict mRNA targets for miRNAs. Therefore, the aim of this theoretical study was to bioinformatically evaluate the effect of miR-124 on transcription factors that can be involved in neurogenesis and neuronal cell amplification, by using various specific softwares.

Methods: Using different algorithms in TargetScan, DIANA and miRWalk databases, the potential transcription factors targets of miR-124 were identified. Then, a score table was prepared from the candidate genes, based on the affinity of the seed region of miR-124 and the number of targets in the 3`-UTR region of transcription factors. Finally, transcription factors with higher scores were chosen as candidates for practical analysis.

Results: The results of bioinformaical analysis showed that the LAMC1, ITGB1, PTBP1, SOX9, SP1, and EFNB1 molecules are the most potential factors that might be affected by miR-124 during neurogenesis.

Conclusion: It seems that transcription factor SP1 is under the control of the miR-124 and plays a crucial role in neurogenesis process. Therefore, this protein can be considered as a suitable new candidate for experimental evaluation.

Keywords: Bioinformatics, microRNA, Neurogenesis, Transcription factors, miR-124

*Corresponding author:
Address: Department of Molecular Medicine and Genetics, Molecular Medicine Research Center, Hamedan University of Medical Sciences, Hamedan, Iran
Email: sjam110@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال 17، شماره 2 (شماره پیاپی 83)، اردیبهشت 1393، 81-73

بررسی بیوانفورماتیک عملکرد miR-124 بر روی فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در فرایند تمایز نورونی

مهدیه موندنی‌زاده[1]، قاسم مسیبی[2]، احسان عارفیان[3]، مسعود سعیدی‌جم[*4]، بهزاد خوانساری‌نژاد[5]

1. دانشجوی PhD پزشکی ملکولی، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
2. استاد، گروه میکروب شناسی و ایمنی شناسی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران
3. استادیار، گروه زیست شناسی و میکروبیولوژی، دانشگاه تهران، تهران، ایران
4. دانشیار، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
5. استادیار، مرکز تحقیقات مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 92/11/1 تاریخ پذیرش: 92/12/14

چکیده

زمینه و هدف: اگرچه ملکول miR-124 به عنوان یک القاکننده نوروژنز شناخته شده است، با این حال بررسی‌های انجام شده بر روی اهداف آن بسیار اندک است و مکانیسم‌های عملکرد آن در تمایز به سمت سلول‌های عصبی و نگهداری سلول‌های عصبی در حالت تمایز یافته ناشناخته می‌باشد. روش میکرواری به عنوان روش استاندارد برای مطالعه کلی ژن‌های تحت کنترل miRNAها مطرح است. با این حال هزینه بسیار زیاد این روش استفاده از آن را در اغلب مراکز علمی با محدودیت مواجه است. از سوی دیگر پیشرفت الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی و سیستم‌های مدل‌سازی کامپیوتری منجر به توسعه نرم افزارهای بیوانفورماتیکی شده‌اند که توانایی پیش‌بینی اهداف mRNA برای mi-RNAها را دارند. از این‌رو هدف این پژوهش تئوری بررسی بیوانفورماتیک اثر miR-124 بر روی فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در فرآیند تکثیر سلولی و تمایز به سمت سلول‌های نورونی، با استفاده از نرم افزارهای مختلف و اختصاصی می‌باشد.

روش‌ها: با استفاده از الگوریتم‌های مختلف موجود در پایگاه‌های تارگت اسکن، دایانا و میرواک، فاکتورهای نسخه‌برداری که هدف بالقوه عملکرد miR-124 بودند، مشخص شدند. سپس از ژن‌های کاندید شده براساس متغیرهایی هم‌چون قدرت اتصال ناحیه هسته miR-124 و تعداد تکرار ناحیه هدف در قسمت UTR-3´ فاکتور رونویسی یک جدول امتیاز تهیه شد. در نهایت فاکتور رونویسی دارای بالاترین امتیاز به عنوان کاندید بررسی‌های عملی انتخاب گشت.

یافته‌ها: نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که ملکول‌های LAMC1، ITGB1، PTBP1، SOX9، SP1 و EFNB1 با بیش‌ترین احتمال ممکن است در مسیر نورون‌زایی تحت اثر miR-124 قرار گیرند.

نتیجه‌گیری: به نظر می‌رسد که فاکتور نسخه برداری SP1 تحت کنترل miR-124 می‌باشد و نقش مهمی در فرآیند نوروژنز ایفا می‌کند. از این رو این پروتئین می‌تواند به عنوان کاندید جدید مناسبی جهت بررسی‌های تجربی در نظر گرفته شود.

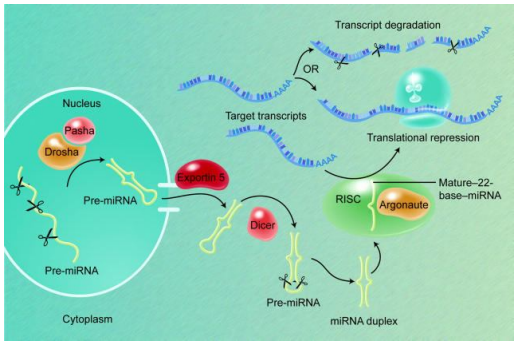
واژگان کلیدی: میکرو RNA، فاکتورهای نسخه برداری، نورون‌زایی، بیوانفورماتیک، miR-124

***نویسنده مسئول:** همدان، دانشگاه علوم پزشکی همدان، گروه پزشکی مولکولی و ژنتیک پزشکی و مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی
Email: sjam110@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

مقدمه

در سال‌های اخیر شبکه جدیدی از چرخه‌های تنظیمی در سطح mRNA مورد توجه قرار گرفته است که از میان آن‌ها می‌توان به یک کلاس از RNAهای غیرکدکننده به نام microRNAها اشاره نمود. در سال 1993 اولین microRNA بنام lin-4 کشف شد(1). طبق تعریف، miRNA به RNAهای کوچکی گفته می‌شود که از پیش‌سازی با ساختار ساقه-حلقه منشا گرفته‌اند و با هدف قرار دادن mRNAها و برش دادن یا با مهار بیان ژن‌های آن‌ها به صورت کلیدی در تنظیم بیان ژن‌ها دخالت می‌کنند(2). هفت نوکلئوتید از انتهای ´5 ملکول miRNA بالغ ناحیهٔ سید نامیده می‌شود و این ناحیه به انتهای غیر کدکننده ´3 (´3-UTR) از mRNA مکمل خود متصل می‌شود(3). بدین‌ترتیب miRNA ملکول mRNA هدف را شناسایی می‌کند. اگر miRNA به طور کامل به mRNA هدف متصل شود، موجب تجزیهٔ کامل mRNA می‌شود و در صورتی که اتصال به mRNA هدف ناقص باشد، miRNA از ترجمهٔ آن mRNA ممانعت به عمل می‌آورد(4). شکل 1 مسیر طبیعی بیوژنز miRNA را به طور کامل نشان می‌دهد(4).



شکل 1. مسیر بیوژنز طبیعی miRNA در سلول

انواع بسیار زیادی از miRNAها در سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن وجود دارد و نقش بسیار مهمی را در بسیاری از فرآیندهای بیولوژیک و تمایز سلول‌ها هم چون چرخه سلولی، آپوپتوزیس، تومورزایی و نورون‌زایی ایفا می‌کنند(5). هم‌چنین براساس پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک، تقریبا یک سوم ژن‌های کدکننده پروتئین در ژنوم انسان تحت تنظیمات توسط miRNAها قرار دارد(6). لازم به ذکر است مطالعات اخیر در چندین ارگانیسم مدل در سیستم عصبی حاکی از نقش حیاتی برای تعدادی از miRNAها در تکامل و عملکرد سیستم عصبی است. تحقیقات نشان می‌دهد miRNAها با توجه به عملکرد اختصاصی و اندازه کوچک خود به طور بالقوه برای درمان آسیب‌های نخاعی می‌توانند، به کار روند(7). اگرچه عملکرد دقیق miRNAها در طول ایجاد و پیشرفت آسیب‌های نخاعی نیاز به مطالعات عملکردی در آینده دارد ولی واقعیت تغییر در میزان بیان حجم وسیعی از miRNAها در طی آسیب‌های نخاعی، نشان از نقش مهم و معنادار miRNAها در پاسخ بدن به این اختلال دارد. از سوی دیگر با این وجود که miRNAها دارای پتانسیل عمده برای تبدیل شدن به نسل جدیدی از داروها می‌باشند، ولی هنوز مشکلات بالقوه‌ای هم چون اثرات جانبی وابسته به دوز بالا و سمیت(در زمانی که به صورت invivo استفاده می‌گردند) در مورد آن‌ها مطرح است(7). با این حال محققان بر این باورند که با توسعه سریع علم و فن‌آوری در آینده‌ای نزدیک مداخلات درمانی مبتنی بر miRNAها، به طور یقین به نفع بیماران مبتلا به آسیب‌های نخاعی است.

در این میان miR-124 به عنوان یک راه انداز نوروژنز شناخته شده است. در سال 2002 مشخص شد که miR-124 در حدود25 درصد تا 48 درصد از کل miRNAهای مغز موش را تشکیل می‌دهد(8). مطالعات بیشتر نشان داد که این miRNA در نماتودها تا پریمات‌ها اختصاصی نورون‌ها و بافت عصبی و القاکننده نوروژنز در زمان جنینی می‌باشد(9). به علاوه مشخص گردیده که القای بیان miR-124 در سلول‌های هلا منجر به تغییر ترانسکریپتوم این رده‌ی سلولی به سمت سلول‌های مغزی می‌شود(10). از طرفی ترانسفکشن سلول‌های بنیادی موش با miR-124 منجر به تمایز بیشتر به سمت سلول‌های عصبی می‌شود. اگرچه امروزه می‌دانیم miR-124 در فرآیند نوروژنز نقش به سزایی دارد، با این حال به نظر می‌رسد در

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

اکثریت موارد نقش خود را در همراهی با سایر فاکتورهای موثر، از جمله فاکتورهای رشد و miRNAهای دیگر انجام می‌دهد(10). شناخت مکانیسم ملکولی عملکرد miR-124 می‌تواند نقش بسیار در شناخت جزئیات فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های عصبی‌ای داشته باشد که در فرآیندهای درمانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. همه این یافته‌ها حاکی از اعمال تنظیمی miR-124 بر روی ژن‌های هدف مختلف برای تمایز عصبی است. بررسی‌های انجام شده بر روی اهداف عملکردی miR-124 بسیار اندک است، به طوری که توجیه‌کننده عملکرد این ملکول در تمایز به سمت سلول‌های عصبی و نگهداری سلول‌های عصبی در حالت تمایز یافته نمی‌باشد.

امروزه به کمک تکنیک‌هایی از جمله نورترن بلات، میکروارای(Microarray)، هیبریدیزاسیون در جا و Real-time PCR می‌توان به وجود mi-RNAها در بافت‌های خاص یا به ارتباط هر mi-RNA با بیماری‌هایی خاص پی‌برد(11). در میان تکنیک‌های نام برده شد، میکروارای توانایی ارائه پروفایل بیانی کامل در رابطه با هر mi-RNA را دارد. از این رو میکروارای به عنوان روش استاندارد برای مطالعه کلی ژن‌های تحت تأثیرات miRNAها به کار می‌رود(12). با این وجود به علت هزینه بسیار بالای دستگاه و اسلایدهای میکروارای و نیاز به تخصص اپراتور استفاده از آن در بسیاری از مراکز علمی به خصوص در کشورهای در حال توسعه امکان پذیر نیست. از سوی دیگر امروزه با توسعه و پیشرفت الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی و سیستم‌های مدل‌سازی کامپیوتری روش‌های بیوانفورماتیکی توسعه یافته‌اند که توانایی پیش‌بینی اهداف mRNAها برای mi-RNAها را دارند. بدین‌ترتیب استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی به منظور شناسایی اهداف miRNAها موجب سهولت و صرفه جویی در زمان و هزینه می‌گردند. چندین برنامه کامپیوتری با الگوریتم‌های متفاوت برای پیش‌بینی اهداف اتصالی mi-RNA وجود دارد. نقطه مشترک به کار گرفته شده در تمامی این نرم‌افزارها بر اساس مکمل بودن ناحیه سید در mi-RNA با mRNA هدف و محاسبه پایداری ترمودینامیکی اتصال بین mi-RNA و mRNA می‌باشد. با این وجود الگوریتم‌های محاسبه معیارهای مذکور در هر نرم‌افزار متفاوت و اختصاصی می‌باشد.

از این‌رو هدف این پژوهش بررسی بیوانفورماتیک اثر miR-124 بر روی فاکتورهای نسخه‌برداری دخیل در فرآیند تکثیر سلولی و تمایز به سمت سلول‌های نورونی، با استفاده از نرم افزارهای مختلف و اختصاصی، می‌باشد. در بررسی این اثر، تلاش شده است که ابتدا بر پایه‌ی داده‌های حاصل از مدلینگ، توسط الگوریتم‌های مختلف، فاکتورهای نسخه‌برداری‌ای که به طور بالقوه دارای بالاترین احتمال دخالت در این فرآیند می‌باشند شناسایی گردد. تا بتوان نقش محتمل‌ترین فاکتور نسخه‌برداری به طور عملی و توسط آزمایشات اختصاصی مختلف و متنوع شناسایی گردد.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر به صورت یک بررسی تئوری بیوانفورماتیک می‌باشد

اخذ توالی مربوط به miR-124

توالی نوکلوتیدی miR-124 از پایگاه اطلاعاتی میر بیس و NCBI با شماره‌های به ترتیب 344MI0000 و AC_000140 اخذ گردید.

آنالیز بیوانفورماتیک اهداف mRNAهای هدف miR-124

در طی این مرحله با استفاده از الگوریتم‌های متفاوت بیوانفورماتیک موجود در پایگاه‌های تارگت اسکن، دایانا و میرواک بررسی فاکتورهای نسخه‌برداری که هدف بالقوه عملکرد miR-124 بودند، صورت پذیرفت. سپس از ژن‌های کاندید شده یک جدول امتیاز تهیه شد. بدین‌صورت که براساس متغیرهایی هم‌چون قدرت اتصال ناحیه هسته مربوط به miR-124 و تعداد تکرار ناحیه هدف در قسمت 3`-UTR فاکتور رونویسی، به فاکتورهای رونویسی امتیاز

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

داده شد و در نهایت فاکتور رونویسی دارای بالاترین امتیاز به عنوان کاندید بررسی‌های عملی انتخاب گشت.

یافته‌ها

آنالیز miR-124 در پایگاه تارگت اسکن

نرم‌افزار تارگت اسکن (http://www.TargetScan) یکی از برنامه‌های مورد استفاده برای پیش‌بینی اهداف mi-RNAهای پستانداران می‌باشد. این نرم‌افزار نواحی هفت یا هشت نوکلئوتیدی که مکمل ناحیه هسته از mi-RNA است را شناسایی می‌کند و از نظر پایداری ترمودینامیکی(بررسی ساختارهای ثانویه و برهمکنش‌های بین مولکولی و درون مولکولی یک اسید نوکلئیک) نیز آن را بررسی می‌کند. در این سایت اهداف پیش‌بینی شده بر اساس فاکتوری به نام احتمال هدف‌گیری محافظت شده، رتبه‌بندی می‌شوند. در واقع این فاکتور حاکی از احتمال هدف‌گیری یک ناحیه محافظت شده توسط یک miRNA خاص می‌باشد. به عبارت دیگر P_{ct} نشان دهنده این مطلب است که miRNA به ناحیه هدف براساس شانس متصل نشده است و میزان این فاکتور بین 0 تا 1 می‌باشد. هرچه P_{ct} به 1 نزدیک‌تر باشد معیار بهتری از اتصال اختصاصی و درست miRNA به هدف خود می‌باشد(13).

بر اساس نتایج حاصل از بررسی miR-124، ژن‌های ذکر شده در جدول 1 بالاترین امتیاز را کسب نموده و به عنوان عمده‌ترین اهداف احتمالی برای اتصال این miRNA در مسیرهای نوروژنز انتخاب شدند.

جدول 1. ژن‌های مطالعه شده در نرم‌افزار تارگت اسکن

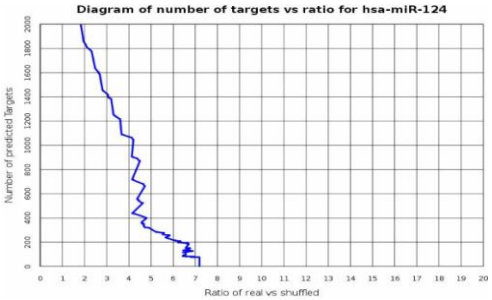
ژن هدف	Representative transcript	نام ژن	ناحیه محافظت شده	ناحیه محافظت شده ضعیف	Aggregate P_{CT}
SP1	NM_003109	Sp1 transcription factor	2	1	0/97
LAMC1	NM_002293	laminin, gamma 1	2	2	0/99
ITGB1	NM_002211	integrin, beta 1	2	0	0/97
PTBP1	NM_002819	polypyrimidine tract binding protein 1	2	1	0/97
EFNB1	NM_004429	ephrin-B1	1	0	0/91

ب. آنالیز miR-124 در پایگاه دایانا

در این پایگاه الگوریتم شناسایی اهداف mRNA بر مبنای چندین پارامتر محاسبه شده برای هر miRNA به طور جداگانه می‌باشد. 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 را ارائه می‌دهد. به طور اخص، برای هر پیش‌بینی برنامه نرم‌افزار شاخص‌هایی مثل نسبت سیگنال به پس‌زمینه(این پارامتر در واقع نسبت سیگنال هدف به زمینه می‌باشد و مقادیر بالاتر به معنای واقعی بودن بیشتر mRNA هدف می‌باشد) و نمره دقت(این پارامتر بین 0 تا 1 می‌باشد و بیانگر احتمال واقعی بودن mRNA هدف برای هرmiRNA می‌باشد) را ارائه می‌دهد که به عنوان شاخصی برای تشخیص میزان مثبت‌های کاذب محسوب می‌شود. پارامتر دیگر مورد بررسی در این پایگاه اطلاعاتی، نمره کلی miTG(در واقع امتیاز نهایی پیش‌گویی) و نمره ترشولد(آستانه) می‌باشد. مقادیر بالاتر معیار miTG حکایت از به واقعیت نزدیک‌تر بودن پیش‌بینی دارد(14). لازم به ذکر است که این سایت یک گراف که نشان‌دهنده اهداف miRNA به نسبت سیگنال هدف به زمینه است را ارائه می‌دهد. این دیاگرام دارای شیب کاهشی، بدین معنی است که با کاهش میزان تعداد اهداف پیش‌بینی شده نمره کلی miTG اهداف افزایش می‌یابد تا جایی که کلیه اهداف پیش‌بینی شده دارای نمره کلی miTG یکسان می‌باشند. شکل 2 گراف مربوط به اهداف

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

احتمالی پیش‌بینی شده برای miR-124 بر مبنای تعداد اهداف شناسایی شده و نسبت سیگنال به پس‌زمینه را نشان می‌دهد. در این گراف تعداد اهداف احتمالی پیش‌بینی شده روند کاهشی دارد در حالی که این روند کاهشی در تعداد اهداف با افزایش نمره کلی miTG همراه است.



شکل 2. گراف مربوط به اهداف احتمالی پیش‌بینی شده برای miR-124 بر مبنای تعداد اهداف شناسایی شده و نسبت سیگنال به پس‌زمینه

بدین‌ترتیب پنج ژنی که بالاترین امتیاز را بر اساس الگوریتم‌های این نرم‌افزار کسب کرده‌اند و مشخص گردیده که می‌توانند در مسیرهای نوروژنز نقش داشته باشند، به ترتیب در جدول 2 خلاصه شده است.

جدول 2. ژن‌های مطالعه شده در نرم‌افزار دایانا

نام ژن	Ensembl Gene Id	نمره miTG	نمره دقت	نسبت سیگنال به پس‌زمینه	ترشولد (آستانه)
SOX9	ENSG00000125398	8/90	0/56	3/38	7/3
LAMC1	ENSG00000135862	29/07	0/86	6/56	7/3
SP1	ENSG00000185591	26/53	0/86	6/77	7/3
PTBP1	ENSG00000011304	19/29	0/8	4/86	7/3
EFNB1	ENSG00000090776	8/35	0/56	3/19	7/3

آنالیز miR-124 در پایگاه میرواک

این پایگاه اطلاعاتی براساس روش برنامه‌نویسی perl نوشته شده است و بر مبنای رابطه مکملی بین ناحیه هسته miRNA با mRNA هدف و بر طبق مکمل شدن بازها بر اساس قانون واتسون و کریک است. در این نرم‌افزار توالی هسته هپتامر بر اساس قانون واتسون و کریک در بانک‌های اطلاعاتی دیگر جستجو می‌شود و زمانی که ناحیه هفت نوکلئوتیدی هسته با یک هدف مکمل شد ناحیه مزبور از هر دو انتها طویل می‌گردد و این کار تا زمانی که به یک mis-mach برسد ادامه می‌یابد. بعد از رسیدن به mis-mach طویل‌سازی متوقف می‌گردد و در نهایت نتایج تحلیل شده و نواحی هفت نوکلئوتیدی مکمل بر اساس قابلیت اتصال آن‌ها به ناحیه 3`-UTR ژن‌ها در لیست نتایج نشان داده می‌شود. هم‌چنین احتمال توزیع جفت بازهای تصادفی در توالی‌های آنالیز شده به وسیله توزیع پواسون محاسبه می‌شود و نتایج به صورت p گزارش می‌گردد(15). بر اساس نتایج به دست آمده از این نرم‌افزار نیز ژن‌های محتمل دخیل در مسیرهای نوروژنز که بیش‌ترین احتمال را دارند شامل SOX9، LAMC1، PTBP1، SP1 و EFNB1 می‌باشند و p آنها به ترتیب (0/013، 0/032، 0/038، 0/040، و 0/051) می‌باشد.

بحث

با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده اهداف LAMC1، ITGB1، PTBP1، SOX9، SP1 و EFNB1 با بیش‌ترین احتمال ممکن است در مسیر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

نورون‌زایی تحت تأثیر miR-124 قرار گیرند. اگرچه پروتئین‌های مذکور همگی به عنوان اهدافی که بالاترین امتیاز را کسب کرده‌اند در بین هر سه پایگاه فوق مورد توافق می‌باشند، با این وجود ترتیب نتایج حاصله در بین پایگاه‌های مختلف اندکی متفاوت است که این موضوع بیشتر به خاطر الگوریتم‌های متفاوت و تغییرات جزئی در الگوی نمره دهی در بین این پایگاه‌ها است.

پروتئین لامینین گاما 1 در انسان توسط ژن LAMC1 رونویسی می‌شود و یکی از اعضای گلیکوپروتئینی دخیل در تشکیل ماتریکس خارج سلولی و یکی از پروتئین‌های اصلی غشای پایه است. این پروتئین در محدوده گسترده‌ای از فرآیندهای بیولوژیک هم چون اتصال سلولی، تمایز، مهاجرت، مسیرهای پیام دهی و متاستاز دخالت دارد(16). در تنها مطالعه صورت گرفته در این زمینه، کائو و همکاران دخالت miR-124 در طی تکامل طناب عصبی را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند تاخیر در تشکیل غشای پایه در مرغ‌های با اختلال در تشکیل طناب عصبی به دلیل تارگت شدن رونوشت ژن LAMC1 توسط miR-124 و متعاقب آن کاهش میزان بیان آن می‌باشد(16). علاوه بر این اثبات کردند، علت دیگر تاخیر در تشکیل غشای پایه در مرغ‌های با اختلال در تشکیل طناب عصبی به دلیل تارگت شدن رونوشت ژنITGB1 توسط miR-124 و متعاقب آن کاهش میزان بیان آن می‌باشد(16).

پروتئین اینتگرین بتا 1 در انسان توسط ژن ITGB1 رونویسی می‌شود. اینتگرین‌ها، پروتئین‌های سطح سلولی هستند که در اتصال سلول به ماتریکس خارج سلولی نقش دارند. اینتگرین‌ها هم‌چنین به عنوان گیرنده‌هایی عمل می‌کنند که می‌توانند باعث فرستاده شدن پیام‌ها به درون سلول‌ها بشوند و موجب تنظیم ریخت سلول، مهاجرت سلول و هم‌چنین چرخه سلول شوند(17).

ژن PTBP1 تولید پروتئینی دخیل در فرآیند اسپلایسینگ می‌کند. ماکیو و همکاران نشان دادند دو فاکتور miRNA و فرآیند اسپلایسینگ-آلترنیتیو و هم‌چنین تقابل آن‌ها در تکامل سیستم عصبی اثر گذار هستند. آن‌ها اثبات کردند miR-124 به طور مستقیم رونوشت ژن PTBP1 را هدف قرار می‌دهد. از طرفی دیگر در طی فرآیند اسپلایسینگ pre-mRNA ژن PTBP2 (هومولوگ ژن PTBP1 در سلول‌های عصبی) توسط پروتئین PTBP1 مهار می‌شود و از این رو به محصول تبدیل نمی‌گردد. بدین‌ترتیب با مهار شدن رونوشت ژن PTBP1 توسط miR-124 میزان بیان پروتئین PTBP2 افزایش می‌یابد و در نهایت این واقعه منجر به افزایش حداکثری انتقال الگوهای اسپلایسینگ-آلترنیتیو غیرعصبی به الگوی اسپلایسینگ-آلترنیتیو عصبی می‌گردد(18).

ژن EFNB1 تولید پروتئین Ephrin-B1 می‌کند. این پروتئین نقش مهمی را در اتصالات سلولی و تکامل سیستم عصبی ایفا می‌کند. تغییر در میزان بیان این پروتئین، منجر به ایجاد حالت‌های بیماری در بالغین می‌گردد. بیان این پروتئین تحت کنترل یک لوپ فیدبکی دخیل در مکانیسم‌های تنظیمی بعد از نسخه‌برداری است. آروانیتیس و همکاران نشان دادند miR-124 در سطح رونویسی موجب مهار بیان EFNB1 می‌گردد. هم‌چنین آن‌ها اثبات کردند بیان miR-124 تحت تنظیم مسیرهای سیگنالینگ معکوس Ephrin-B1 قرار دارد. بدین‌ترتیب یک تعامل دو طرفه مهاری بین Ephrin-B1 و miR-124 برقرار است(19).

پروتئین SOX9 یک فاکتور رونویسی دخیل در فرآیند نورون‌زایی است. چن و همکاران نشان دادند با حذف miR-124 به صورت اندوژنوس سلول‌ها به سمت تقسیم سلولی و تکثیر پیش می‌روند، در صورتی که بیان اکتوپیک این miRNA موجب تمایز سلول‌های ناحیه به سمت نورون می‌گردند. هم‌چنین آن‌ها اثبات کردند مهار عملکرد miR-124 در طی تمایز موجب هایرپلازیا می‌گردد. بر اساس مطالعات آن‌ها فاکتور نسخه‌برداری SOX9 به عنوان هدف فیزیولوژیک برای miR-124 می‌باشد. بدین‌ترتیب با افزایش بیان SOX9 تمایز به سمت نورون منتفی می‌گردد، در صورتی‌که حذف SOX9 منجر به افزایش تشکیل نورون می‌گردد. مهار SOX9 توسط

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

miR-124 برای پیشرفت تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های نورونی بسیار حائز اهمیت می‌باشد(20).

پروتئین SP1 (Specific Protein 1) یک فاکتور نسخه‌برداری است. این پروتئین در انسان بر روی کروموزوم 12 در موقعیت 12q13.13 قرار دارد و در سال 1983 کشف شد. این پروتئین در مرحله بیان ژن در مراحل اولیه تکامل یک ارگانیسم نقش دارد و متعلق به خانواده Sp/KLF از فاکتورهای نسخه‌برداری می‌باشد. پروتئین SP1 در بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله تمایز، رشد سلولی، آپوپتوز، پاسخ ایمنی، پاسخ به آسیب‌های وارده به DNA و بازسازی کروماتین شرکت دارد(21). تغییرات بعد از ترجمه مثل فسفوریلاسیون، استیلاسیون، گلیکوزیلاسیون و فرآیندهای پروتئولیتیک به طور ویژه‌ای بر روی فعالیت این پروتئین اثر دارد و بدین‌ترتیب به واسطه این تغییرات می‌تواند به عنوان فعال‌کننده یا مهارکننده عمل نماید(21). فاکتورهای رونویسی متعلق به خانواده SP در بیان تعداد زیادی از ژن‌ها که بسیاری از آن‌ها به عنوان ژن‌های خانه‌دار شناخته شده‌اند، دخالت دارند. مطالعات دیگر نشان از تغییر در میزان بیان فاکتور رونویسی SP1 در بیماری‌های آلزایمر و Tauopathies(نوعی بیماری تخریب نورونی) دارد(22). در این نوع مطالعات میزان بیان فاکتور رونویسی SP_1 با کمک روش‌های ایمونوهیستوشیمی، میکروسکوپ ایمونوفلورسانس و کانفوکال و در بیماری‌های تخریب نورونی همانند آلزایمر و پارکینسون مورد بررسی قرار گرفته است. در این راستا فسفریلاسیون SP_1 و پروتئین آداپتوری که به آن متصل می‌شود، تنظیم‌کننده اثرات مثبت و منفی SP_1 بر روی بیان ژن‌ها است(23). هم‌چنین شواهدی از دخالت SP_1 در پاتولوژی بیماری آلزایمر وجود دارد. مهم‌ترین و بارزترین یافته پاتولوژیک در مغز بیماران مبتلا به آلزایمز رسوب پپتید آمیلوئید بتا است که در نهایت منجر به مرگ نورون‌ها می‌گردد. پپتید آمیلوئید بتا در مغز مبتلایان به آلزایمر در درون پلاک‌های موسوم به پلاک پیری به صورت پپتیدهای 1 تا 42 اسیدآمینه‌ای و به فرم متراکم یافت می‌شود. از طرفی دیگر آمیلوئید بتا طی فرآیندی پروتئولیتیک تحت اثر دو آنزیم به نام گاما سکرتاز و بتا سکرتاز از یک گلیکوپروتئین پیش‌ساز غشایی به نام پروتئین پیش‌ساز بتا آمیلوئید ساخته می‌شود، این در حالی است که مطالعات برون تنی حاکی از دخالت SP_1 در تنظیم بیان آنزیم بتا سکرتاز دارد(22). لذا با توجه به نقش مهم پروتئین SP_1 در فرآیندهای مرتبط با نورون‌زایی فاکتور کاندید مناسبی برای مطالعات عملی به نظر می‌رسد. لازم به ذکر است که آستانه در نرم‌افزار دایانا به صورت پیش‌فرض بر روی 7/3 تنظیم شده است. اگرچه این میزان حداقل آستانه می‌باشد و تا 19 قابلیت افزایش دارد و بدین معنی است که نرم‌افزار تنها اهدافی را که امتیازی بالاتر از این حد آستانه را دارند نمایش می‌دهد. بنابر این با افزایش میزان آستانه به حداکثر(19) می‌توان قضاوت سخت‌گیرانه‌تری داشت و بدین‌ترتیب فقط mRNAهایی که دارای حد آستانه 19 و یا بالاتر هستند، نشان داده خواهند شد. از این رو فقط اهدافی که نمره کلی miTG آن‌ها از حد آستانه مشخص شده بیشتر باشد از فیلتر نرم‌افزار عبور کرده و نشان داده خواهد شد(14). در این تحقیق زمانی که ترشولد حداکثر میزان یعنی 19 انتخاب شد، هم چنان SP_1 در صدر جدول قرار داشت و نمره کلی miTG آن در رتبه نخست قرار داشت.

لذا با توجه به دلیل این که نحوه عملکرد و دخالت اهداف LAMC1، ITGB1، PTBP1، SOX9 و EFNB1 در نورون‌زایی در مطالعات قبلی توسط محققان شناسایی شده است، بر اساس داده‌های ناشی از آنالیزهای بیوانفورماتیکی، به نظر می‌رسد نقش SP1 به عنوان یک فاکتور تحت کنترل miR-124 در فرآیند نوروژنز حائز اهمیت باشد و بدین‌ترتیبSP1 می‌تواند کاندید مناسب و جدیدی برای بررسی‌های عملی باشد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان نامه سرکار خانم مهدیه موندنی زاده دانشجوی دکتری پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی همدان می‌باشد که از نظر مالی توسط معاونت محترم تحقیقات و فن آوری این دانشگاه پشتیبانی گردیده

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 12:48 +0430 on Thursday June 21st 2018

است. بدین وسیله از زحمات همه همکاران محترم به ویژه سرکار خانم دکتر سمیرا محمدی یگانه عضو هیأت علمی دانشگاه شهید بهشتی و جناب آقای دکتر مهدی پریان عضو هیأت علمی انستیتو پاستور ایران کمال تشکر و قدردانی را داریم.

منابع

1. Appasani K. MicroRNAs: from basic science to disease biology: Cambridge University Press; 2008.
2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.
3. Shi M, Liu D, Duan H, Shen B, Guo N. Metastasis-related miRNAs, active players in breast cancer invasion, and metastasis. Cancer and Metastasis Reviews. 2010;29(4):785-99.
4. Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. Blood. 2006;108(12):3646-53.
5. Gao F-B. Context-dependent functions of specific microRNAs in neuronal development. Neural development. 2010;5(1):25-6.
6. Kuss AW, Chen W. MicroRNAs in brain function and disease. Current neurology and neuroscience reports. 2008;8(3):190-7.
7. Liu G, Detloff MR, Miller KN, Santi L, Houlé JD. Exercise modulates microRNAs that affect the PTEN/Mtor pathway in rats after spinal cord injury. Experimental neurology. 2012;233(1):447-56.
8. Maiorano NA, Mallamaci A. The pro-differentiating role of miR-124. RNA biology. 2010;7(5):528-33.
9. Meza-Sosa KF, Valle-García D, Pedraza-Alva G, Pérez-Martínez L. Role of microRNAs in central nervous system development and pathology. Journal of neuroscience research. 2012; 90(1):1-12.
10. Krichevsky AM, Sonntag KC, Isacson O, Kosik KS. Specific microRNAs modulate embryonic stem cell–derived neurogenesis. Stem cells. 2006; 24(4):857-64.
11. Le Quesne J, Caldas C. Micro-RNAs and breast cancer. Molecular oncology. 2010; 4(3): 230-41.
12. Götte M. MicroRNAs in breast cancer pathogenesis. Minerva ginecologica. 2010; 62(6): 559-71.
13. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. Genome research. 2009;19(1):92-105.
14. 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;37(suppl 2):W273-W6.
15. 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.
16. Cao X, Pfaff SL, Gage FH. A functional study of miR-124 in the developing neural tube. Genes & development. 2007;21(5):531-6.
17. Brakebusch C, Hirsch E, Potocnik A, Fassler R. Genetic analysis of beta1 integrin function: confirmed, new and revised roles for a crucial family of cell adhesion molecules. Journal of cell science. 1997;110(23):2895-904.
18. Makeyev EV, Zhang J, Carrasco MA, Maniatis T. The MicroRNA miR-124 promotes neuronal differentiation by triggering brain-specific alternative pre-mRNA splicing. Molecular cell. 2007;27(3):435-48.
19. Arvanitis DN, Jungas T, Behar A, Davy A. Ephrin-B1 reverse signaling controls a posttranscriptional feedback mechanism via miR-124. Molecular and cellular biology. 2010;30(10):2508-17.
20. Cheng L-C, Pastrana E, Tavazoie M, Doetsch F. miR-124 regulates adult neurogenesis in the subventricular zone stem cell niche. Nature neuroscience. 2009; 12(4): 399-408.
21. Suske G. The Sp-family of transcription factors. Gene. 1999;238(2):291-300.
22. Santpere G, Nieto M, Puig B, Ferrer I. Abnormal Sp1 transcription factor expression in Alzheimer disease and tauopathies. Neuroscience letters. 2006;397(1):30-4.
23. Chu S, Ferro TJ. Sp1: regulation of gene expression by phosphorylation. Gene. 2005; 348:1-11.