

بیماری هموفیلی A: شناسایی و پیشگویی میکروRNA جدید

حلیمه رضائی^۱، مجید متولی باشی^{۱*} و سید جواد مولی^۲

^۱ ایران، اصفهان، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست‌شناسی

^۲ ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه زیست‌شناسی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۰۴/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۷/۰۷

چکیده

جهش‌های متنوعی در لکوس فاکتور VIII منجر به ایجاد اختلال خونریزی وابسته به X در هموفیلی A می‌شود. یکی از دلایل اصلی در درمان‌های ناکارآمد برای بیماری هموفیلی A، عدم وجود روشی حساس و اختصاصی به منظور تشخیص به موقع می‌باشد. میکروRNAها به علت داشتن پایداری در مایعات بدن و توانایی بالا در شناسایی، می‌توانند به‌عنوان نشانگرهای زیستی در تشخیص و پیش‌بینی مورد استفاده قرار گیرند. همچنین ارتباطی بین تغییر سطوح بیانی میکروRNAها با آغاز و پیشرفت هموفیلی A گزارش شده است. هدف مطالعه حاضر شناسایی و پیشگویی میکروRNA جدید و معرفی آن به‌عنوان تنظیم‌کننده ژن FVIII می‌باشد. توانایی بیان میکروRNA جدید در لکوس FVIII از طریق پایگاه‌های اطلاعاتی معتبر از قبیل SSCProfiler، miRBase، miREval، miRFIND، MaturBayes، FOMmiR، miRDeep2، miRDeep3، miRDeep4، miRDeep4a، miRDeep4b، miRDeep4c، miRDeep4d، miRDeep4e، miRDeep4f، miRDeep4g، miRDeep4h، miRDeep4i، miRDeep4j، miRDeep4k، miRDeep4l، miRDeep4m، miRDeep4n، miRDeep4o، miRDeep4p، miRDeep4q، miRDeep4r، miRDeep4s، miRDeep4t، miRDeep4u، miRDeep4v، miRDeep4w، miRDeep4x، miRDeep4y، miRDeep4z، miRDeep4aa، miRDeep4ab، miRDeep4ac، miRDeep4ad، miRDeep4ae، miRDeep4af، miRDeep4ag، miRDeep4ah، miRDeep4ai، miRDeep4aj، miRDeep4ak، miRDeep4al، miRDeep4am، miRDeep4an، miRDeep4ao، miRDeep4ap، miRDeep4aq، miRDeep4ar، miRDeep4as، miRDeep4at، miRDeep4au، miRDeep4av، miRDeep4aw، miRDeep4ax، miRDeep4ay، miRDeep4az، miRDeep4ba، miRDeep4bb، miRDeep4bc، miRDeep4bd، miRDeep4be، miRDeep4bf، miRDeep4bg، miRDeep4bh، miRDeep4bi، miRDeep4bj، miRDeep4bk، miRDeep4bl، miRDeep4bm، miRDeep4bn، miRDeep4bo، miRDeep4bp، miRDeep4bq، miRDeep4br، miRDeep4bs، miRDeep4bt، miRDeep4bu، miRDeep4bv، miRDeep4bw، miRDeep4bx، miRDeep4by، miRDeep4bz، miRDeep4ca، miRDeep4cb، miRDeep4cc، miRDeep4cd، miRDeep4ce، miRDeep4cf، miRDeep4cg، miRDeep4ch، miRDeep4ci، miRDeep4cj، miRDeep4ck، miRDeep4cl، miRDeep4cm، miRDeep4cn، miRDeep4co، miRDeep4cp، miRDeep4cq، miRDeep4cr، miRDeep4cs، miRDeep4ct، miRDeep4cu، miRDeep4cv، miRDeep4cw، miRDeep4cx، miRDeep4cy، miRDeep4cz، miRDeep4da، miRDeep4db، miRDeep4dc، miRDeep4dd، miRDeep4de، miRDeep4df، miRDeep4dg، miRDeep4dh، miRDeep4di، miRDeep4dj، miRDeep4dk، miRDeep4dl، miRDeep4dm، miRDeep4dn، miRDeep4do، miRDeep4dp، miRDeep4dq، miRDeep4dr، miRDeep4ds، miRDeep4dt، miRDeep4du، miRDeep4dv، miRDeep4dw، miRDeep4dx، miRDeep4dy، miRDeep4dz، miRDeep4ea، miRDeep4eb، miRDeep4ec، miRDeep4ed، miRDeep4ee، miRDeep4ef، miRDeep4eg، miRDeep4eh، miRDeep4ei، miRDeep4ej، miRDeep4ek، miRDeep4el، miRDeep4em، miRDeep4en، miRDeep4eo، miRDeep4ep، miRDeep4eq، miRDeep4er، miRDeep4es، miRDeep4et، miRDeep4eu، miRDeep4ev، miRDeep4ew، miRDeep4ex، miRDeep4ey، miRDeep4ez، miRDeep4fa، miRDeep4fb، miRDeep4fc، miRDeep4fd، miRDeep4fe، miRDeep4ff، miRDeep4fg، miRDeep4fh، miRDeep4fi، miRDeep4fj، miRDeep4fk، miRDeep4fl، miRDeep4fm، miRDeep4fn، miRDeep4fo، miRDeep4fp، miRDeep4fq، miRDeep4fr، miRDeep4fs، miRDeep4ft، miRDeep4fu، miRDeep4fv، miRDeep4fw، miRDeep4fx، miRDeep4fy، miRDeep4fz، miRDeep4ga، miRDeep4gb، miRDeep4gc، miRDeep4gd، miRDeep4ge، miRDeep4gf، miRDeep4gg، miRDeep4gh، miRDeep4gi، miRDeep4gj، miRDeep4gk، miRDeep4gl، miRDeep4gm، miRDeep4gn، miRDeep4go، miRDeep4gp، miRDeep4gq، miRDeep4gr، miRDeep4gs، miRDeep4gt، miRDeep4gu، miRDeep4gv، miRDeep4gw، miRDeep4gx، miRDeep4gy، miRDeep4gz، miRDeep4ha، miRDeep4hb، miRDeep4hc، miRDeep4hd، miRDeep4he، miRDeep4hf، miRDeep4hg، miRDeep4hi، miRDeep4hj، miRDeep4hk، miRDeep4hl، miRDeep4hm، miRDeep4hn، miRDeep4ho، miRDeep4hp، miRDeep4hq، miRDeep4hr، miRDeep4hs، miRDeep4ht، miRDeep4hu، miRDeep4hv، miRDeep4hw، miRDeep4hx، miRDeep4hy، miRDeep4hz، miRDeep4ia، miRDeep4ib، miRDeep4ic، miRDeep4id، miRDeep4ie، miRDeep4if، miRDeep4ig، miRDeep4ih، miRDeep4ii، miRDeep4ij، miRDeep4ik، miRDeep4il، miRDeep4im، miRDeep4in، miRDeep4io، miRDeep4ip، miRDeep4iq، miRDeep4ir، miRDeep4is، miRDeep4it، miRDeep4iu، miRDeep4iv، miRDeep4iw، miRDeep4ix، miRDeep4iy، miRDeep4iz، miRDeep4ja، miRDeep4jb، miRDeep4jc، miRDeep4jd، miRDeep4je، miRDeep4jf، miRDeep4jg، miRDeep4jh، miRDeep4ji، miRDeep4jj، miRDeep4jk، miRDeep4jl، miRDeep4jm، miRDeep4jn، miRDeep4jo، miRDeep4jp، miRDeep4jq، miRDeep4jr، miRDeep4js، miRDeep4jt، miRDeep4ju، miRDeep4jv، miRDeep4jw، miRDeep4jx، miRDeep4jy، miRDeep4jz، miRDeep4ka، miRDeep4kb، miRDeep4kc، miRDeep4kd، miRDeep4ke، miRDeep4kf، miRDeep4kg، miRDeep4kh، miRDeep4ki، miRDeep4kj، miRDeep4kk، miRDeep4kl، miRDeep4km، miRDeep4kn، miRDeep4ko، miRDeep4kp، miRDeep4kq، miRDeep4kr، miRDeep4ks، miRDeep4kt، miRDeep4ku، miRDeep4kv، miRDeep4kw، miRDeep4kx، miRDeep4ky، miRDeep4kz، miRDeep4la، miRDeep4lb، miRDeep4lc، miRDeep4ld، miRDeep4le، miRDeep4lf، miRDeep4lg، miRDeep4lh، miRDeep4li، miRDeep4lj، miRDeep4lk، miRDeep4ll، miRDeep4lm، miRDeep4ln، miRDeep4lo، miRDeep4lp، miRDeep4lq، miRDeep4lr، miRDeep4ls، miRDeep4lt، miRDeep4lu، miRDeep4lv، miRDeep4lw، miRDeep4lx، miRDeep4ly، miRDeep4lz، miRDeep4ma، miRDeep4mb، miRDeep4mc، miRDeep4md، miRDeep4me، miRDeep4mf، miRDeep4mg، miRDeep4mh، miRDeep4mi، miRDeep4mj، miRDeep4mk، miRDeep4ml، miRDeep4mm، miRDeep4mn، miRDeep4mo، miRDeep4mp، miRDeep4mq، miRDeep4mr، miRDeep4ms، miRDeep4mt، miRDeep4mu، miRDeep4mv، miRDeep4mw، miRDeep4mx، miRDeep4my، miRDeep4mz، miRDeep4na، miRDeep4nb، miRDeep4nc، miRDeep4nd، miRDeep4ne، miRDeep4nf، miRDeep4ng، miRDeep4nh، miRDeep4ni، miRDeep4nj، miRDeep4nk، miRDeep4nl، miRDeep4nm، miRDeep4nn، miRDeep4no، miRDeep4np، miRDeep4nq، miRDeep4nr، miRDeep4ns، miRDeep4nt، miRDeep4nu، miRDeep4nv، miRDeep4nw، miRDeep4nx، miRDeep4ny، miRDeep4nz، miRDeep4oa، miRDeep4ob، miRDeep4oc، miRDeep4od، miRDeep4oe، miRDeep4of، miRDeep4og، miRDeep4oh، miRDeep4oi، miRDeep4oj، miRDeep4ok، miRDeep4ol، miRDeep4om، miRDeep4on، miRDeep4oo، miRDeep4op، miRDeep4oq، miRDeep4or، miRDeep4os، miRDeep4ot، miRDeep4ou، miRDeep4ov، miRDeep4ow، miRDeep4ox، miRDeep4oy، miRDeep4oz، miRDeep4pa، miRDeep4pb، miRDeep4pc، miRDeep4pd، miRDeep4pe، miRDeep4pf، miRDeep4pg، miRDeep4ph، miRDeep4pi، miRDeep4pj، miRDeep4pk، miRDeep4pl، miRDeep4pm، miRDeep4pn، miRDeep4po، miRDeep4pp، miRDeep4pq، miRDeep4pr، miRDeep4ps، miRDeep4pt، miRDeep4pu، miRDeep4pv، miRDeep4pw، miRDeep4px، miRDeep4py، miRDeep4pz، miRDeep4qa، miRDeep4qb، miRDeep4qc، miRDeep4qd، miRDeep4qe، miRDeep4qf، miRDeep4qg، miRDeep4qh، miRDeep4qi، miRDeep4qj، miRDeep4qk، miRDeep4ql، miRDeep4qm، miRDeep4qn، miRDeep4qo، miRDeep4qp، miRDeep4qq، miRDeep4qr، miRDeep4qs، miRDeep4qt، miRDeep4qu، miRDeep4qv، miRDeep4qw، miRDeep4qx، miRDeep4qy، miRDeep4qz، miRDeep4ra، miRDeep4rb، miRDeep4rc، miRDeep4rd، miRDeep4re، miRDeep4rf، miRDeep4rg، miRDeep4rh، miRDeep4ri، miRDeep4rj، miRDeep4rk، miRDeep4rl، miRDeep4rm، miRDeep4rn، miRDeep4ro، miRDeep4rp، miRDeep4rq، miRDeep4rr، miRDeep4rs، miRDeep4rt، miRDeep4ru، miRDeep4rv، miRDeep4rw، miRDeep4rx، miRDeep4ry، miRDeep4rz، miRDeep4sa، miRDeep4sb، miRDeep4sc، miRDeep4sd، miRDeep4se، miRDeep4sf، miRDeep4sg، miRDeep4sh، miRDeep4si، miRDeep4sj، miRDeep4sk، miRDeep4sl، miRDeep4sm، miRDeep4sn، miRDeep4so، miRDeep4sp، miRDeep4sq، miRDeep4sr، miRDeep4ss، miRDeep4st، miRDeep4su، miRDeep4sv، miRDeep4sw، miRDeep4sx، miRDeep4sy، miRDeep4sz، miRDeep4ta، miRDeep4tb، miRDeep4tc، miRDeep4td، miRDeep4te، miRDeep4tf، miRDeep4tg، miRDeep4th، miRDeep4ti، miRDeep4tj، miRDeep4tk، miRDeep4tl، miRDeep4tm، miRDeep4tn، miRDeep4to، miRDeep4tp، miRDeep4tq، miRDeep4tr، miRDeep4ts، miRDeep4tt، miRDeep4tu، miRDeep4tv، miRDeep4tw، miRDeep4tx، miRDeep4ty، miRDeep4tz، miRDeep4ua، miRDeep4ub، miRDeep4uc، miRDeep4ud، miRDeep4ue، miRDeep4uf، miRDeep4ug، miRDeep4uh، miRDeep4ui، miRDeep4uj، miRDeep4uk، miRDeep4ul، miRDeep4um، miRDeep4un، miRDeep4uo، miRDeep4up، miRDeep4uq، miRDeep4ur، miRDeep4us، miRDeep4ut، miRDeep4uu، miRDeep4uv، miRDeep4uw، miRDeep4ux، miRDeep4uy، miRDeep4uz، miRDeep4va، miRDeep4vb، miRDeep4vc، miRDeep4vd، miRDeep4ve، miRDeep4vf، miRDeep4vg، miRDeep4vh، miRDeep4vi، miRDeep4vj، miRDeep4vk، miRDeep4vl، miRDeep4vm، miRDeep4vn، miRDeep4vo، miRDeep4vp، miRDeep4vq، miRDeep4vr، miRDeep4vs، miRDeep4vt، miRDeep4vu، miRDeep4vv، miRDeep4vw، miRDeep4vx، miRDeep4vy، miRDeep4vz، miRDeep4wa، miRDeep4wb، miRDeep4wc، miRDeep4wd، miRDeep4we، miRDeep4wf، miRDeep4wg، miRDeep4wh، miRDeep4wi، miRDeep4wj، miRDeep4wk، miRDeep4wl، miRDeep4wm، miRDeep4wn، miRDeep4wo، miRDeep4wp، miRDeep4wq، miRDeep4wr، miRDeep4ws، miRDeep4wt، miRDeep4wu، miRDeep4wv، miRDeep4ww، miRDeep4wx، miRDeep4wy، miRDeep4wz، miRDeep4xa، miRDeep4xb، miRDeep4xc، miRDeep4xd، miRDeep4xe، miRDeep4xf، miRDeep4xg، miRDeep4xh، miRDeep4xi، miRDeep4xj، miRDeep4xk، miRDeep4xl، miRDeep4xm، miRDeep4xn، miRDeep4xo، miRDeep4xp، miRDeep4xq، miRDeep4xr، miRDeep4xs، miRDeep4xt، miRDeep4xu، miRDeep4xv، miRDeep4xw، miRDeep4xx، miRDeep4xy، miRDeep4xz، miRDeep4ya، miRDeep4yb، miRDeep4yc، miRDeep4yd، miRDeep4ye، miRDeep4yf، miRDeep4yg، miRDeep4yh، miRDeep4yi، miRDeep4yj، miRDeep4yk، miRDeep4yl، miRDeep4ym، miRDeep4yn، miRDeep4yo، miRDeep4yp، miRDeep4yq، miRDeep4yr، miRDeep4ys، miRDeep4yt، miRDeep4yu، miRDeep4yv، miRDeep4yw، miRDeep4yx، miRDeep4yy، miRDeep4yz، miRDeep4za، miRDeep4zb، miRDeep4zc، miRDeep4zd، miRDeep4ze، miRDeep4zf، miRDeep4zg، miRDeep4zh، miRDeep4zi، miRDeep4zj، miRDeep4zk، miRDeep4zl، miRDeep4zm، miRDeep4zn، miRDeep4zo، miRDeep4zp، miRDeep4zq، miRDeep4zr، miRDeep4zs، miRDeep4zt، miRDeep4zu، miRDeep4zv، miRDeep4zw، miRDeep4zx، miRDeep4zy، miRDeep4zz

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، نشانگر زیستی، هموفیلی A، میکروRNA

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۱۳۷۹۳۲۲۷۴، پست الکترونیکی: mbashi@sci.ui.ac.ir

مقدمه

فاکتور VIII یک پروتئین پلاسمایی ضروری در سیستم انعقادی خون بوده که با اتصال به فاکتور وان ویلبرند (Von Willebrand Factor)، در آبشار انعقادی خون به حالت غیرفعال تبدیل می‌گردد. فاکتور VIII غیر فعال در پاسخ به آسیب فعال گشته (FVIIIa) و پس از جدا شدن از فاکتور وان ویلبرند با فاکتور انعقادی FIX میانکنش داده و توسط تنظیم واکنش‌های شیمیایی دیگر، منجر به انعقاد خون می‌شود (۱۹).

ژن فاکتور ۸ (F8) در موقعیت کروموزومی Xq28 قرار گرفته و کدکننده پروتئین FVIII می‌باشد. این ژن با طول تقریبی ۱۸۶kb شامل ۲۶ اگزون بوده که دو واریانت

هموفیلی A با الگوی توارث وابسته به X مغلوب، شدیدترین ناهنجاری خونی ارثی به شمار می‌آید. این بیماری در نتیجه نقص کمی یا کیفی پروتئین پلاسمایی درگیر در هموستازیس (Hemostasis) به نام فاکتور VIII ایجاد گشته که با فراوانی یک در ۵۰۰۰-۱۰۰۰۰ تولدهای زنده در افراد مذکر گزارش شده است (۱۱). بر اساس میزان عملکرد طبیعی فاکتور VIII می‌توان هموفیلی A را به سه سطح، خفیف (۲۵-۵٪)، متوسط (۵-۱٪) و شدید (<۱٪) تقسیم بندی کرد. میزان شیوع حالت‌های خفیف، متوسط و شدید به ترتیب ۵۰٪، ۱۰٪ و ۴۰٪ می‌باشد.

انواعی از سرطان‌ها و بیماری‌ها نقش دارند. بررسی پروفایل بیانی میکروRNAها در بدن نشان می‌دهد که الگوی بیان میکروRNAها در بافت‌ها بصورت اختصاصی بوده و به عنوان شاخص‌های زیستی (Biomarkers) در تشخیص و درمان مورد توجه قرار گرفته‌اند. از اینرو علاوه بر میکروRNAهای شناخته و ثبت شده، پیشگویی و تعیین قسمت‌هایی از ژنوم که مستعد بیان میکروRNAهای جدید هستند، یک زمینه جذاب برای مطالعات مولکولی در مورد میکروRNAها ایجاد کرده که با ابزارهای بیوانفورماتیکی و روش‌های مولکولی آزمایشگاهی امکان پذیر می‌باشد (۹).

با توجه به اینکه بیماری هموفیلی A یک اختلال تک‌ژنی بوده و از طرفی بیشتر میکروRNAهای شناخته و ثبت شده درون ژن‌های انسانی بر سطوح بیانی ژن کد کننده خود تاثیر می‌گذارند (۱۶)، هدف از این مطالعه جستجوی ناحیه ژنی *F8* به منظور شناسایی و پیشگویی توالی‌های کاندید برای بیان و تولید میکروRNAهای بالغ جدید می‌باشد که از این طریق بتوان بیماری هموفیلی A را شناسایی و پیشرفت آن را کنترل کرد.

مواد و روشها

الگوریتم‌های مورد استفاده در پایگاه‌ها و نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی که در زمینه شناسایی و پیشگویی میکروRNAهای جدید به‌کار گرفته می‌شوند، ابتدا بر اساس توالی میکروRNAهای شناخته و ثبت شده، مشخص می‌گردند. سپس از این برنامه‌ها به منظور اسکن ژنوم و تشخیص توالی میکروRNAهای جدید احتمالی استفاده می‌شود. به بیان دیگر، گردآوری، مطالعه و کنار هم قرار دادن حجم بالای اطلاعات مربوط به میکروRNAهای شناخته و ثبت شده، منجر به آشکار شدن ویژگی‌های مشابه مانند طول ساختار ساقه-حلقه (Stem loop)، طول ساقه، پایداری ترمودینامیکی، جفت‌بازها، اندازه برآمدگی (Bulge)، جایگاه برآمدگی، محتوای نوکلئوتیدی، پیچیدگی توالی و عناصر تکراری شده است که در ژن‌های کد کننده

رونویسی متفاوت ایزوفرم a و ایزوفرم b را ایجاد می‌کند. گوناگونی زیادی از جهش‌ها در ژن *F8* مشاهده شده است. وارونگی (Inversion) در اینترون ۲۲ (مسئول تقریباً نیمی از موارد هموفیلی A شدید)، وارونگی در اینترون ۱ (مسئول ۱-۴٪ از موارد هموفیلی A شدید)، بیش از ۱۲۰ حذف بزرگ (>۵۰bp)، جایگزینی‌ها و حذف‌های کوچک، برخی از جهش‌های گزارش شده در ژن *F8* می‌باشند. تا کنون، بیش از ۱۰۰۰ جهش در پایگاه داده جهانی هموفیلی به نام HAMSTeRs به ثبت رسیده است (۲۱).

میکروریبونوکلئیک اسیدها (microRNAs)، RNAهای کوتاه غیرکد کننده‌ای هستند که دارای طولی برابر ۲۵-۱۸ نوکلئوتید می‌باشند. میکروRNAها از نظر تکاملی محافظت شده بوده و عمدتاً به عنوان تنظیم کننده‌های بیان ژن بصورت پس-رونویسی (post-transcription) عمل می‌کنند (۳). مسیر بیورژن و بلوغ میکروRNAها به این صورت است که یک رونوشت از میکروRNA اولیه (pri-miRNA) از DNA سلول کد شده و در هسته، رونویسی می‌شود. سپس توسط آنزیم دروشا (Drosha) پردازش شده و میکروRNA پیش ساز (pre-miRNA) به سیتوپلاسم منتقل می‌گردد. در سیتوپلاسم بوسیله آنزیم دایسر (Dicer) تحت پردازش بیشتر قرار گرفته و در نهایت میکروRNA بالغ موجود در کمپلکس RISC (RNA Interference Silencing Complex) با اتصال به مولکول mRNA هدف سبب تجزیه رونوشت یا توقف ترجمه می‌شود (۴ و ۵).

از آنجا که یک میکروRNA منفرد می‌تواند چند صد ژن را هدف قرار دهد، اعتقاد بر این است که تقریباً ۶۰ درصد از تمام ژن‌های انسانی، اهداف تنظیمی توسط میکروRNAها هستند. به علاوه یک ژن هدف منفرد اغلب دارای جایگاه‌های اتصال برای چندین میکروRNA بوده که این امر به میکروRNAها کمک می‌کند تا یک شبکه کنترل تنظیمی پیچیده را تشکیل دهند. میکروRNAها در فرایندهای مختلف زیستی دخیل هستند و علاوه بر این در پاتوژنز

تا قابلیت این ساختارها برای هدایت میکروRNAها در فرایند بلوغ و تکامل (Mature miRNAs)، بررسی شود (۲۵). از طرف دیگر پایگاه MaturBayes یک ابزار شناسایی میکروRNA بالغ درون ساختارهای ساقه-حلقه به روش تقسیم بندی Nalve Bays می‌باشد. همچنین با استفاده از پایگاه miRFIND (<http://140.120.14.132:8080/MicroRNAProject-Web>) عملکرد آنزیم‌های دروشا و دایسر با توجه به توالی ساختارهای ساقه-حلقه مورد تحلیل بیشتر قرار گرفت (۱۴).

از طرفی حفاظت‌شدگی توالی ساختارهای ساقه-حلقه کاندید شده در ژنوم مهره‌داران با استفاده از پایگاه genome UCSC browser (<https://genome.ucsc.edu>) مطالعه شد. اطلاعات سطوح بیانی RNAهای کوچک (واجد میکروRNAها) نیز در ۱۴ رده مختلف سلول انسانی (Deep Sequencing) در این پایگاه بررسی و احتمال بیان میکروRNA جدید در توالی کاندید شده مورد ارزیابی قرار گرفت. در نهایت به منظور تایید عدم معرفی توالی کاندید به عنوان میکروRNA بالغ توسط سایر مطالعات، از سایت اینترنتی miRBase (<http://www.mirbase.org/>) استفاده شد. در این سایت بیش از ۱۲۰۰۰ میکروRNA بالغ از ۶۰۰ گونه شناخته و ثبت شده است.

نتایج

ژن *F8* مرتبط با بیماری هموفیلی A به منظور شناسایی و پیشگویی ساختارهای ساقه-حلقه کدکننده میکروRNA جدید بررسی شد. در این راستا پایگاه‌های داده و سرورهای بیوانفورماتیکی قوی و با قابلیت اعتمادسازی بالا مورد استفاده قرار گرفت. با توجه به نتایج بدست آمده یک ساختار ساقه-حلقه با توالی

```
TAAGGAAAGGAGGAGAGGGATGGAGAAGT
CAAAGTGAACAGGAGCTTTAATTTGTGCTCC
TATTCCTAGCCTACTCCAACCCTCTTCCTGA
```

میکروRNAها وجود داشته و در پیشگویی آن‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند. در این مطالعه جستجو ساختارهای ساقه-حلقه در ژن *F8* با استفاده از پایگاه SSCprofler (<http://mirna.imbb.forth.gr/SSCprofler.html>) صورت گرفت. اطلاعات این پایگاه بر اساس ویژگی‌های زیستی مانند توالی، ساختار و حفاظت‌شدگی مربوط به میکروRNAهای انسانی ارائه شده است. صحت حساسیت و اختصاصیت عملکردی داده‌های خروجی از پایگاه SSCprofler به ترتیب ۸۸/۹۵٪ و ۸۴/۱۶٪ می‌باشد (۲۲).

به منظور بررسی بیشتر ساختارهای ساقه-حلقه ارائه شده از پایگاه SSCprofler و پایداری آن‌ها، از سرور اینترنتی RNAFold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>) استفاده شد. سرور RNAFold با در نظر گرفتن بیشترین تشکیل جفت‌بازها در ساختارهای ساقه-حلقه و محاسبات انرژی به شیوه استاندارد شده توسط Studnika و همکاران، عمل می‌کند (۳۰).

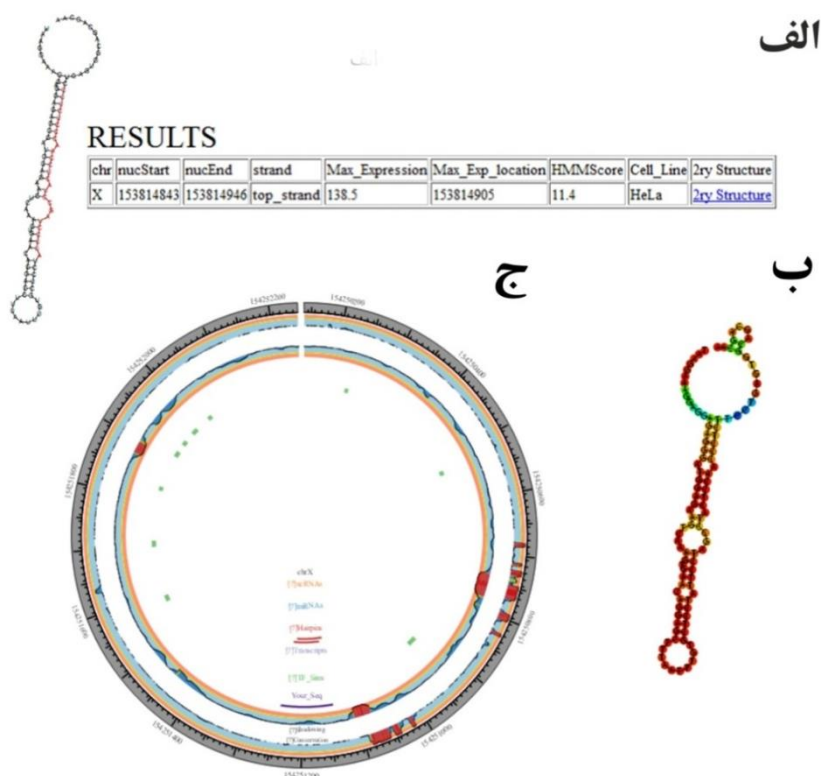
از سه پایگاه اینترنتی، miREval (<http://mimirna.centenary.org.au/mireval>)، FOMmiR (<http://app.shenwei.me/cgi-bin/FOMmiR.cgi>) و MaturBayes (<http://mirna.imbb.forth.gr/MatureBayes.html>) برای ارزیابی صحت ساختارهای ساقه-حلقه پیشگویی شده، استفاده گردید. پایگاه miREval ماشین شاخص محوری (SVM= Support Vecotr Machine) را بکار می‌گیرد که در طراحی آن ۵۷ ویژگی میکروRNAهای بالغ شناخته و ثبت شده، لحاظ گشته است. دو دسته اطلاعاتی مثبت و منفی برای این SVM وجود داشته که پایگاه miREval را قادر می‌سازد تا میان ساختارهای ساقه-حلقه مربوط به میکروRNA و سایر RNAهای کوتاه غیرکدکننده تمایز قائل شود (۱۰). پایگاه FOMmiR با در نظر گرفتن کدهای چهارگانه موجود در توالی ساختارهای ساقه-حلقه مرتبط با عملکرد برش آنزیم‌های دروشا و دایسر، باعث می‌گردد

سرور اینترنتی **RNAFold**: در این سرور، توالی ساختار ساقه-حلقه کاندید شده از پایگاه **SSCprofiler** وارد شد تا مطالعات دقیق‌تری بر روی پایداری ساختار ثانویه آن انجام گردد. میزان پایداری ساختار ثانویه کاندید شده با توجه به کمینه انرژی آزاد (MFE) که در این سرور به هر ساختاری اختصاص داده می‌شود، بررسی گردید (شکل ۱-ب). MFE برای ساختار ثانویه کاندید برابر $۳۶/۷$ kcal/mol می‌باشد.

پایگاه **miREval** ارزیابی صحت ساختار ساقه-حلقه کاندید شده از طریق پایگاه **miREval** مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (شکل ۱-ج).

GTGGCAGCAGCAA واقع در اینترون ۲۲، کاندید و برای مراحل تایید آزمایشگاهی معرفی شد.

پایگاه SSCprofiler: این پایگاه داده، ساختارهای ساقه-حلقه در ژن *F8* را شناسایی و کاندید می‌کند. همچنین بر اساس مشخصه ساختارهای ساقه-حلقه میکروRNAهای شناخته و ثبت شده، می‌تواند به ساختار ساقه-حلقه کاندید این مطالعه یک امتیاز **HMM** دهد. این امتیاز ویژگی‌های توالی، ساختار و حفاظت‌شدگی ژن‌های کدکننده میکروRNA را به طور همزمان در مدل‌های آمار و احتمالات مد نظر قرار داده، به طوریکه هر چه این امتیاز بالاتر بوده، شانس بیشتری وجود دارد که ساختار کاندید معرفی شده متعلق به یک میکروRNA حقیقی باشد (شکل ۱-الف).



شکل ۱- شناسایی و پیشگویی میکروRNA جدید در اینترون ۲۲ ژن *F8* انسانی. توالی ژن *F8* و خواستگاه میکروRNA کاندید ارائه شده است. الف) نتایج پایگاه **SSCprofiler** برای توالی کاندید. ساختار ساقه-حلقه شامل توالی میکروRNA بالغ به رنگ قرمز نشان داده شده است. همچنین امتیاز **HMM** این ساختار در جدول ارائه شده و بیان بیشینه (**Max-Expression**) در رده سلولی هلا مشخص شده است. ب) بررسی ساختار ساقه-حلقه کاندید در سرور اینترنتی **RNAFold**. نتایج ساختار ثانویه از توالی کاندید نشان داده شده است. ج) نتایج پایگاه **miREval**. حدود ۱۰۰۰ جفت باز اطراف توالی کاندید به صورت یک شکل حلقوی با مشخصات ویژه ارائه شده است.

تحلیل قرار گرفت. توالی کاندید در رده‌های سلولی IMR90، IMR90 CIP-Tap و SKMC بیان دارد.

پایگاه **UCSC genome browser**: درصد حفاظت شذگی توالی کاندید در بین ژنوم ۱۰۰ امپره‌دار (شکل ۲-ج) و همچنین **Deep sequencing** (شکل ۳) مورد تجزیه و



شکل ۳- اطلاعات **Deep sequencing**. بیان توالی کاندید به صورت RNAهای کوتاه (شامل میکروRNAها و...) در رده‌های مختلف سلولی IMR90، IMR90 CIP-TAP و SKMC مشاهده می‌شود. با توجه به الگوی بیانی می‌توان اشاره کرد که احتمال حضور میکروRNA بالغ در توالی کاندید مربوط به ژن *F8* افزایش می‌یابد.

افزایش صحت آن، ضروری به نظر می‌رسد. شاخص‌های زیستی مناسب باید پایدار و به طور غیر تهاجمی قابل دسترس بوده و برای بیماری مورد نظر اختصاصی و حساس عمل کنند، از طرفی واجد قابلیت اندازه‌گیری به صورت تکرارپذیر باشند. در سال‌های اخیر، میکروRNAها به عنوان شاخص‌های زیستی در پیش‌آگاهی، تشخیص و درمان مورد توجه قرار گرفته‌اند (۱ و ۲). miR-195 (۱۳)، miR-423-5P (۲۷)، miR-16 (۲۸)، miR-139-5P (۲۰)،

سایت اینترنتی **miRBase** به منظور کسب اطمینان از عدم ثبت شدن توالی کاندید به عنوان میکروRNA بالغ در سایر مطالعات، از سایت **miRBase** استفاده شد.

بحث

امروزه بکارگیری شاخص‌های زیستی در بیماری‌ها و سرطان‌ها به طور گسترده در حال توسعه است. استفاده از شاخص‌های زیستی به منظور سهولت در تشخیص و

الگوریتم‌های محاسباتی روش‌های سریع، کارا و ارزانی را برای شناسایی و پیشگویی توالی‌های کدکننده میکروRNAهای جدید در ژنوم ارائه کرده که این توالی‌ها باید در محیط آزمایشگاهی با بررسی بیان درون‌زاد (Endogenous) فرم بالغ میکروRNA، تایید شوند.

مطالعات V. Kim و همکارانش نشان داد، یک RNA کوچک زمانی به عنوان میکروRNA واقعی (Real miRNA) در نظر گرفته می‌شود که واجد شرایطی باشد: (۱) بیان آن توسط روش‌هایی نظیر PCR بر روی cDNA سنتز شده از RNA کل (Total RNA) و یا آنالیز توسعه پرایمر تایید شود. (۲) توالی RNA کوچک باید در یک بازوی پیش‌ساز ساقه-حلقه ۶۰ تا ۸۰ نوکلئوتیدی قرار داشته و بدون برآمدگی و یا لوپ بزرگ داخلی باشد. (۳) توالی RNA کوچک از لحاظ فیلوژنتیکی حفاظت شده باشد. (۴) با کاهش عملکرد آنزیم پردازش کننده دایسر، میزان پیش‌سازهای میکروRNA افزایش یابد (۱۵). Lim و همکاران با در نظر گرفتن فاکتور حفاظت‌شدگی و همچنین استفاده از پایگاه RNAFold به منظور بررسی ساختار ثانویه و کمینه انرژی آزاد، موفق به شناسایی و پیشگویی پیش‌سازهای میکروRNA شدند که دارای بیشترین شباهت با میکروRNAهای شناخته و ثبت شده می‌باشند. در نهایت با مطالعات بیشتر توانستند حدود ۳۸ میکروRNA جدید انسانی را شناسایی و معرفی کنند (۱۸). از طرفی Li و همکاران براساس تحلیل‌های بیوانفورماتیکی، حدود ۲۴ ژن کدکننده میکروRNA جدید را به طور آزمایشگاهی تایید کردند (۱۷). همچنین Berezikov و همکاران در مطالعه دیگر، تعداد ۶۹ توالی کاندید را با در نظر گرفتن سطح حفاظت‌شدگی ارائه کرده و با استفاده از تکنیک نورترن بلات توانستند بیان ۱۶ میکروRNA بالغ انسانی را تایید و ثبت نمایند (۶). Bentwich و همکاران نیز در یک تحقیق گسترده، با تلفیق پیشگویی‌های بیوانفورماتیکی با تکنیک‌های آزمایشگاهی، حدود ۸۹ میکروRNA جدید انسانی را معرفی کردند. سلطانی و همکاران با استفاده از

miR-182 و miR-187 ((۷)) از جمله میکروRNAهای شناسایی شده‌ای هستند که به عنوان شاخص‌های زیستی در سرطان‌ها استفاده می‌شوند.

مطالعات نشان می‌دهد که اختلال در سطوح بیانی میکروRNAها در شکل‌گیری طیف وسیعی از بیماری‌ها نقش دارد. بنابراین با تغییر بیان میکروRNAها به صورت مصنوعی، می‌توان سطوح بیانی میکروRNAها را به سطح نرمال نزدیک و پیشرفت بیماری را کنترل کرد (۲۶). این مسئله در درمان بیماری‌های قلبی-عروقی مانند بازسازی قلبی-عروقی (۲۹)، تجدید پیام‌رسانی کلسیمی در قلب (۱۲) و ترمیم قلبی پس از انفارکتوس میوکارد (۲۳) استفاده شده است.

بنابراین کشف میکروRNAهای جدید و مرتبط با بیماری می‌تواند امکان استفاده از داروها بر پایه میکروRNAها را افزایش داده و در نهایت منجر به تغییر نگرش درمانی شود. تاکنون بیشتر میکروRNAهای شناسایی شده با روش‌های کلونینگ گسترده RNAها و سپس توالی‌یابی انجام شده است. پروتکل‌های متنوعی بدین منظور توسعه یافته که این پروتکل‌ها در شناسایی اکثر میکروRNAهای گزارش شده، موفق بوده‌اند. تمامی این پروتکل‌ها از قاعده یکسانی پیروی کرده و در جزئیات اجرایی، تفاوت‌هایی دارند. عمده محدودیتی که در زمینه شناسایی میکروRNAها با روش کلونینگ وجود دارد این است که یافتن میکروRNAهایی که سطوح بیانی پایین داشته یا فقط در مرحله‌ای از رشد و تمایز سلول بیان شده و یا محدودیت بیان بافتی دارند، مشکل‌ساز می‌باشد. از طرفی کلون کردن بعضی میکروRNAها به دلیل ویژگی‌های فیزیکی آن‌ها از جمله ترکیب توالی و یا تغییرات پس از ترجمه (ویرایش، متیلاسیون و...) به راحتی صورت نمی‌گیرد. همچنین هزینه و زمان‌بر بودن تکنیک کلونینگ، باعث شده تا این محدودیت‌ها افزایش یابد (۵).

مطالعه از پایگاه‌های اطلاعاتی استفاده شد که از صحت و دقت بالایی برخوردار هستند. امید است که توالی کاندید معرفی شده در بررسی‌های آینده مورد تایید آزمایشگاهی قرار گرفته و به عنوان دارو در درمان بیماران هموفیلی A استفاده شود.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از بخش تحصیلات تکمیلی گروه زیست‌شناسی دانشگاه اصفهان و همچنین دانشگاه تربیت مدرس به‌خاطر فراهم کردن امکانات و تجهیزات مورد نیاز پژوهش کمال تشکر و قدردانی می‌شود.

تضاد منافع

هیچ‌گونه تضاد منافع بین نویسندگان مقاله وجود ندارد.

پایگاه‌های SSCProfiler، UCSC browser genome و چندین پایگاه اطلاعاتی دیگر، توانستند دو میکروRNA جدید در ژن *TrkC* و همچنین *has-miR-6165* در ژن *NGFR* مرتبط با سرطان کلورکتال را شناسایی، پیشگویی و تایید آزمایشگاهی کنند (۷ و ۸) از طرفی با تکنیک‌های مشابه، یک میکروRNA جدید در ژن *PIK3KCA* انسانی با نقش احتمالی در سرطان کلورکتال پیشگویی و تایید شد (۲۴).

با توجه به اینکه بیشتر میکروRNAهای شناخته و ثبت شده درون ژن‌های انسانی بر سطوح بیانی ژن کد کننده خود تاثیر می‌گذارند و از طرفی بیماری هموفیلی A یک اختلال تک‌ژنی می‌باشد، هدف از مطالعه حاضر جستجوی ناحیه ژنی *F8* به منظور شناسایی و پیشگویی توالی‌های کاندید برای بیان و تولید میکروRNAهای بالغ می‌باشد. در این

منابع

- ۱- اله وردی، ع.، نادری منش، ح.، کشاورز، ا. ۱۳۹۸ اصلاح خصوصیات سطح در سیستم میکروفلوئیدی به منظور شناسایی miR-21 و miR-486 در سرطان ریه، مجله زیست‌شناسی ایران. آنلاین.
- ۲- صمدی، ب.، قانلی، ک.، صنعتی، م. ح. ۱۳۹۸ بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2976394 ژن *PSCA* مرتبط با *hsa-miR-3934* ابتلا به سرطان معده، مجله زیست‌شناسی ایران. ۱۳۹۸.
- 3- Bade, r A., Brown, D., Stoudemire, J., Lammers, P., 2011 "Developing therapeutic microRNAs for cancer," *Gene therapy*, vol. 18(12), pp. 1121-6.
- 4- Bentwich, I., Avniel, A., Karov, Y., Aharonov, R., Gilad, S., Barad, O., et al., 2005 "Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs," *Nature genetics*, vol. 37(7), pp. 766-70.
- 5- Berezikov, E., Cuppen, E., Plasterk, R.H., 2006 "Approaches to microRNA discovery," *Nature genetics*, vol. 38, S2-S7.
- 6- Berezikov, E., Guryev, V., Van de Belt, J., Wienholds, E., Plasterk, R.H., Cuppen, E., 2005 "Phylogenetic shadowing and computational identification of human microRNA genes," *Cell*, vol. 120, pp. 21-24.
- 7- Casanova-Salas, I., Rubio-Briones, J., Calatrava, A., Mancarella, C., Masia, E., Casanova, J., et al., 2014 "Identification of miR-187 and miR-182 as biomarkers of early diagnosis and prognosis in patients with prostate cancer treated with radical prostatectomy," *The Journal of urology*, vol. 192, pp. 252-259.
- 8- Dokanehiifard, S., Yasari, A., Najafi, H., Jafarzadeh, M., Nikkha, M., Mowla, S.J., et al., 2017 "A novel microRNA located in the *TrkC* gene regulates the Wnt signaling pathway and is differentially expressed in colorectal cancer specimens," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 292, pp. 7566-7577.
- 9- Fang, W. and Bartel, D.P., 2015 "The menu of features that define primary microRNAs and enable de novo design of microRNA genes," *Molecular cell*, vol. 60(1), pp. 131-45.
- 10- Gao, D., Middleton, R., Rasko, J.E., Ritchie, W., 2013 "miREval 2.0: a web tool for simple microRNA prediction in genome sequences," *Bioinformatics*, vol. 29, pp. 3225-3226.
- 11- Graw, J., Brackmann, H., Oldenburg, J., Schneppenheim, R., Spannagl, M., Schwaab, R., 2005 "Haemophilia A: from mutation analysis to new therapies," *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, pp. 488-501.

- 12- Harada, M., Luo, X., Murohara, T., Yang, B., Dobrev, D., Nattel, S., 2014 "MicroRNA regulation and cardiac calcium signaling," *Circulation research*, vol. 114, pp. 689-705.
- 13- Heneghan, H.M., Miller, N., Kelly, R., Newell, J., Kerin, M.J., 2010 "Systemic miRNA-195 differentiates breast cancer from other malignancies and is a potential biomarker for detecting noninvasive and early stage disease," *Oncologist*, vol. 15, pp. 673-682.
- 14- Jiang, P., Wu, H., Wang, W., Ma, W., Sun, X., Lu, Z., 2007 "MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features," *Nucleic acids research*, vol. 35, pp. 339-344.
- 15- Kim, V.N., 2005 "MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing," *Nature reviews Molecular cell biology*, vol. 6, pp. 376-385.
- 16- Krol, J., Loedige, I., Filipowicz, W., 2010 "The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay," *Nature Reviews Genetics*, vol. 11, pp. 597-610.
- 17- Lai, E.C., Tomancak, P., Williams, R.W., Rubin, G.M., 2003 "Computational identification of Drosophila microRNA genes," *Genome biology*, vol. 4, pp. R42.
- 18- Lim, L.P., Glasner, M.E., Yekta, S., Burge, C.B., Bartel, D.P., 2003 "Vertebrate microRNA genes," *Science*, vol. 299, pp. 1540-1541.
- 19- Mehdizadeh, M., Kardoost, M., Zamani, G., Baghaeepour, M., Sadeghian, K., Pourhoseingholi, M., 2009 "Occurrence of haemophilia in Iran," *Haemophilia*, vol. 15, pp. 348-351.
- 20- Miyoshi, J., Toden, S., Yoshida, K., Toiyama, Y., Alberts, S.R., Kusunoki, M., et al., 2017 "MiR-139-5p as a novel serum biomarker for recurrence and metastasis in colorectal cancer," *Scientific Reports*, vol. 7, pp. 7-10.
- 21- Oldenburg, J., Ananyeva, N., Saenko, E., 2004 "Molecular basis of haemophilia A," *Haemophilia*, vol. 10(s4), pp. 133-9.
- 22- Oulas, A., Boutla, A., Gkirtzou, K., Reczko, M., Kalantidis, K., Poirazi, P., 2010 "Prediction of novel microRNA genes in cancer-associated genomic regions—a combined computational and experimental approach," *Nucleic acids research*, gkp120.
- 23- Sahoo, S. and Losordo, D.W., 2014 "Exosomes and cardiac repair after myocardial infarction," *Circulation research*, vol. 114, pp. 333-344.
- 24- Saleh, A.J., Soltani, B.M., Dokanehiifard, S., Medlej, A., Tavalaei, M., Mowla, S.J., 2016 "Experimental verification of a predicted novel microRNA located in human PIK3CA gene with a potential oncogenic function in colorectal cancer," *Tumor Biology*, vol. 37, pp. 14089-14101.
- 25- Shen, W., Chen, M., Wei, G., Li, Y., 2012 "MicroRNA prediction using a fixed-order Markov model based on the secondary structure pattern," *PloS one*, vol. 7, e48236.
- 26- Taft, R.J., Pang, K.C., Mercer, T.R., Dinger, M., Mattick, J.S., 2010 "Non-coding RNAs: regulators of disease," *Journal of pathology*, vol. 220, pp. 126-139.
- 27- Tijssen, A.J., Creemers, E.E., Moerland, P.D., Windt, L.J., Van der Wal, A.C., Kok, W.E., et al., 2010 "MiR423-5p as a circulating biomarker for heart failure," *Circulation research*, vol. 106, pp. 1035-1039.
- 28- Wang, H., Zhang, P., Chen, W., Feng, D., Jia, Y., Xie, L., 2012 "Evidence for serum miR-15a and miR-16 levels as biomarkers that distinguish sepsis from systemic inflammatory response syndrome in human subjects," *Clinical chemistry and laboratory medicine*, vol. 50, pp. 1423-1428.
- 29- Wu, G., Huang, Z.P., Wang, D.Z., 2013 "MicroRNAs in cardiac regeneration and cardiovascular disease," *Life sciences*, vol. 56, pp. 907.
- 30- Zuker, M., Stiegler, P., 1981 "Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information," *Nucleic acids research*, vol. 9, pp. 133-148.

Hemophilia A disease: Identification and prediction of new microRNA

Rezaei H.¹, Motovali-bashi M.¹ and Mowla S.J.²

¹ Dept. of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, Isfahan, I.R. of Iran.

² Dept. of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran.

Abstract

Various mutations in *factor VIII* locus are led to an X-linked bleeding disorder in hemophilia A. One of the leading causes of inefficient remedy for hemophilia A disease is the lack of specific and sensitive procedure for punctual diagnosis of the disease. miRNAs indicate that they have a great potential as diagnostic and prognostic biomarkers due to their stability in body fluids and their capability to identification. Furthermore, a relationship between alteration in expression levels of miRNAs and onset and progression of the hemophilia A disease has been reported.

Prediction of new miRNAs and nomination as regulators of *FVIII* gene has been considered as the objective of this study. The ability to express new miRNAs in *FVIII* locus was studied via reliable bioinformatic databases such as SSCprofler, RNAfold, miREval, FOMmiR, MaturBayes, miRFIND, UCSC genome browser, Deep Sequencing, and miRBase. Output data of previously mentioned databases were analyzed, and one stem-loop structure was qualified, and the region is predicted to express new miRNA. The presented stem-loop structure can be used as biomarker in diagnosis of the disease and regulation of *factor VIII* gene after subsequent experimental verification.

Key words: Bioinformatic, Biomarker, Hemophilia A, microRNAs.