

Research Paper

Bioinformatic Prediction of miRNAs Targeting APRIL and BAFF Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia



Mahdieh Mondanizadeh^{1,2}, Niloofar Moradi², Razieh Amini², Behzad Khansarinejad^{1,3}, *Ghasem Mosayebi^{1,3}

1. Molecular and Medical Research Center, Arak University of Medical Sciences, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

2. Department of Biotechnology and Molecular Medicine, School of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

3. Department of Microbiology and Immunology, School of Paramedicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.



Citation: Mondanizadeh M, Moradi N, Amini R, Khansarinejad B, Mosayebi Gh. [Bioinformatic Prediction of miRNAs Targeting APRIL and BAFF Genes in Chronic Lymphocytic Leukemia (Persian)]. Journal of Arak University of Medical Sciences(JAMS). 2019; 22(5):32-43. <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.32>

 <https://doi.org/10.32598/JAMS.22.5.32>



Article Info:

Received: 08 Jul 2019

Accepted: 27 Aug 2019

Available Online: 01 Dec 2019

Key words:

Bioinformatics programs, Chronic Lymphocytic Leukemia, MicroRNA, APRIL, BAFF

ABSTRACT

Background and Aim Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most commonly occurring leukemia in adults, accounting for about 30-25% of total leukemia. One of the important etiological causes of this leukemia is the disruption of the Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling pathway. The two proteins of Apoptosis-Inducing Ligand (APRIL) and B-Cell Activating Factor (BAFF) play a role in the pathogenesis of this leukemia by affecting the NF- κ B signaling pathway. In this study, due to the effect of miRNAs in regulating many cellular processes, the prediction of the prominent miRNAs targeting APRIL and BAFF transcripts in B-cell CLL patients was evaluated using specific and different bioinformatics programs.

Methods & Materials Afterwards retrieving the sequences of APRIL and BAFF proteins from the NCBI website, by using several programs including miRanda, TargetScan, miRWalk, DIANA and miRDB with different algorithms, the prediction of miRNAs targeting these genes was investigated.

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

Results Based on the scoring system of bioinformatics programs, "hsa-miR-145-5p" and "hsa-miR-185-5p" were identified as miRNAs targeting APRIL gene, while "hsa-miR-424" and "hsa-miR-497" were miRNAs targeting BAFF gene. They were suggested for the practical studies in future.

Conclusion Based on the important role of APRIL and BAFF genes in the normal process of cell death and B-cell evolution, it seems that the mi-RNAs predicted by bioinformatics programs using different algorithms can be used as a diagnostic molecular biomarker to identify B-cell CLL patients.

Extended Abstract

Introduction

Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL) is the most common leukemia in adults that appears to be caused by a defect in cell differentiation. CLL has various etiologic causes includ-

ing genetic alterations and impaired intracellular signaling pathway. Therefore, the identification and evaluation of proteins involved in molecular signaling pathway in the CLL that changes their expression relative to the normal state can lead to the development of a new and effective therapeutic or diagnostic method. The two proteins of Apoptosis-Inducing Ligand (APRIL) and B-Cell Activating Factor (BAFF) play

* Corresponding Author:

Ghasem Mosayebi, PhD

Address: Department of Microbiology and Immunology, School of Paramedicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran.

Tel: +98 (863) 4173503

E-mail: gmosayebi@yahoo.com

a role in the pathogenesis of this leukemia by affecting the Nuclear Factor Kappa B (NF- κ B) signaling pathway.

APRIL protein is significantly increased in the serum of patients with CLL, and by stimulating the NF- κ B pathway, ultimately inhibits apoptosis in B-cells. On the other hand, BAFF protein, by helping B-cell lymphocyte proliferation, ultimately inhibits B-cell apoptosis and cell progression to tumorigenesis and become cancerous. In recent years, researchers have found that some miRNAs can cause cells to become cancerous by reducing gene expression and gene silencing. This confirms the important potential of these molecular agents as biomarkers in the diagnosis, prognosis, progression, treatment and drug resistance of cancers including CLL. In this regard, considering the effect of miRNAs in regulating many cellular processes, the prediction of the prominent miRNAs targeting APRIL and BAFF transcripts in B-cell CLL patients was evaluated in the present study using specific and different bioinformatics programs.

Materials and Methods

This study is based on the bioinformatics theory. First, the sequences of APRIL and BAFF proteins were retrieved from the NCBI website. Then, by using bioinformatics programs of miRanda, TargetScan, miRWalk, DIANA and miRDB, the prediction of miRNAs targeting these genes was investigated. These programs have different algorithms. The miRanda program presents the results of bioinformatics assessments by providing an index called “miRSVR”, and the TargetScan program shows the results based on a factor called “Pct” (probability of conserved targeting) in humans and mammals, rats, worms, flies and frogs. Algorithm used in miRWalk software is based on prediction of miRNA binding site within complete sequences of all known genomes (even mitochondril genes).

The basis for prediction assessments in the DIANA program is an index called “miTG score” or precision score. In the miRDB database, the prediction score ranges from 50-100, and higher score shows the higher likelihood of miRNA binding to the target. Outputs from each program representing each miRNA score were then saved as an Excel file. Among the obtained data, miRNAs that the highest complementary to BAFF and APRIL genes were selected for the study.

Results

The results of the miRWalk program indicated that “miR-15a-5p”, “miR-500b-5p” and “miR-4803” were predicted and “miR-215” and “miR-192” were confirmed as BAFF

gene targeters. The results of the DIANA program showed that the “miR-424” and “miR-497” targeted BAFF gene whose scores were 0.952 and 0.916, respectively. The results of the miRDB program reported that “miR-15a-5p”, “miR-497” and “miR-424” targeted BAFF gene with the highest scores. The results of the miRanda program showed that “hsa-miR-544” targets the BAFF gene.

The results of the TargetScan program indicated that the APRIL gene is targeted by “miR-145-5p” and “miR-5195” with the highest score and the best binding conditions. The results of the miRanda program showed that “miR-185” with the highest score and more efficient binding can target the APRIL gene. Based on the results of the DIANA program, APRIL gene is targeted by “miR-6132” and “miR-185-5p” with the highest scores. According to the results of miRWalk program, numerous miRNAs both predicted and confirmed that were the targeters of APRIL gene. The results of miRDB database indicated that APRIL gene is targeted by hsa-miR-6716-5p and hsa-miR-4306 with the highest scores. Finally, “hsa-miR-145-5p” and “hsa-miR-185-5p” were identified as miRNAs targeting APRIL gene, and “hsa-miR-424” and “hsa-miR-497” were miRNAs targeting BAFF gene. They were suggested for the practical studies in future.

Conclusion

Bioinformatics is an important technique for managing large-scale biological data. Previous studies have indicated that mi-RNAs are involved in almost all physiological and pathological mechanisms. Similarly, despite demonstrating the aberrant expression of miRNAs in many diseases including cancers, these molecular agents can be used as potential biomarkers for both diagnosis and treatment. Therefore, it seems that the prediction of the miRNAs that target BAFF and APRIL gene can be an effective step in the diagnosis and treatment of B-cell CLL.

To our knowledge, this is the first time that bioinformatics programs of miRanda, TargetScan, miRWalk, DIANA and miRDB are used for the target prediction of miRNAs. Based on the results, we found out that “hsa-miR-145-5p” and “hsa-miR-185-5p” were the miRNAs targeting APRIL gene, and “hsa-miR-424” and “hsa-miR-497” were targeting BAFF gene. Since there is no specific study on the role of these miRNAs in the progression of B-cell CLL, the present study, as the first study, allows the introduction and assessment of miRNAs and new genes to help diagnose patients with this cancer.

Ethical Considerations

Compliance with ethical guidelines

This study obtained its ethical approval from the Research Ethics Committee of Arak University of Medical Sciences (Code: IR.ARAKMU.REC.1395.418).

Funding

This study extracted from a research proposal approved by the Arak University of Medical Sciences. We received financial support from the Deputy for Research and Technology of this University.

Authors' contributions

Conceptualization: Mahdih Mondanizadeh and Ghasem Mosayebi; Investigation: Mahdih Mondanizadeh, Niloofer Moradi and Razieh Amini; Review & editing: Mahdih Mondanizadeh and Niloofer Moradi; Validation: Behzad Khansarinejad; Supervision: Ghasem Mosayebi.

Conflicts of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Deputy for Research and Technology and the staff of the Laboratory of Molecular Microbiology and Virology at Arak University of Medical Sciences and Pastor Institute for their support and cooperation.

پیش‌بینی بیوانفورماتیکی miRNA های هدف گیرنده ژن های BAFF و APRIL در بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

مهديه موندنی‌زاده^{۱،۲}، نیلوفر مرادی^۲، راضیه امینی^۲، بهزاد خوانساری‌نژاد^۳، قاسم مسیبی^{۳،۱}

۱. مرکز تحقیقات پزشکی و مولکولی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۲. گروه زیست‌فناوری و پزشکی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

۳. گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران.

چکیده

زمینه و هدف: لوسمی لنفوسیتی مزمن شایع‌ترین لوسمی در بزرگسالان است که حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد از کل لوسمی‌ها را شامل می‌شود. از علل مهم اتیولوژیک این لوسمی می‌توان به اختلال در مسیر پیام‌رسانی NF-kB اشاره کرد. دو پروتئین APRIL و BAFF با تأثیر در مسیر پیام‌رسانی NF-kB در بیماری‌زایی این لوسمی ایفای نقش می‌کنند. بنابراین در مطالعه پیش‌رو با توجه به اثر تنظیمی miRNA در بسیاری از فرایندهای سلولی، به پیش‌گویی miRNA های شاخص هدف گیرنده ترانسکرپت‌های مربوط به APRIL و BAFF با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختلف و اختصاصی پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: بعد از دریافت توالی پروتئین‌های APRIL و BAFF از سایت NCBI، با کمک پایگاه‌های بیوانفورماتیکی miRanda، TargetScan، miRWalk، DIANA و miRDB با الگوریتم‌های متفاوت به بررسی و پیش‌گویی miRNA های هدف گیرنده ژن‌های مذکور پرداخته شد.

ملاحظات اخلاقی: این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک تصویب شده است.

یافته‌ها: در نهایت بر اساس امتیازدهی توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیک مذکور و بالاتر بودن امتیاز و هدف‌گیری مناسب‌تر، has-miR-145-5p و has-miR-185-5p به عنوان miRNA های هدف گیرنده ژن APRIL و همچنین has-miR-424 و has-miR-497 به عنوان miRNA های هدف گیرنده ژن BAFF معرفی و برای فاز مطالعات عملی آینده انتخاب شدند.

نتیجه‌گیری: با توجه به نقش مهم ژن‌های APRIL و BAFF در روند طبیعی مرگ سلولی و تکامل سلول‌های B به نظر می‌رسد می‌توان از این miRNA های پیش‌گویی شده با کمک پایگاه‌های بیوانفورماتیک با الگوریتم متفاوت به عنوان بیومارکرهای مولکولی تشخیصی در جهت شناسایی بیماران مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن سود جست.

اطلاعات مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۷ تیر ۱۳۹۸

تاریخ پذیرش: ۰۵ شهریور ۱۳۹۸

تاریخ انتشار: ۱۰ آذر ۱۳۹۸

کلیدواژه‌ها:

پایگاه‌های بیوانفورماتیک، لوسمی لنفوسیتی مزمن (B-CLL)، miRNA، APRIL و BAFF

مقدمه

نظر آید، قابلیت مبارزه با عفونت را آن‌طور که باید داشته باشند، ندارند. این لنفوسیت‌های نابالغ را می‌توان در خون، مغز استخوان و ارگان‌های لنفوئیدی مشاهده کرد [۴، ۳].

لوسمی لنفوسیتی مزمن دارای سیر بالینی متغیری است؛ بدین صورت که برخی بیماران نیاز به درمان ندارند، در حالی که بعضی از آن‌ها بیماری پیش‌رونده و تهاجمی داشته و عمر کوتاهی دارند. بنابراین عوامل پیش‌آگهی‌دهنده در شناسایی بیماران با پیش‌آگهی ضعیف در مقایسه با بیماران با پیش‌آگهی بهتر، به همراه تشخیص زمان شروع درمان، حائز اهمیت است [۱].

سرطان خون یکی از شایع‌ترین سرطان‌هاست که به نظر می‌رسد به واسطه نقص در تمایز سلولی ایجاد می‌شود. لوسمی لنفوسیتی مزمن^۱ شایع‌ترین لوسمی در بزرگسالان در کشورهای غربی است که حدود ۲۵ تا ۳۰ درصد از کل لوسمی‌ها را شامل می‌شود [۲، ۱]. لوسمی لنفوسیتی مزمن یک بیماری کلونال سلول‌های بنیادی خون‌ساز است که در آن روند رشد و نمو لنفوسیت‌ها به‌درستی انجام نمی‌گیرد و تعداد بسیار زیادی از آن‌ها ساخته می‌شود. اگرچه ظاهر آن‌ها ممکن است طبیعی به

1. Chronic Lymphocytic Leukemia (CLL)

* نویسنده مسئول:

دکتر قاسم مسیبی

نشانی: اراک، دانشگاه علوم پزشکی اراک، گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی.

تلفن: ۰۳ ۴۱۷۳۵۰۳ (۸۶۳) ۹۸+

پست الکترونیکی: gmosayebi@yahoo.com



miRNAها در بسیاری از فرایندهای سلولی، به پیش‌گویی miRNAهای شاخص هدف گیرنده ترانسکرپت‌های مربوط به APRIL و BAFF با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی مختلف و اختصاصی پرداخته شد. بدین ترتیب با توجه به داده‌های حاصل از نرم‌افزارهای موجود با الگوریتم مختلف، miRNAهایی که بالاترین امتیاز و بیشترین احتمال را در هدف‌گیری ژن‌های مذکور داشتند، به منظور بررسی‌های عملی و آزمایشگاهی در پژوهش‌های بعدی انتخاب شدند.

مواد و روش‌ها

پژوهش حاضر یک بررسی تئوری بیوانفورماتیک است.

پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های BAFF و APRIL به وسیله پایگاه میراندا^۵

این پایگاه اطلاعاتی^۵ نتایج حاصل از ارزیابی‌های بیوانفورماتیک را با ارائه شاخصی به نام miRSVR نشان می‌دهد. اساس رتبه‌بندی در این مدل بر پایه توالی و خصوصیات زمینه‌ای دابلکس mRNA-miRNA است. برای پیش‌گویی miRNA در این سایت بعد از ورود به صفحه اصلی سایت وارد بخش Target mRNA شدیم و نام ژن‌های BAFF و APRIL و گونه Homo sapiens را انتخاب کردیم و جست‌وجو انجام شد و سایت در صفحه نتایج miRNAهای تارگت‌کننده ژن‌ها را نمایش داد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های BAFF و APRIL در پایگاه تارگت اسکن^۶

این پایگاه اطلاعاتی^۶ نتایج حاصل از ارزیابی‌های بیوانفورماتیک را بر اساس فاکتوری به نام Pct یا احتمال هدف‌گیری محافظت‌شده در انسان و پستانداران، موش، کرم، مگس و قورباغه ارائه می‌دهد. این سایت بر اساس نحوه اتصال نوکلئوتیدهای ناحیه سید هر miRNA به mRNA هدف، امکان هدف‌یابی یک ژن توسط یک miRNA را ارزیابی می‌کند. برای پیش‌گویی miRNA در این سایت شماره Ensembl ژن‌های BAFF و APRIL و همچنین اسم گونه Homo sapiens برای جست‌وجو استفاده شد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های BAFF و APRIL در پایگاه میرواک^۷

این پایگاه داده^۷، اطلاعات miRNAهای انسان، موش و رت

بروز CLL به دو صورت تهاجمی^۲ و خفیف^۳ نمایان می‌شود [۵]. لوسمی لنفوسیتی مزمن داری علل اتیولوژیک متفاوت است. یکی از علل اتیولوژیک CLL تغییرات ژنتیکی است که این تغییرات به وسیله تکنیک FISH در بیش از ۸۰ درصد از موارد تشخیص داده می‌شود [۶]. از دیگر علل این بیماری اختلال در برخی از مسیرهای سیگنالینگ سلولی است. لذا شناسایی و ارزیابی پروتئین‌های دخیل در مسیر سیگنالینگ مولکولی CLL که بیان آن‌ها نسبت به حالت نرمال تغییر می‌کند، می‌تواند منجر به ایجاد یک روش تشخیصی و یا درمانی جدید و مؤثر شود [۷].

از جمله مسیرهای سیگنالینگ سلولی دخیل در ایجاد این نوع بدخیمی خونی مسیر NF- κ B است. یکی از اعضای خانواده فاکتور نکروز دهنده تومور (TNF) که در مسیر NF- κ B دخیل است، لیگاند الفاکنده تکثیر (APRIL) است که به طور گسترده‌ای در سلول‌های هماتوپوئیک بیان می‌شود [۸]. این پروتئین به طور قابل توجهی در سرم بیماران مبتلا به CLL افزایش می‌یابد [۹] و با تمایل بالا به دو گیرنده BCMA و TAC1 متصل شده و بدین واسطه موجب فعال شدن TRAFs و تحریک مسیر NF- κ B در نهایت مهار آپوپتوز در سلول‌های B می‌شود [۸]. از سویی دیگر BAFF^۴ سایتوکاینی گلیکوپروتئینی و متعلق به خانواده لیگاند‌های عامل نکروز توموری است. BAFF نقش مهمی در تکثیر و تمایز لنفوسیت B ایفا می‌کند و این اثر را از طریق اتصال به سه گیرنده سطح سلول‌های B به نام‌های BCMA، TAC1 و BAFF-R اعمال می‌کند [۱۰، ۱۱]. این سایتوکاین مسیر کلاسیک NF- κ B را فعال می‌کند و با فعال شدن این مسیر BAFF همانند APRIL منجر به مهار آپوپتوز سلول‌های B می‌شود و در نهایت سلول به سمت ایجاد تومور و سرطانی شدن پیشروی می‌کند [۱۲، ۱۳].

در سال‌های اخیر محققان دریافته‌اند برخی miRNAها از طریق کاهش بیان و خاموش کردن ژن‌ها منجر به روند سرطانی شدن سلول‌ها می‌شوند که همین امر تأییدکننده پتانسیل مهم این عوامل مولکولی به عنوان بیومارکر در تشخیص، پیش‌آگهی، پیشرفت، درمان و مقاومت دارویی انواع سرطان از جمله CLL است [۱۴، ۱۵]. در واقع آن‌ها با مهار mRNA هدف، به تعدیل سطح بیان پروتئین‌های خاص می‌پردازند. به علاوه miRNAها به عنوان مولکول‌های کلیدی در کنترل طیف گسترده‌ای از فعالیت‌های سلولی مانند تکثیر، مرگ، تمایز، تحرک و تهاجم دخالت دارند [۱۶، ۱۷]. سطوح بیان miRNAها به عنوان ابزاری جهت تشخیص انواع مختلف CLL یا برای پیگیری پیشرفت بیماری به کار می‌رود.

لذا در این مطالعه با توجه به نقش کلیدی پروتئین‌های APRIL و BAFF در مسیر انکوژنز CLL و اهمیت اثر تنظیمی

5. MiRanda

6. <http://www.microna.org>

7. TargetScan

8. <http://www.TargetScan>

9. MiRWalk

10. <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>

2. Aggressive

3. Indolent

4. B-cell Activating Factor (BAFF)

یافته‌ها

نتایج حاصل از پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه‌های اطلاعاتی miRDB، DIANA، Targetscan، miRanda و miRWalk

نتایج بررسی در پایگاه Targetscan نشان می‌دهد -miR195، miR424، miR-497، miR-15b-5p، miR-15a-5p، miR-5p و -miR16-5p ژن BAFF را مورد هدف قرار می‌دهند. این نتایج در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

نتایج بررسی در پایگاه miRWalk حاکی از این بود که miR-500b-5p، miR-15a-5p و miR-4803 به صورت پیش‌گویی شده و miR-215 و miR-192 به صورت تأیید شده، از تارگت‌کننده‌های ژن BAFF در پایگاه میرواک هستند. به علاوه نتایج این پایگاه توسط پایگاه‌های TargetScan، miRanda و RNA22 نیز تأیید می‌شود. این نتایج به ترتیب در جدول شماره ۲ نشان داده شده است.

نتایج بررسی در پایگاه DIANA نشان‌دهنده هدف‌گیری ژن BAFF توسط miR-424 و miR-497 به ترتیب با امتیاز ۰/۹۵۲ و ۰/۹۱۶ است. این نتایج به ترتیب در جدول شماره ۳ نشان داده شده است. نتایج بررسی در پایگاه miRDB نشان می‌دهد -miR-497، miR-15a-5p و miR-424 با بالاترین امتیاز ژن BAFF را مورد هدف قرار می‌دهند. نتایج در جدول شماره ۴ قابل مشاهده است.

نتایج بررسی در پایگاه miRanda نشان می‌دهد hsa-miR-544 ژن BAFF را مورد هدف قرار می‌دهند. نتایج در جدول شماره ۵ قابل مشاهده است.

نتایج حاصل از پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL در پایگاه‌های اطلاعاتی miRWalk، DIANA، Targetscan و miRanda

نتایج بررسی در پایگاه TargetScan حاکی از هدف‌گیری ژن APRIL توسط miR-145-5p و miR-5195 با بالاترین امتیاز و بهترین شرایط اتصال است. این نتایج در جدول شماره ۶ نشان داده شده است.

نتایج بررسی در پایگاه miRanda نشان می‌دهد miR-185 با بالاترین امتیاز و با اتصال مناسب‌تر می‌تواند ژن APRIL را مورد هدف قرار دهد. این نتایج در جدول شماره ۷ نشان داده شده است.

نتایج بررسی در پایگاه DIANA نشان‌دهنده هدف‌گیری ژن APRIL توسط miR-6132 و miR-185-5p با بالاترین امتیاز است. این نتایج به ترتیب در جدول شماره ۸ نشان داده شده است.

را به دو صورت پیش‌بینی شده و به صورت تجربی در اختیار محقق قرار می‌دهد. الگوریتم به‌کاررفته در این نرم‌افزار بر اساس پیش‌بینی محل اتصال miRNA در توالی‌های کامل تمام ژنوم‌های شناخته‌شده (حتی میتوکندری) در موجودات نامبرده است. در این سایت یک‌بار جست‌وجو بر اساس مدل پیش‌گویی^{۱۱} و یک‌بار بر اساس مدل تأییدشده^{۱۲} و بر اساس اسامی مختلف ژن‌های BAFF و APRIL انجام شد.

پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های BAFF و APRIL در پایگاه دایانا^{۱۳}

مبنای ارزشیابی این پایگاه اطلاعاتی^{۱۴} برای هر پیش‌بینی، شاخصی با عنوان نمره دقت یا miTG score است. این پایگاه با چندین پایگاه بنام دیگر، مانند HUGO Ensembl، UCSC، SwissProt مرتبط است. الگوریتم مورد استفاده در این سایت بر پایه مجموع امتیازات نواحی محافظت‌شده و غیرمحافظت‌شده با هم و ارائه یک امتیاز کلی است که حاکی از تغییرات بیان mRNA هدف است. در این پایگاه نیز جست‌وجو بر اساس نام ژن‌های BAFF و APRIL در بخش SOFTWARE انجام گرفت.

پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF و APRIL در پایگاه میر دی بی^{۱۵}

در این پایگاه اطلاعاتی آنلاین^{۱۶} پیش‌بینی miRNA برای پنج گونه انسان، موش، رت، سگ و مرغ انجام می‌گیرد و جست‌وجو می‌تواند بر اساس نام miRNA مورد نظر و یا نام ژن هدف انجام می‌شود. نمره ارائه‌شده در این پایگاه بین ۵۰ تا ۱۰۰ است و هرچه نمره کسب‌شده به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد، احتمال واقعی بودن احتمال اتصال miRNA به mRNA هدف بیشتر است. در این پایگاه، جست‌وجو بر اساس نام ژن‌های BAFF و APRIL انجام شد.

نحوه گزینش و انتخاب miRNAهای برتر

در ابتدا نتایج خروجی از هر پایگاه اطلاعاتی بر اساس بالاتر بودن امتیاز هر miRNA در فایل Excel ذخیره شد. سپس از میان داده‌ها، miRNAهایی که دارای بیشترین احتمال رابطه مکملی با ژن‌های BAFF و APRIL بودند و در تعداد بیشتری از نرم‌افزارها پیش‌گویی و تأیید شدند، برای مطالعات عملی در آینده انتخاب شدند.

11. Predicted target module
12. Validated target module
13. DIANA
14. [Http://diana.cslab.ece.ntua.gr/](http://diana.cslab.ece.ntua.gr/)
15. miRDB
16. [Http://www.mirdb.org/](http://www.mirdb.org/)

جدول ۱. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه TargetScan

Pct	نحوه اتصال *	miRNA
۰/۷۹	7mer-m8	has-miR-497
۰/۷۹	7mer-m8	has-miR-424
۰/۸۷	8mer	has-miR-15b-5p
۰/۱	8mer	has-miR-195-5p
۰/۱	8mer	has-miR-16-5p



* این نرم‌افزار نحوه اتصال هر miRNA به ناحیه 3'-UTR هر ژن را بر اساس نوع هیبریدشدن به سه دسته اتصال 8mer، 7mer-m8 و 7mer-A1 تقسیم می‌کند.

جدول ۲. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه miRWalk

Targetscan	RNA22	Miranda	miRWalk	miRNA Validated	miRNA Predicted
✓	✓	✓	✓	has-miR-215	has-miR-15a-5p
✓	✓	✓	✓	has-miR-192	has-miR-500b-5p



تأیید هستند. نتایج در جدول شماره ۹ نشان داده شده است.

نتایج بررسی در پایگاه miRDB نشان‌دهنده هدف‌گیری ژن APRIL توسط hsa-miR-6716-5p و hsa-miR-4306 با بالاترین امتیاز است. نتایج در جدول به شماره ۱۰ قابل مشاهده است.

نتایج بررسی در پایگاه miRWalk حاکی از وجود miRNAهای متعددی است که هم به صورت پیش‌گویی شده و هم به صورت تأییدشده، از تارگت‌کننده‌های ژن APRIL هستند که این نتایج توسط پایگاه‌های TargetScan، miRanda، RNA22 و مورد

جدول ۳. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه DIANA

miTG score	miRNA
۰/۹۵۲	has-miR-424
۰/۹۱۶	has-miR-497
۰/۹۹۸	has-miR-195-5p
۰/۸۹۲	has-miR-4739
۰/۹۹۵	has-miR-16-5p



جدول ۴. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه miRDB

Target Score	miRNA
۹۳	hsa-miR-497
۹۳	hsa-miR-424
۹۰	hsa-miR-4803
۸۸	hsa-miR-500b-5p
۶۷	hsa-miR-4739



جدول ۵. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پایگاه miRanda

miRNA	mirSVR score	PhastCons score
hsa-miR-544	-۰/۱۳۲۲	۰/۵۰۹۵



جدول ۶. نتایج پیش‌گویی ANRimهای هدف گیرنده ژن LIRPA در پایگاه TargetScan

miRNA	نحوه اتصال*	Score
has-miR-145-5p	7mer-A1	-۰/۰۶
has-miR-5195	7mer-A1	-۰/۰۹



* این نرم‌افزار نحوه اتصال هر miRNA به ناحیه 3'-UTR هر ژن را بر اساس نوع هیبرید شدن به سه دسته اتصال 7mer-A1، 7mer-m8، 8mer و 7mer تقسیم می‌کند.

جدول ۷. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL در پایگاه miRanda

miRNA	mirSVR score	PhastCons score
hsa-miR-185-5p	-۰/۹۳۵۱	۰/۶۰۰۷
hsa-miR-383	-۱/۰۱۴۶	۰/۵۹۳۱
hsa-miR-222	-۰/۴۵۲۸	۰/۶۱۸۵
hsa-miR-221	-۰/۴۴۶۳	۰/۶۱۸۵



جدول ۸. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL در پایگاه DIANA

miRNA	microT CDS
has-miR-6132	۰/۹۵۳
has-miR-185-5p	۰/۹۱۸
has-miR-4644	۰/۹۰۶
has-miR-4503	۰/۸۸۰
has-miR-1270	۰/۸۷۸



به سرطان خون و افراد گروه کنترل (افراد سالم) در مطالعات فاز عملی در جدول ۱۳ نشان داده شده است.

بحث

بیوانفورماتیک یک تکنیک مهم برای مدیریت داده‌های بیولوژیکی در مقیاس بزرگ است. در واقع مجموعه‌ای از نرم‌افزارها در بیوتکنولوژی مدرن هست که روش‌ها و نرم‌افزارهایی را برای درک بهتر اطلاعات بیولوژیکی ارائه می‌دهد و با استفاده از علوم ریاضیات و آمار به بسیاری از سؤالات زیست‌پزشکی پاسخ می‌دهد و از این طریق می‌تواند به تفسیر و تحلیل داده‌های زیستی بپردازد [۱۷].

نحوه گزینش و انتخاب miRNAهای برتر

نحوه انتخاب و گزینش miRNA هدف گیرنده ژن BAFF در جدول شماره ۱۱ و miRNA هدف گیرنده ژن APRIL در جدول شماره ۱۲ قابل مشاهده است. بدین ترتیب در جدول شماره ۱۱ و ۱۲ miRNAهای با امتیاز بالاتر و اتصال بهتر با ژن‌های هدف، انتخاب و گردآوری شدند. سپس از بین آن‌ها miRNAهایی با بیشترین تکرار و تأیید در پایگاه‌های مورد مطالعه به عنوان miRNAهای هدف گیرنده این ژن‌ها جهت بررسی در فاز عملی این پژوهش انتخاب شدند.

همچنین miRNAهای منتخب (miR-185، miR-145-5p، miR-424، و miR-497) برای بررسی میزان بیان در افراد مبتلا

جدول ۹. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL در پایگاه miRWalk

TargetsCan	RNA22	miRanda	miRWalk	miRNA Validated	miRNA Predicted
✓	✓	✓	✓	has-miR-548w	has-miR-1
✓	✓	✓	✓	has-miR-1293	has-miR-330-3p
✓	✓	✓	✓	has-miR-193b-3p	has-miR-3170
✓	✓	✓	✓	has-miR-320a	has-miR-206
✓	✓	✓	✓	has-miR-145-5p	has-miR-582-3p



جدول ۱۰. نتایج پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL در پایگاه miRDB

Target Score	miRNA
۹۳	hsa-6716-5p
۹۰	hsa-miR-4306
۸۲	hsa-miR-383-5p
۸۲	hsa-miR-4446-5p
۷۸	hsa-miR-4644
۷۸	hsa-miR-185-5P

جدول ۱۱. نحوه‌گزینش miRNA هدف گیرنده ژن BAFF

مجموع	DIANA	miRDB	TargetsCan	miRWalk	miRanda	miRNA
۳	۱	۱	۱	۰	۰	has-miR-497
۳	۱	۱	۱	۰	۰	has-miR-424
۲	۰	۰	۱	۰	۰	has-miR-15b-5p
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-215
۲	۱	۰	۱	۰	۰	has-miR-195-5p
۲	۱	۰	۱	۰	۰	has-miR-16-5p
۲	۰	۱	۰	۱	۰	has-miR-500b-5p
۱	۰	۱	۰	۰	۰	has-miR-4803
۲	۱	۱	۰	۰	۰	has-miR-4739



جدول ۱۲. نحوه گزینش miRNA هدف گیرنده ژن APRIL

مجموع	miRanda	DIANA	Targetscan	miRWalk	miRDB	miRNA
۲	۰	۰	۱	۱	۰	has-miR-145-5p
۳	۱	۱	۰	۰	۱	has-miR-185-5p
۱	۰	۰	۱	۰	۰	has-miR-5195
۲	۱	۰	۰	۰	۱	has-miR-383
۱	۱	۰	۰	۰	۰	has-miR-222
۱	۱	۰	۰	۰	۰	has-miR-221
۲	۰	۱	۰	۰	۱	has-miR-6132
۲	۰	۱	۰	۰	۱	has-miR-4644
۱	۰	۱	۰	۰	۰	has-miR-4503
۱	۰	۱	۰	۰	۰	has-miR-1270
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-1
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-330-3p
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-3170
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-206
۱	۰	۰	۰	۱	۰	has-miR-582-3p



جدول ۱۳. miRNA های انتخاب شده جهت بررسی میزان بیان در افراد مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن

شماره شناسایی	miRNA	نام ژن
MI0001446	has-miR-424	BAFF
MI0003138	has-miR-497	
MI0000461	has-miR-145-5p	APRIL
MI0000482	has-miR-185-5p	



به امتیازدهی در نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی انتخاب و معرفی شدند. در این راستا از مجموع پنج پایگاه داده مورداستفاده در این مطالعه، اتصال has-miR-145-5p به پروتئین APRIL در پایگاه‌های TargetScan و miRWalk و همچنین اتصال has-miR-185-5p به این پروتئین در پایگاه‌های miRanda و miRDB با بالاترین امتیاز تأیید شد. به علاوه has-miR-424 و has-miR-497 به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن TargetScan، با پیش‌گویی و تأیید در سه نرم‌افزار بیوانفورماتیکی، TargetScan و DIANA از مجموع پنج پایگاه داده مذکور با بالاترین امتیاز انتخاب شدند. با توجه به نقش مهم ژن‌های APRIL و BAFF در روند طبیعی مرگ سلولی و تکامل سلول‌های B به نظر می‌رسد می‌توان از این mi-RNAهای پیش‌گویی‌شده به عنوان بیومارکرهای مولکولی تشخیصی در جهت شناسایی بیماران B-CLL سود جست.

ملاحظات اخلاقی

پیروی از اصول اخلاق پژوهش

این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک با کد IR.ARAKMU.REC.1395.418 تصویب شده است.

حامی مالی

پژوهش حاضر در بردارنده بخشی از طرح تحقیقاتی در دانشگاه علوم پزشکی اراک بوده که هزینه آن به وسیله معاونت تحقیقات و فناوری این دانشگاه تأمین شده است.

مشارکت‌نویسندگان

مفهوم‌سازی: دکتر قاسم مسیبی و دکتر مهدیه موندنی‌زاده؛ تحقیق و بررسی: نیلوفر مرادی، مرضیه امینی، دکتر موندنی‌زاده؛ ویراستاری و نهایی‌سازی: دکتر موندنی‌زاده، نیلوفر مرادی؛ اعتبارسنجی: دکتر بهزاد خوانساری‌نژاد؛ نظارت: دکتر قاسم مسیبی

تعارض منافع

نویسندگان تصریح می‌کنند هیچ‌گونه تضاد منافی در خصوص پژوهش حاضر نداشتند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان کمال قدردانی و امتنان را از این معاونت دارند. همچنین نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در آزمایشگاه میکروبیولوژی مولکولی و ویروس‌شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک و انستیتو پاستور اعلام می‌دارند.

مطالعات پیشین حاکی از دخالت mi-RNAها تقریباً در تمامی مکانیسم‌های فیزیولوژیکی و آسیب‌شناختی هستند. با توجه به توزیع گسترده بیان miRNAs در انسان، برخی از آن‌ها به طور کلی و برخی دیگر در بافت‌ها و یا سلول‌های خاص بیان می‌شوند [۱۸]. بنابراین بر اساس موارد ذکرشده miRNAs به عنوان یک شبکه تنظیمی پیچیده در بسیاری از فرایندهای سلولی نقش ایفا می‌کنند. بدین ترتیب با وجود اثبات بیان نابه‌جای miRNAs در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان‌ها، می‌توان از این عوامل مولکولی به عنوان بیومارکرهای بالقوه هم برای تشخیص و هم به عنوان عوامل درمانی سود جست. لوسمی لنفوسیتی مزمن شایع‌ترین لوسمی در انسان است [۱۹].

مطالعات پیشین نشان داده‌اند پروفایل‌های بیانی miRNAs می‌توانند سلول‌های B طبیعی را از سلول‌های بدخیم CLL تشخیص دهند و با پیش‌آگهی، پیشرفت و مقاومت دارویی مرتبط باشند [۲۰]. به عنوان مثال روسی و کوی به ترتیب در سال‌های ۲۰۱۰ و ۲۰۱۴ اثبات کردند بیماری که دارای میزان بالایی از miR-21 و miR-155 هستند، نسبت به بیماران با میزان بیان پایین‌تر این عوامل مولکولی، خطر مرگ بیشتری دارند [۲۱]. دو پروتئین BAFF و APRIL جزء سوپر خانواده TNF است و از طریق اتصال به گیرنده‌های سلولی خود در روند بقا، تمایز، آپاپتوز و تکامل طبیعی لنفوسیت‌های B ایفای نقش می‌کند [۲۲]. بنابراین به نظر می‌رسد با پیش‌گویی miRNAهای هدف گیرنده ژن‌های BAFF و APRIL می‌توان در تشخیص و درمان B-CLL گام‌های مؤثرتری برداشت. بدین ترتیب برای اولین بار در مطالعه حاضر با استفاده از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی miRanda، TargetScan، miRWalk، DIANA و da، miRDB به بررسی و پیش‌گویی miRNAs پردها پرداخته شد و در نهایت has-miR-145-5p و has-miR-185-5p به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL و همچنین has-miR-424 و has-miR-497 به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF معرفی و برای فاز مطالعات عملی آینده منتخب شدند.

از آنجایی که براساس بررسی‌های انجام‌شده مطالعه اختصاصی و مشخصی در رابطه با نقش has-miR-145-5p و has-miR-185-5p به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن APRIL و همچنین has-miR-424 و has-miR-497 به عنوان miRNAهای هدف گیرنده ژن BAFF در پیشرفت سرطان B-CLL مشاهده نشده است، مطالعه حاضر به عنوان اولین مطالعه، امکان معرفی و بررسی miRNAها و ژن‌های جدید در کمک به تشخیص مبتلایان به این سرطان را فراهم می‌آورد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه برای اولین بار has-miR-145-5p و has-miR-185-5p بر اساس احتمال اتصال مؤثرتر با ژن APRIL با توجه

References

- [1] Ghia P, Stamatopoulos K, Belessi C, Moreno C, Stigenbauer S, Stevenson F, et al. ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2007; 21(1):1-3 [DOI:10.1038/sj.leu.2404457] [PMID]
- [2] Gribben JG, O'Brien S. Update on therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011; 29(5):544-50. [DOI:10.1200/JCO.2010.32.3865] [PMID] [PMCID]
- [3] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *Cancer J Clin*. 2010; 60(5):277-300. [DOI:10.3322/caac.20073] [PMID]
- [4] Landgren O, Albitar M, Ma W, Abbasi F, Hayes RB, Ghia P, et al. B-cell clones as early markers for chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2009; 360(7):659-67. [DOI:10.1056/NEJMoa0806122] [PMID]
- [5] Alsagaby SA, Brennan P, Pepper C. Key molecular drivers of chronic lymphocytic leukemia. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk*. 2016; 16(11):593-606. [DOI:10.1016/j.clml.2016.08.008] [PMID]
- [6] Döhner H, Stilgenbauer S, Benner A, Leupolt E, Kröber A, Bullinger L, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000; 343(26):1910-6. [DOI:10.1056/NEJM200012283432602] [PMID]
- [7] Boyd RS, Dyer MJ, Cain K. Proteomic analysis of B-cell malignancies. *J proteomics*. 2010; 73(10):1804-22. [DOI:10.1016/j.jprot.2010.03.010] [PMID]
- [8] Zanesi N, Balatti V, Bottoni A, M Croce C, Pekarsky Y. Novel insights in molecular mechanisms of CLL. *Curr Pharm Des*. 2012; 18(23):3363-72. [DOI:10.2174/138161212801227104] [PMID]
- [9] Planelles L, Carvalho-Pinto CE, Hardenberg G, Smaniotto S, Savino W, Gómez-Caro R, et al. APRIL promotes B-1 cell-associated neoplasms. *Cancer Cell*. 2004; 6(4):399-408. [DOI:10.1016/j.ccr.2004.08.033] [PMID]
- [10] Shu HB, Hu WH, Johnson H. TALL-1 is a novel member of the TNF family that is down-regulated by mitogens. *J Leukoc Biol*. 1999; 65(5):680-3. [DOI:10.1002/jlb.65.5.680] [PMID]
- [11] Kern C, Cornuel J-F, Billard C, Tang R, Rouillard D, Stenou V, et al. Involvement of BAFF and APRIL in the resistance to apoptosis of B-CLL through an autocrine pathway. *Blood*. 2004; 103(2):679-88. [DOI:10.1182/blood-2003-02-0540] [PMID]
- [12] Krappmann D, Vincendeau M, editors. Mechanisms of NF- κ B deregulation in lymphoid malignancies. *Semin Cancer Biol*. 2016; 39:3-14. [DOI:10.1016/j.semcancer.2016.05.002] [PMID]
- [13] Jansson MD, Lund AH. MicroRNA and cancer. *Mol Oncol*. 2012; 6(6):590-610. [DOI:10.1016/j.molonc.2012.09.006] [PMID] [PMCID]
- [14] Mondanizadeh M, Mosayebi M, Arefian E, Saidijam M, Khansarinejad B. Bioinformatic evaluation of the miR-124 effect on transcription factors involved in neogenesis process. *Arak Med Univ J*. 2014; 17(2):73-81. [DOI:10.4264/numa.73.81]
- [15] Lu YC, Chen YJ, Wang HM, Tsai CY, Chen WH, Huang YC, et al. Oncogenic function and early detection potential of miRNA-10b in oral cancer as identified by microRNA profiling. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2012; 5(4):665-74. [DOI:10.1158/1940-6207.CAPR-11-0358] [PMID]
- [16] Moradi N, Paryan M, Khansarinejad B, Rafiei M, Mondanizadeh M. Bioinformatic prediction of miRNAs targeting Notch1 and Hbx genes in chronic hepatitis B-induced hepatocellular carcinoma. *Arak Med Univ J*. 2017; 19(117):89-101.
- [17] Akhtar MM, Micolucci L, Islam MS, Olivieri F, Procopio AD. Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44(1):24-44. [DOI:10.1093/nar/gkv1221] [PMID] [PMCID]
- [18] Geng LY, Wang X. [Research progress of microRNA in chronic lymphocytic leukemia (Chinese)]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2014; 22(1):255-8. [PMID]
- [19] Balatti V, Acunzo M, Pekarky Y, Croce CM. Novel mechanisms of regulation of miRNAs in CLL. *Trends Cancer*. 2016; 2(3):134-43. [DOI:10.1016/j.trecan.2016.02.005] [PMID] [PMCID]
- [20] Mirzaei H, Fathollahzadeh S, Khanmohammadi R, Darijani M, Momeni F, Masoudifar A, et al. State of the art in microRNA as diagnostic and therapeutic biomarkers in chronic lymphocytic leukemia. *J Cell Physiol*. 2018; 233(2):888-900. [DOI:10.1002/jcp.25799] [PMID]
- [21] Rossi S, Shimizu M, Barbarotto E, Nicoloso MS, Dimitri F, Sampath D, et al. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*. 2010; 116(6):945-52. [DOI:10.1182/blood-2010-01-263889] [PMID] [PMCID]
- [22] Cui B, Chen L, Zhang S, Mraz M, Fecteau JF, Yu J, et al. MicroRNA-155 influences B-cell receptor signaling and associates with aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2014; 124(4):546-54. [DOI:10.1182/blood-2014-03-559690] [PMID] [PMCID]
- [23] Endo T, Nishio M, Enzler T, Cottam HB, Fukuda T, James DF, et al. BAFF and APRIL support chronic lymphocytic leukemia B-cell survival through activation of the canonical NF- κ B pathway. *Blood*. 2007; 109(2):703-10. [DOI:10.1182/blood-2006-06-027755] [PMID]