

Bioinformatic Prediction of Non-Coding Genes related to the Mouse FGF8, NOG, and BMP4 Ectodermal Differentiation Pathway Genes and Mapping of Related Network

Somayeh Moghaddam¹ , Esmail Babaei^{1*} 

¹ Dept of Animal Biology, School of Natural Sciences, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Article Info

Article type:
Research article

Article History:
Received: 08 March 2021
Revised: 05 May 2021
Accepted: 11 October 2021

*** Correspondence to:**
Esmail Babaei
Dept of Animal Biology, School
of Natural Sciences, University of
Tabriz, Tabriz, Iran
Email: babaei@tabrizu.ac.ir

ABSTRACT

Introduction: Long non-coding RNAs (lncRNAs) and miRNAs belong to a class of non-coding RNAs (ncRNAs) that play important roles and functions in the regulation of the expression of genes in main biological processes, such as cell proliferation, apoptosis, and differentiation. lncRNAs can potentially affect miRNAs in the forms of cis/trans to modulate their regulatory role. In this study, mRNA, miRNA, and lncRNA gene networks were predicted by web-based programs for three ectodermal pathway markers (BMP4, NOG, FGF8) in the mouse embryonic stem cells.

Material & Methods: In this theoretical bioinformatics study, the miRNAs of the target genes (BMP4, NOG, and FGF8) were extracted and examined by MirWalk and TARGETSCAN databases to finally obtain the common miRNAs of these three genes. Following that, the target lncRNAs for common miRNAs were then extracted from the DIANA-Tool database.

(Ethic code: 100/21560/2/پ)

Findings: MiRs mmu-miR-92a-2-5p, mmu-miR-129b-5p, mmu-miR-130b-5p, mmu-miR-692, mmu-miR-7009-3P, mmu-miR-7116-3p, and mmu-miR-7689-3p may affect the function of lncRNAs, including Kcnq1ot1, Gm26812, Gm4117, Gm11837, 4930423MO2Rik, Malat1, Gm12594, Gm3414, 5830444B04Rik, Gm2464, and NEAT1.

Discussion & Conclusion: Due to the mutual relationships among lncRNA, miRNA, and mRNA, our results provided a novel perspective on lncRNAs for future research and experimental studies on ectodermal differentiation pathways and molecular mechanisms.



Keywords: Bioinformatics, Biological system, BM4, Ectoderm, FGF8, Non-coding RNAs

➤ How to cite this paper

Moghaddam S, Babaei E. Bioinformatic Prediction of Non-Coding Genes related to the Mouse FGF8, NOG, and BMP4 Ectodermal Differentiation Pathway Genes and Mapping of Related Network. Journal of Ilam University of Medical Sciences. 2022;30(1): 29-41.



پیشگویی بیوانفورماتیکی ژن‌های غیر کدکننده مرتبط با ژن‌های مسیر تمایز اکتودرمی NOG، FGF8، و BMP4 موشی و ترسیم شبکه ارتباطی آنها

سمیه مقدم ، اسماعیل بابایی 

^۱ گروه علوم جانوری، دانشکده علوم طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله: پژوهشی

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۱۸

تاریخ داوری: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۱۹

نویسنده مسئول:

اسماعیل بابایی

گروه علوم جانوری، دانشکده علوم

طبیعی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

Email: babaei@tabrizu.ac.ir

مقدمه: miRNAها و lncRNAها دسته‌ای از RNAهای غیر کدکننده هستند که نقش و عملکردهای مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها و فرایندهای اصلی بیولوژیکی از جمله تکثیر سلولی، آپوپتوز و تمایز دارند. lncRNAها می‌توانند به‌طور بالقوه روی miRNAها، در جهت همسو و یا معکوس بر فعالیتشان تأثیر بگذارند تا از این طریق، نقش تنظیم‌کنندگی آنها را تعدیل کنند. در این مطالعه، شبکه‌های ژنی mRNA-miRNA-lncRNA با استفاده از برنامه‌های آنلاین سه مارکر مسیر اکتودرمی (BMP4,NOG,FGF8) در سلول‌های بنیادی جنینی موشی ترسیم شد.

مواد و روش‌ها: این مطالعه از نوع تئوریکال بیوانفورماتیکی است و miRNAهای هدف ژن‌های BMP4، NOG و FGF8 توسط پایگاه‌های داده‌ای MirWalk و TARGETSCAN استخراج و بررسی گردید تا در نهایت، بتوان miRNAهای مشترک این ۳ ژن را تهیه کرد؛ سپس از پایگاه داده‌ای DIANA-Tools، lncRNAهای هدف برای miRNAهای مشترک به دست آمد.

یافته‌ها: ژن‌های mmu-miR-130b-5p، mmu-miR-129b-5p، mmu-miR-92a-2-5p، mmu-miR-7689-3p و mmu-miR-7116-3p، mmu-miR-7009-3P، 692، lncRNAهای Malat1، Gm11837.4930423MO2Rik، Gm4117، Gm26812، Kcnq1ot1، Gm12594، Gm3414.5830444B04Rik، Gm2464، NEAT1 و Gm4117 اثر بگذارند.

بحث و نتیجه‌گیری: با توجه به ارتباط متقابل lncRNA، miRNA و mRNA، مطالعه ما یک نقش جدید از lncRNAها را برای تحقیقات آینده و مطالعات تجربی درباره مسیر تمایز اکتودرمی و سازوکارهای مولکولی فراهم می‌کند.

واژه‌های کلیدی: بیوانفورماتیک، سامانه بیولوژی، BMP4، FGF8 اکتودرم، RNAهای غیر کدکننده

استناد: مقدم، سیمیه؛ بابایی، اسماعیل. پیشگویی بیوانفورماتیکی ژن‌های غیر کدکننده مرتبط با ژن‌های مسیر تمایز اکتودرمی BMP4 و NOG، FGF8

موشی و ترسیم شبکه ارتباطی آنها. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی ایلام، اردیبهشت ۱۴۰۱؛ ۳۰(۱): ۲۹-۴۱.

از آنجا که ژن‌ها به طور جداگانه عمل نمی‌کنند، می‌توان آن‌ها را بر اساس فعل و انفعالات در «شبکه»‌ها دسته‌بندی کرد. این یک فرضیه جدید، معروف به فرضیه CeRNA است که سال‌ها و همکارانشان در سال ۲۰۱۱ ارائه کردند. شبکه‌های CeRNA از mRNAهای رمزگذار پروتئین و ncRNAهایی مانند miRNA و lncRNAها تشکیل شده است (۱).

ژن‌های کدکننده پروتئین تنها بخش کوچکی از ژنوم انسان را تشکیل می‌دهند و بخش اعظمی از توالی‌های ژنومی از نظر رونویسی خاموش هستند؛ اما مشاهدات اخیر نشان‌دهنده وجود توالی‌های عملکردی مهمی شامل RNAهای غیرکدکننده است که دسته‌ای از RNAها هستند که به پروتئین‌های عملکردی ترجمه نمی‌شوند. اکنون به طور گسترده پذیرفته شده است که بخش غیرکدکننده ژنوم نقش مهمی در توسعه زیست‌شناسی، تعیین سرنوشت سلول و درمان بیماری‌ها دارد (۲). RNAهای غیرکدکننده یا ncRNA (non-coding RNA) را می‌توان به انواع مختلف long non-coding RNA، circular RNA، snRNA، miRNA و... تقسیم‌بندی کرد. lncRNAها یا RNAهای غیرکدکننده طولانی، رونوشت‌های ترجمه‌نشده‌ای به طول ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که بسیاری از مشخصات ساختاری mRNAها از جمله یک دم پلی A، کلاهک 5' و یک ساختار پروموتور دارند. این RNAها مختص به بافت ویژه‌ای هستند و عملکرد تخصصی مختص به همان بافت را دارند که در حین رشد بیان می‌شوند و تنظیم‌کننده‌های اصلی پرتوانی رویانی (Embryonic pluripotency)، تمایز (Differentiation)، الگوسازی محورهای بدنی، جلوگیری از محورهای تکوینی، تغییرات هیستونی، خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلایسون و در فاکتورهای مؤثر بر رونویسی تأثیر دارند (۳، ۴).

سلول‌های pluripotent (پرتوان)، نوعی از سلول‌های بنیادی هستند که توانایی تمایز یافتن به بافت‌های موجود

در لایه‌های سه‌گانه جنینی، لایه اکتودرمی، اندودرمی و مزودرمی را دارند؛ اما توانایی به وجود آوردن یک موجود زنده کامل را ندارند و این امر از طریق فرایندی به نام تغییرات بیان ژن‌ها رخ می‌دهد. تنظیم بیان ژن از طریق سیگنال‌های مشخصی در داخل و خارج از سلول‌ها رخ می‌دهد (۵). در فرایند تمایز سلول‌های بنیادی جنینی به لایه زایای اکتودرم، ژن‌های بسیاری دخیل هستند که در این مقاله ژن‌های BMP4، NOG و FGF8 بررسی شده‌اند که در ریخت‌زایی، رگ‌زایی، رشد و تکامل بسیاری از بافت‌های بدن و ساخت برخی سلول‌های تخصصی مشتق‌یافته از لایه زایا نقش دارند. BMP4 (پروتئین مورفولوژیک استخوانی) عضوی از خانواده بزرگ تبدیل‌کننده فاکتور رشد (TGF-β) است که پروتئین‌های درون‌سلولی Smad (واسطه‌های داخل سلولی BMPها) را فعال می‌کنند و سپس از این طریق، بیان ژن را تنظیم می‌نمایند (۶). Noggin یکی از آنتاگونیست‌های خارج سلولی مسیر سیگنالینگ پروتئین BMP است که با اتصال محکم به BMP، مانع اتصال BMPها به گیرنده‌هایشان در سطح سلولی می‌شود و از این طریق، از فعال شدن گیرنده‌های آن‌ها جلوگیری می‌کند (۷). FGF8 به‌عنوان یک عامل منشأ سلول‌های اپی‌تلیالی (بافت پوششی) در نظر گرفته شده است که بیان ژن را تنظیم می‌نماید (۸). در تنظیم بیان این ژن‌ها عوامل مختلفی دخیل هستند؛ از جمله می‌توان به lncRNAها و miRNAها اشاره کرد. به‌تازگی مشخص شده است که نواحی غیرکدکننده یا RNAهای غیرکدکننده پروتئین نقش اساسی در سازوکارهای مختلف تنظیم بیان ژن‌ها ایفا می‌کنند. miRNAها نقش چشم‌گیری در تمایز سلول‌های بنیادی جنینی دارند. میکروRNAها ریبونوکلیک‌اسید غیرکدکننده‌ای هستند که طولی برابر ۱۸-۲۵ نوکلئوتید دارند. به‌سبب توانایی microRNA در هدف قرار دادن تعداد بسیاری از mRNAها، این دسته از اولیگونوکلئوتیدها تقریباً در همه پدیده‌های بیولوژیکی شامل تنظیم چرخه سلولی، رشد

سلولی و آپوپتوزیس، تمایز سلولی و پاسخ به استرس و بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند (۳). سامانه بیولوژی علمی است که به منظور پیوند اطلاعات پیچیده ژنی و پروتئینی به داده‌های متابولیکی تلاش می‌نماید تا یک سامانه جامع نرم‌افزاری در زمینه بیوانفورماتیکی به وجود بیاورد. امروزه، با تولد این شاخه از علم در زمینه سلامت و بیماری‌های ژنتیکی و سرطان، پژوهشگران امیدوارند بتوانند همه اتفاقاتی را که در سلول‌های بیمار و سالم اتفاق می‌افتد، الگوسازی و باهم مقایسه کنند تا به علت اصلی بیماری‌ها و درمان آن‌ها پی ببرند. بیماری‌های پیچیده نتیجه هم‌افزایی‌های ژن‌های متعدد و ارتباط آن‌ها با RNAها است؛ بنابراین، ما باید سازوکار بیماری‌ها را در سطح سامانه بیولوژی بررسی کنیم (۹). سامانه بیولوژی شامل موضوع‌هایی از جمله آنالیز شبکه‌های مختلف است که از مهم‌ترین این شبکه‌ها می‌توان به شبکه‌های ژنی، شبکه‌های برهم‌کنش پروتئین‌ها، شبکه‌های متابولیکی و شبکه‌های سیگنالی اشاره کرد. برای الگوسازی هر کدام از این شبکه‌ها، با توجه به ویژگی‌هایی که هر کدام از آن‌ها دارند، از روش‌ها و الگوریتم‌های خاصی استفاده می‌کنند؛ اما نکته مهم این است که در نهایت، هدف سامانه بیولوژی رسیدن به یک الگوی واحد و کشف ارتباطات میان این شبکه‌ها و نقش آن‌ها در حیات سلولی، ارتباطات بین سلولی، شرایط محیطی و در نهایت، پاسخ موجودات به تغییرات محیطی است (۱۰)؛ بنابراین، هدف از این تحقیق استفاده از داده‌های منتشر شده در پایگاه داده و سایت‌های پیش‌بینی مختلف و با بهره‌گیری از سامانه بیولوژی است تا بتوان به ترسیم و آنالیز شبکه‌های مولکولی mRNA-miRNA-IncRNA اقدام کرد.

مواد و روش‌ها

به‌طور کلی، پژوهش انجام‌گرفته از نوع تئوری بیوانفورماتیک است. در طول ۱۵ سال اخیر، بر اساس معیارهای زیستی مشخصی، بسیاری از ابزارهای

بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی برهم‌کنش mRNA:miRNA، mRNA:IncRNA ایجاد شدند. این ابزارها به منظور تشخیص سریع و صحیح هدف‌های miRNAها با IncRNAها و نقش‌های مهم سلولی ایجاد گردیدند و این امر را ممکن ساختند که عملکرد این اهداف شناخته و در الگوهای زیستی تأیید شود.

پایگاه داده TargetScan در TargetScan می‌توان از علامت ژن و یا نام اختصاصی گونه برای جستجو استفاده کرد. برای هر رونوشت ژنی، مکان‌هایی با احتمال اتصال بالاتر و پایین‌تر برای اتصال به miRNA نمایش داده می‌شود. از سویی، جستجو کردن نام miRNA در بردارنده نتایجی است که نشان می‌دهد که کدام رونوشت از کدام ژن می‌تواند هدف miRNA مزبور قرار گیرد (۱۱). در سال ۲۰۰۹، الگوریتمی به نام PCT طراحی شد که در واقع، یک روش تقویت‌شده برای بررسی کمی میزان حفاظت شدگی سایت بود و میزان آن برای هر یک از انواع match Seed محاسبه شده است. در واقع، PCT عددی بین ۰ و ۱ است و با میزان ناپایداری mRNA ارتباط دارد و یک معیار مناسب برای ارزیابی فراوانی زیستی برهم‌کنش‌های پیش‌بینی‌شده به‌شمار می‌رود (۱۲). در نسخه نهایی، ۱۴ ویژگی مهم اساس بررسی‌ها قرار گرفت و تحت عنوان «مدل Context++ از میزان هدف‌گیری miRNA» نامیده شد که مقادیری بین ۱ و -۱ دارد (۱۳). این ویژگی‌ها در Context ++ Score و PCT مکمل یکدیگرند. بر اساس همین، در TargetScan معیار انتخاب محتمل‌ترین برهم‌کنش معمولاً مقادیر Context ++ Score و PCT است و در مواردی که میزان برابری از هر کدام از این الگوریتم‌ها برای یک برهم‌کنش گزارش شده باشد، الگوریتم دیگری باید ملاک انتخاب قرار گیرد (۱۱)؛ بنابراین، از این سایت برای پیدا کردن miRNAهای هدف ژن‌های BMP4، NOG، FGF8 در Mus_musculus استفاده شد.

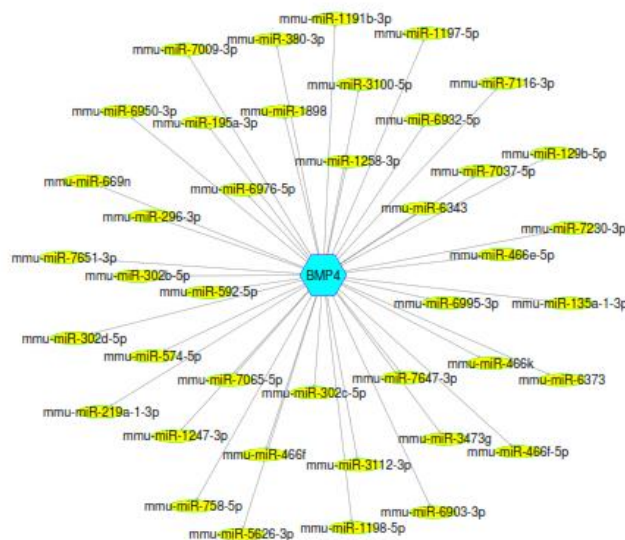
پایگاه داده MirWalk MirWalk ابزار بیوانفورماتیکی است که وسیع‌ترین مجموعه از برهم‌کنش‌های

سناریوهای تحقیق را پوشش می‌دهند. وبسایت DIANA به صورت یک مرحله‌ای برای تجزیه و تحلیل miRNAها آماده شده است. فرد با استفاده ترکیبی از برنامه‌های مختلف از مجموعه DIANA می‌تواند به بسیاری از جنبه‌های مختلف تنظیم miRNA و عملکردهای نظارتی، بدون نیاز به تخصص گسترده بیوانفورماتیکی یا زیرساخت‌های محاسباتی پردازد (۱۵). ترسیم شبکه ژنی، در این مرحله، بر اساس ارتباط ژن‌های یادشده با miRNAهای هدف خود، با استفاده از مجموعه داده‌های حاصل از سایت‌های Target Scan و MirWalk، شبکه برهم‌کنش ژن‌های mRNA-miRNA و lncRNA با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape ترسیم شد.

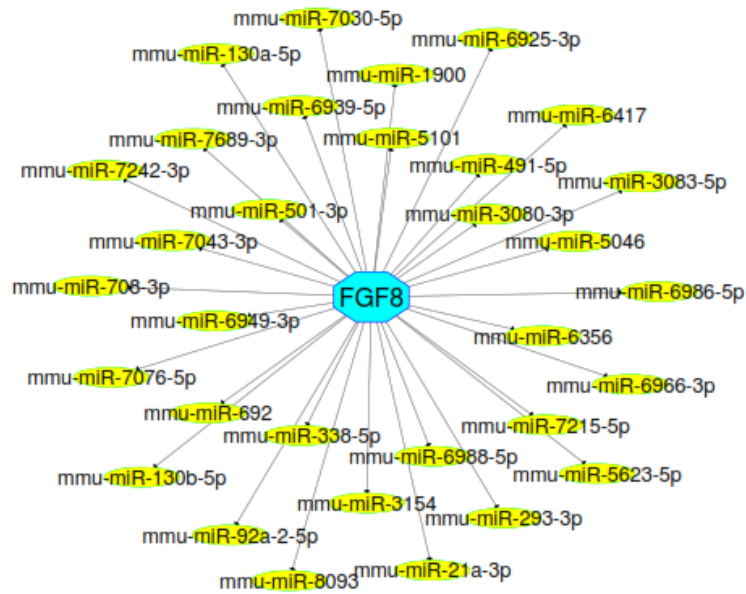
یافته‌ها

برای انجام این بررسی، در ابتدا نتایج پیش‌بینی برای BMP4 در دو پایگاه (TargetScan و MirWalk) بررسی گردید. در مرحله اول، همه miRNAهای هدف برای ژن Bmp4 در سایت TargetScan و MirWalk انتخاب شد؛ سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape انتخاب و شبکه ژنی مربوطه ترسیم گردید (شکل شماره ۱).

پیش‌بینی شده و تأیید شده میان miRNA و هدف‌های آنها (۹۴۹ میلیون برهم‌کنش) را نمایش می‌دهد. اطلاعات این پایگاه همه ژن‌های شناسایی شده انسان، موش و رت را پوشش می‌دهد و شامل یک الگوریتم جدید به نام MirWalk و ۱۲ برنامه‌آز پیش‌طراحی شده است. در این پایگاه، با وارد کردن نام ژن یا miRNA و انتخاب اندامواره مدنظر می‌توان به اطلاعات پیش‌بینی شده دسترسی پیدا کرد (۱۴). بر اساس مطالب یادشده و با توجه به این امر که بسیاری از پایگاه‌های داده بدون اطلاعات برهم‌کنش مرتبط با اندامواره موش هستند، دو پایگاه TargetScan و MirWalk به عنوان دو پایگاه جامع و برگزیده برای انتخاب miRNAهای مناسب بررسی شدند. پایگاه *DIANA-TOOLS* پس از استخراج miRNAهای هدف از دو پایگاه داده‌ای MirWalk و TargetScan، miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده برای بررسی بیشتر انتخاب گردیدند. به منظور یافتن lncRNAهای هدف برای miRNAهای منتخب، از پایگاه داده‌ای *DIANA-TOOLS* استفاده کردیم که یک سرور وب است و میزبان برنامه‌های کاربردی و پایگاه داده‌های پیشرفته برای تحقیقات کاربردی miRNA است. برنامه‌های در دسترس دامنه وسیعی از نیازهای مختلف و



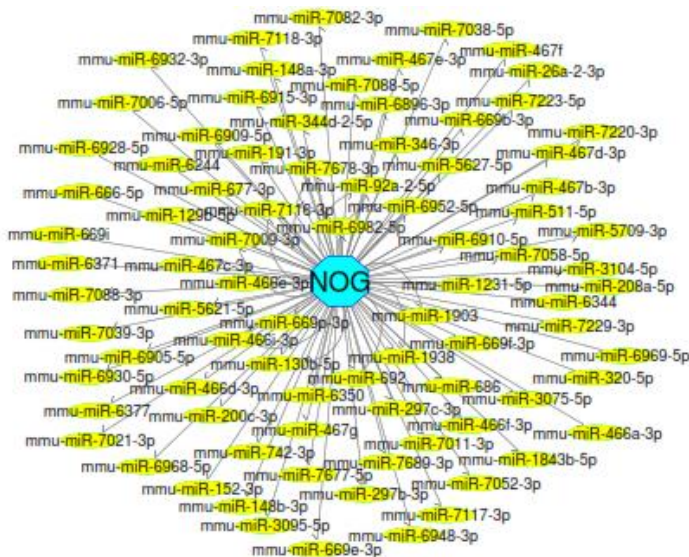
شکل شماره ۱. شبکه ژنی میان BMP4 و miRNAهای هدف آن. miRNAهای هدف از پایگاه داده‌ای TargetScan و MirWalk استخراج شد؛ سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده‌ای انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape، شبکه ژنی mRNA-miRNA برای ژن BMP4 رسم گردید.



شکل شماره ۲. شبکه ژنی میان FGF8 و miRNAهای هدف آن. miRNAهای هدف ژن FGF8 از پایگاه داده‌های TargetScan و MirWalk استخراج شد؛ سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده‌های انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape، شبکه ژنی miRNA-mRNA برای ژن FGF8 رسم گردید.

در مرحله بعدی، همه miRNAهای هدف برای ژن FGF8 در سایت TargetScan و MirWalk انتخاب شد؛ پس از آن، سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده با استفاده از نرم‌افزار Sytoscape انتخاب و شبکه ژنی مربوطه ترسیم گردید (شکل شماره ۲).

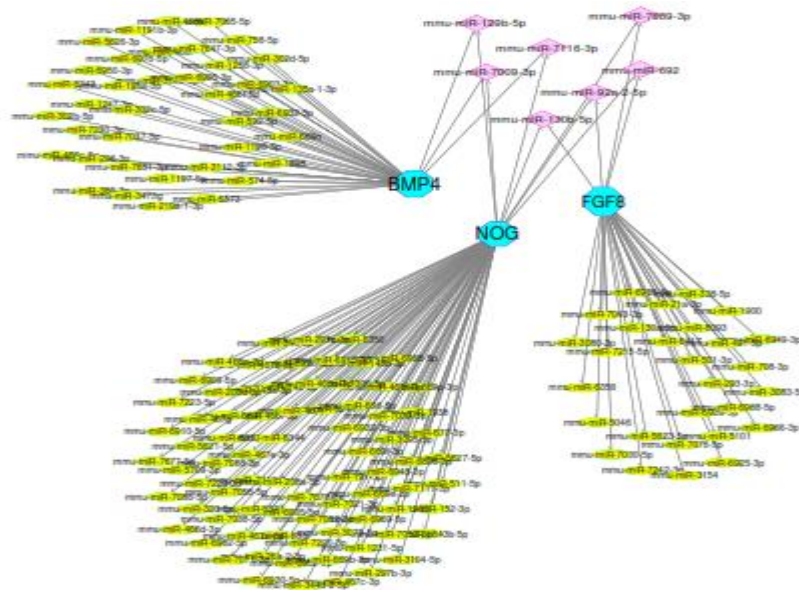
در مرحله بعدی، همه miRNAهای هدف برای ژن NOG در سایت TargetScan و MirWalk انتخاب شد؛ پس از آن، سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده با استفاده از نرم‌افزار Sytoscape انتخاب و شبکه ژنی مربوطه ترسیم گردید (شکل شماره ۳).



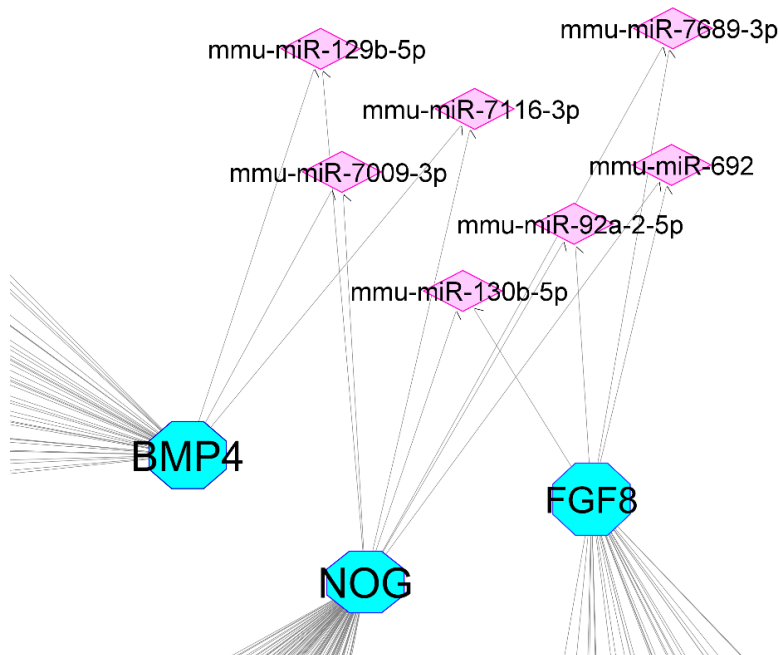
شکل شماره ۳. شبکه ژنی میان NOG و miRNAهای هدف آن. miRNAهای هدف ژن BMP4 از پایگاه داده‌های TargetScan و MirWalk استخراج شد؛ سپس miRNAهای مشترک میان دو پایگاه داده‌های انتخاب و با استفاده از نرم‌افزار Cytoscape، شبکه ژنی miRNA-mRNA برای ژن BMP4 رسم گردید.

DIANATOOLS miRNAها با استفاده از پایگاه داده ای که امتیاز مناسب $< 0/95$ داشتند، انتخاب و با استفاده از نرم افزار sytoscape شبکه $miRNA:lncRNA$ آنها ترسیم شد. در مرحله پایانی، lncRNAهای مشترک میان miRNAها برای بررسی بیشتر انتخاب گردید (شکل شماره ۵ و ۶).

در مرحله نهایی، miRNAهایی که در دو پایگاه داده ای TargetScan و MirWalk میان ژن های BMP4, NOG و FGF8 مشترک بودند، به عنوان miRNAهای انتخاب شدند که به احتمال بسیار ژن های مدنظر را هدف قرار می دهند (شکل شماره ۴).
در مرحله بعدی، lncRNAهای مربوط به هر کدام از

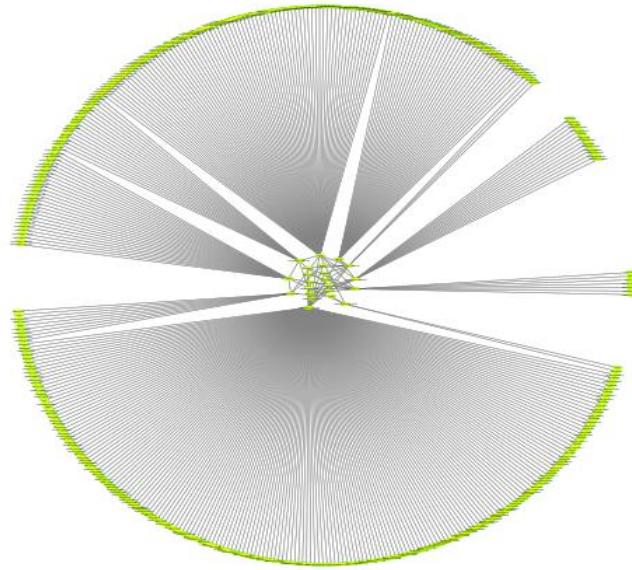


.a

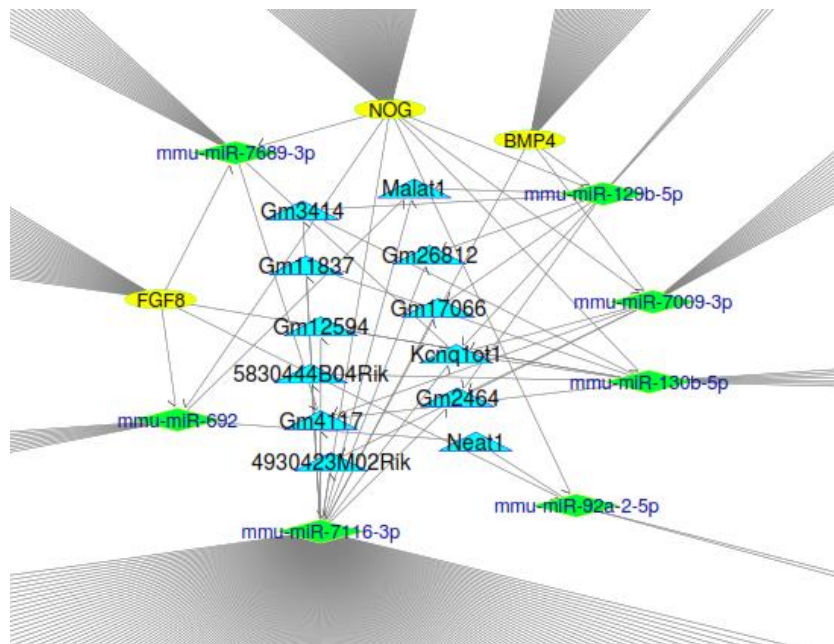


.b

شکل شماره ۴. miRNAهای مشترک میان سه ژن BMP4, NOG و FGF8. پس از ترسیم شبکه ژنی mRNA-miRNA برای سه ژن BMP4, NOG و FGF8، miRNAهای مشترک انتخاب شدند. تصویر a شماتیک کلی است. تصویر b جزئی از شکل a است که برای نمایش جزئیات بیشتر آورده شده است. پنج ضلعی های آبی mRNA و لوزی های بنفش miRNA هستند.



شکل شماره ۵. شبکه mRNA-miRNA-lncRNA. شبکه ژنی CeRNA (mRNA-miRNA-lncRNA) برای سه ژن یادشده BMP4, NOG و FGF8 با استفاده از نرم افزار Cytoscape رسم گردید.



شکل شماره ۶. lncRNAهای مشترک میان miRNAها. lncRNAهای هدف برای miRNAهای منتخب از سایت DIANA TOOLS که امتیاز 0.95 داشتند، استخراج و شبکه ژنی lncRNA-miRNA با استفاده از نرم افزار Cytoscape ترسیم شد. دایره های زرد رنگ نشان دهنده mRNA، لوزی های سبز رنگ miRNAهای مشترک و مثلث های آبی نشان دهنده lncRNAها است.

بحث و نتیجه گیری

در این مطالعه که بر اساس داده های مارکرهای مسیر اکتودرمی و با استفاده از روش های بیوانفورماتیکی صورت گرفت، یک شبکه ژنی mRNA-miRNA-lncRNA با استفاده از نرم افزار Cytoscape ترسیم گردید

در نهایت، شبکه mRNA-miRNA-lncRNA برای ژن های مدنظر ترسیم گردید. طبق مطالعات صورت گرفته، از میان lncRNAهای مشترک، تنها MALAT1، NEAT1 و KNCQOT1 نقش های مهمی داشتند که برای بررسی بیشتر انتخاب شدند.

که از ۴۱۵ گره و ۴۳۹ لبه تشکیل شده است و نمایانگر شبکه پیچیده‌ای از آثار تنظیمی میان lncRNA و miRNAها با ژن‌های هدف BMP4، NOG، و FGF8 است. تمایز اکتودرمال به شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالینگ نیاز دارد که از نظر زمانی و مکانی بسیار پویا هستند. علاوه بر این، ماهیت سلولی تنها در اثر یک مولکول سیگنالینگ تعیین نمی‌شود، بلکه به شدت و ترکیب سیگنال‌ها و قابلیت سلول برای پاسخ دادن به این سیگنال‌ها بستگی دارد؛ بنابراین تصور می‌شود که مشخصات بافت در چند مرحله اتفاق می‌افتد و توسط یک شبکه پویا از مسیرهای سیگنالینگ بیان می‌شود. در بخش زیر، مسیرهای اصلی سیگنالینگ در گیر در الگوی خارج رحمی، به‌ویژه سیگنالینگ FGF، BMP و NOG بررسی شد که یکی از آنتاگونیست‌های خارج سلولی مسیر سیگنالینگ پروتئین BMP است.

میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند. این فرایند از طریق اتصال آن‌ها از ناحیه 5'-UTR (Un-translated region) خود، تحت عنوان سید (Seed)، به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای 3' مربوط mRNA (3'-UTR) مورد هدف انجام می‌دهند. میکروRNAهای هدف برای ژن BMP4 که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، از ناحیه 3'-UTR به mRNA متصل می‌شود و در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز و... نقش ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات، miRNAهایی مانند miR-19b و miR-24 و miR-378 در مسیر سیگنالینگ TGF-B اثر می‌گذارند و بیان نابه‌جای آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها ارتباط نزدیکی دارد (۱۶-۱۸).

شبکه ژنی ژن FGF8 و miRNAهای هدف آن در شکل شماره ۲ آورده شده است. همه miRNAها از ناحیه 3'-UTR با mRNA seed می‌شوند و وظایف معینی دارند؛ به‌عنوان مثال، mmu-miR-293-3p احتمالاً از طریق فعال‌سازی مسیر سیگنالینگ PI3K در تمایز ESCها (۱۹) و mmu-miR-92a-2-5p در آپاتوز سلولی، همانندسازی

میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند. این فرایند از طریق اتصال آن‌ها از ناحیه 5'-UTR (Un-translated region) خود، تحت عنوان سید (Seed)، به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای 3' مربوط mRNA (3'-UTR) مورد هدف انجام می‌دهند. میکروRNAهای هدف برای ژن BMP4 که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، از ناحیه 3'-UTR به mRNA متصل می‌شود و در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز و... نقش ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات، miRNAهایی مانند miR-19b و miR-24 و miR-378 در مسیر سیگنالینگ TGF-B اثر می‌گذارند و بیان نابه‌جای آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها ارتباط نزدیکی دارد (۱۶-۱۸).

که از ۴۱۵ گره و ۴۳۹ لبه تشکیل شده است و نمایانگر شبکه پیچیده‌ای از آثار تنظیمی میان lncRNA و miRNAها با ژن‌های هدف BMP4، NOG، و FGF8 است. تمایز اکتودرمال به شبکه‌ای از مسیرهای سیگنالینگ نیاز دارد که از نظر زمانی و مکانی بسیار پویا هستند. علاوه بر این، ماهیت سلولی تنها در اثر یک مولکول سیگنالینگ تعیین نمی‌شود، بلکه به شدت و ترکیب سیگنال‌ها و قابلیت سلول برای پاسخ دادن به این سیگنال‌ها بستگی دارد؛ بنابراین تصور می‌شود که مشخصات بافت در چند مرحله اتفاق می‌افتد و توسط یک شبکه پویا از مسیرهای سیگنالینگ بیان می‌شود. در بخش زیر، مسیرهای اصلی سیگنالینگ در گیر در الگوی خارج رحمی، به‌ویژه سیگنالینگ FGF، BMP و NOG بررسی شد که یکی از آنتاگونیست‌های خارج سلولی مسیر سیگنالینگ پروتئین BMP است.

میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند. این فرایند از طریق اتصال آن‌ها از ناحیه 5'-UTR (Un-translated region) خود، تحت عنوان سید (Seed)، به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای 3' مربوط mRNA (3'-UTR) مورد هدف انجام می‌دهند. میکروRNAهای هدف برای ژن BMP4 که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، از ناحیه 3'-UTR به mRNA متصل می‌شود و در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز و... نقش ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات، miRNAهایی مانند miR-19b و miR-24 و miR-378 در مسیر سیگنالینگ TGF-B اثر می‌گذارند و بیان نابه‌جای آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها ارتباط نزدیکی دارد (۱۶-۱۸).

میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند. این فرایند از طریق اتصال آن‌ها از ناحیه 5'-UTR (Un-translated region) خود، تحت عنوان سید (Seed)، به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای 3' مربوط mRNA (3'-UTR) مورد هدف انجام می‌دهند. میکروRNAهای هدف برای ژن BMP4 که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، از ناحیه 3'-UTR به mRNA متصل می‌شود و در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز و... نقش ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات، miRNAهایی مانند miR-19b و miR-24 و miR-378 در مسیر سیگنالینگ TGF-B اثر می‌گذارند و بیان نابه‌جای آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها ارتباط نزدیکی دارد (۱۶-۱۸).

میکروRNAها بیان ژن‌ها را پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA یا مهار ترجمه آن‌ها کنترل می‌کنند. این فرایند از طریق اتصال آن‌ها از ناحیه 5'-UTR (Un-translated region) خود، تحت عنوان سید (Seed)، به ناحیه ترجمه‌نشده انتهای 3' مربوط mRNA (3'-UTR) مورد هدف انجام می‌دهند. میکروRNAهای هدف برای ژن BMP4 که در شکل شماره ۱ نشان داده شده است، از ناحیه 3'-UTR به mRNA متصل می‌شود و در بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند تکثیر سلولی، تمایز و... نقش ایفا می‌کنند. طبق تحقیقات، miRNAهایی مانند miR-19b و miR-24 و miR-378 در مسیر سیگنالینگ TGF-B اثر می‌گذارند و بیان نابه‌جای آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها ارتباط نزدیکی دارد (۱۶-۱۸).

بیان ژن و نیز کنترل فرایندهای ترجمه نقش مهمی دارند(۳).

طبق تحقیقات انجام شده، نقش lncRNAها در تنظیم الگوی بیان ژن نشان دهنده پیچیده بودن سازوکار کنترلی آنها است، به نحوی که این مولکولها در سطوح متفاوتی از تنظیم بیان ژن، مشتمل بر تنظیم در سطح رونویسی و نیز پس از رونویسی درگیر هستند. lncRNAها با miRNAها همکاری دارند، بدین صورت که تعدادی از lncRNAها در جهت همسو و یا معکوس با فعالیت مولکولهای miRNA عمل می کنند و از این طریق، در فعال سازی و یا مهار بیان ژن نقش مهمی دارند؛ به طور مثال، lncRNA Kcnq1ot1 به صورت cis عمل می کند و Malat1 که اولین بار در ارتباط با متاستاز شناخته شد، یک lncRNA است که نقش کلیدی در پردازش متناوب pre-mRNA ایفا می کند(۲۶).

فعالیت lncRNAها در کنترل انتقال مولکولها میان هسته و سیتوپلاسم بررسی شده است و طبق مطالعات، ساختارهای هسته ای پویا تحت عنوان Paraspeckleها،

از طریق بقای mRNAهای پردازش شده در هسته قادرند بیان ژن را در سطح پس از رونویسی تنظیم کنند. به طور کلی، هر هسته شامل چندین Paraspeckle است که برای پیشبرد رونویسی توسط RNA پلی مرز II، Paraspeckle ناپدید می شوند. تشکیل و حفظ ساختارهای Paraspeckle نیازمند وجود یک lncRNA به نام NEAT1 است که منحصراً در Paraspeckleها مشاهده شده است. Paraspeckleها در سلولهای بنیادی جنینی دیده نمی شوند؛ اما پس از تمایز این سلولها پدید می آید که مطابق با زمان بیان و فعالیت NEAT1 است. علاوه بر این، تخلیه NEAT1 یک عملکرد با کفایت برای نبود Paraspeckle در هسته و افزایش بیان NEAT1 است و اما به افزایش پروتئینهای سازنده Paraspeckle منجر می شود. این امر نشان دهنده نقش ضروری و کلیدی NEAT1 در تشکیل و یا تمامیت ساختاری Paraspeckleها است (۲۷)؛ همچنین این lncRNAها در فرایندهای سلولی دیگر نیز دخیل هستند که در جدول شماره ۱ آورده شده است.

جدول شماره ۱. بعضی از نقش های lncRNAهای NEAT1، MALAT1 و Kcnq1ot1

نام lncRNA	نقش lncRNA
MALAT1	سازمان بندی اجزای هسته ای تنظیم رشد و نمو، چرخه سلولی، تکثیر سلولی و مهاجرت سلولی تنظیم مثبت تکثیر میوبلاست تنظیم MRNA Splicing از طریق اسپلیکوزوم تنظیم سیناپس (۲۸)
NEAT1	حفاظت سلولی تنظیم کننده ترجمه چندین ژن از جمله ژنهای درگیر در سرطان حفظ حالت پایدار عملکردی یا ساختاری سلول سازمان بندی هسته پاسخ به محرکها در مقابل آسیبهای ارگانسیم شرکت در ساختمان nuclear body و paraspeckles (۲۹)
Kcnq1ot1	خاموش کردن ژن هایپرمتیلاسیون جزایر CPG حفظ متیلاسیون DNA تنظیم بیان ژن توسط پدیده برداشت ژنومی اتصال کروماتین و اتصال پروتئین (۳۰)

برای ادامه مطالعه و نیز پی بردن به نقش احتمالی آنها در مهار و یا افزایش بیان ژن های دخیل در تمایز اکتودرمی بررسی شدند.

با توجه به نتایج به دست آمده از پایگاه ها می توان اذعان داشت که احتمالاً miRNA های mmu-miR-92a-2-5p، mmu-miR-130b-5p، mmu-miR-129b-5p، mmu-miR-7116-3p، mmu-miR-7009-3P، miR-692 و mmu-miR-7689-3p برهم کنش قوی با ژن های BMP4، NOG و FGF8 داشتند که در مسیر تمایز سلول های بنیادی جنینی به لایه زایای اکتودرمی نقش دارند. طبق پایگاه های DIANATOOLS، miRNA های MALAT1، NEAT1 و KNCQ0T1 دخیل اند و از این طریق، در سازوکارهای مختلف سلولی از جمله تنظیم بیان ژن ها، متابولیسم های سلولی، ساختار اجزای هسته سلول و همچنین در رشد و نمو طبیعی سلول ها و در برخی موارد در رشد تومور و پیشرفت سرطان می توانند نقش داشته باشند. اگرچه تأیید این پیش بینی های محاسباتی منوط به بررسی بیان این miRNA ها و به تبع آن، بررسی ارتباط میان این دسته از miRNA ها و lncRNA های هدف آنها است.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات عزیزانی که در نگارش این مقاله همکاری داشتند، تشکر و قدردانی می گردد.

تعارض منافع

نویسندگان مقاله هیچ گونه تعارض منافی ندارند.

کد اخلاق: طرح مذکور با شماره پ/۲/۱۰۰/۲۱۵۶۰ در دانشگاه تبریز تصویب شده است.

در رابطه با lncRNA ها اطلاعات کافی در دسترس نیست؛ اما استفاده از ابزارهای پیشگویی کننده بیوانفورماتیکی و تأیید هدف های ژنی miRNA:lncRNA نقش مهمی در انتخاب صحیح، سریع و کم هزینه تر نسبت به روش های آزمایشگاهی دارد که بعدها می توان آن را به طور تجربی نیز تأیید کرد. تعداد فراوانی از این ابزارها به وجود آمده است؛ اما یک چالش مهم در استفاده از آنها این است که هر یک از ابزارها، با الگوریتم خاص خود، نتایج مجزایی را پیش بینی می کنند و انتخاب miRNA و lncRNA های مناسب از طریق بیوانفورماتیک را مشکل می سازند.

در بررسی حاضر، در رهیافتی نوین و به منظور صرف نظر کردن از هزینه های گزاف microarray و روش های مشابه، اساس انتخاب miRNA ها بر پیش بینی برهم کنش های قوی آنها با ژن های مهمی همچون BMP4، NOG و FGF8 قرار گرفت. بر اساس همین، در این مطالعه پس از انتخاب ژن های هدف، تعدادی از miRNA های اثرگذار بر این ژن ها با استفاده از پایگاه های داده جستجو شده بدین منظور، ابتدا با استفاده از الگوریتم های MirWalk و TargetScan، miRNA های مؤثر بر ژن های BMP4، NOG و FGF8 بررسی شدند. از میان آنها، miRNA های مؤثر و مشترک بر هر سه ژن برای بررسی بیشتر انتخاب گردیدند؛ زیرا طبق نتایج حاصل از پایگاه ها، این miRNA ها توانایی ایجاد برهم کنش قوی با ژن های BMP4، NOG و FGF8 داشتند؛ بنابراین انتخاب شدند تا در مرحله بعدی، lncRNA های هدف این miRNA ها با استفاده از پایگاه داده ای DIANATOOLS استخراج گردد که در نهایت، از میان lncRNA های هدف، miRNA های MALAT1، NEAT1 و Kncq1ot1 که قوی ترین برهم کنش را داشتند و همچنین از آنها اطلاعات کم و بیشی در دسترس بود،

References

- Zhou R-S, Zhang E-X, Sun Q-F, Ye Z-J, Liu J-W, Zhou D-H, et al. Integrated analysis of lncRNA-miRNA-mRNA ceRNA network in squamous cell carcinoma of tongue. BMC cancer. 2019;19:1:1-10. doi: 10.1186/s12885-019-5983-8.
- Huang R, Wu J, Zheng Z, Wang G, Song D, Yan P, et al. The construction and analysis of ceRNA

- network and patterns of immune infiltration in mesothelioma with bone metastasis. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:257. doi: 10.3389/fbioe.2019.00257.
3. He J-H, Han Z-P, Zou M-X, Wang L, Lv YB, Zhou JB, et al. Analyzing the LncRNA, miRNA, and mRNA regulatory network in prostate cancer with bioinformatics software. *J Comput Biol.* 2018;25:2:146-57. doi: 10.1089/cmb.2016.0093.
 4. Zhang X, Wang W, Zhu W, Dong J, Cheng Y, Yin Z, et al. Mechanisms and functions of long non-coding RNAs at multiple regulatory levels. *Int J Mol Sci.* 2019;20:22:5573. doi: 10.3390/ijms20225573.
 5. Menolfi D, Zha S. ATM, ATR and DNA-PKcs kinases—the lessons from the mouse models: inhibition≠ deletion. *Cell Biosci.* 2020;10:1:1-15. doi:10.1186/s13578-020-0376-x.
 6. Schmierer B, Hill CS. TGFβ–SMAD signal transduction: molecular specificity and functional flexibility. *Nat rev Mol cell bio.* 2007;8:12:970-82. doi: 10.1038/nrm2297.
 7. Gerrard L, Rodgers L, Cui W. Differentiation of human embryonic stem cells to neural lineages in adherent culture by blocking bone morphogenetic protein signaling. *Stem cells.* 2005;23(9):1234-41. doi: 10.1634/stemcells.2005-0110.
 8. Britton G, Heemskerk I, Hodge R, Qutub AA, Warmflash A. A novel self-organizing embryonic stem cell system reveals signaling logic underlying the patterning of human ectoderm . *Development.* 2019;146:20:dev179093. doi: 10.1242/dev.179093.
 9. Zhang Y, Yu F, Bao S, Sun J. Systematic characterization of circular RNA-associated CeRNA network identified novel circRNA biomarkers in Alzheimer's disease. *Front Bioeng Biotechnol.* 2019;7:2.2.. doi: 10.3389/fbioe.2019.00222
 10. Kitano H. *Systems biology: a brief overview.* science. 2002;295(5560):1662-4. doi: 10.1126/science.1069492.
 11. Riffo-Campos ÁL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: what to choose? *Int J Mol Sci.* 2016;17:17:1947. doi: 10.3390/ijms17121987
 12. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 2009;19:1:92-105. doi: 10.1101/gr.082701.108
 13. Agarwal V, Bell GW, Nam J-W, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *elife.* 2015;4:e05005. doi: 10.7554/eLife.05005.
 14. Dweep H, Gretz N. miRWalk2. 0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nature methods.* 2015;12(8):697-. doi:10.1038/nmeth.3485
 15. Vlachos IS, Hatzigeorgiou AG. Functional analysis of miRNAs using the DIANA tools online suite. *Drug Target miRNA: Springer;* 2017. p. 25-50. doi: 10.1007/978-1-4939-6563-2_2.
 16. Gallo A, Agnese V, Coronello C, Raffa GM, Bellavia D, Conaldi PG, et al. On the prospect of serum exosomal miRNA profiling and protein biomarkers for the diagnosis of ascending aortic dilatation in patients with bicuspid and tricuspid aortic valve. *Int J Cardiol.* 2018;273:230-6. doi: 10.1016/j.ijcard.2018.10.005.
 17. Valenti MT, Deiana M, Cheri S, Dotta M, Zamboni F, Gabbiani D, et al. Physical exercise modulates miR-21-5p, miR-129-5p, miR-378-5p, and miR-188-5p expression in progenitor cells promoting osteogenesis. *Cells.* 2019;8:7:742. doi: 10.3390/cells8070742
 18. Brandon-Warner E, Benbow JH, Swet JH, Feilen NA, Culbertson CR, McKillop IH, et al. Adeno-Associated Virus Serotype 2 Vector–Mediated Reintroduction of microRNA-19b Attenuates Hepatic Fibrosis. *Hum gene ther.* 2018;29:6:674-86. doi: 10.1089/hum.2017.035.
 19. Rey F, Barzaghini B, Nardini A, Bordoni M, Zuccotti GV, Cereda C, et al. Advances in tissue engineering and innovative fabrication techniques for 3-D-structures: translational applications in neurodegenerative diseases. *Cells.* 2020;9:7:1636. doi: 10.3390/cells9071636.
 20. Gu Q-H, Yu D, Hu Z, Liu X, Yang Y, Luo Y, et al. miR-26a and miR-384-5p are required for LTP maintenance and spine enlargement. *Nat Commun.* 2015;6:1:1-15. doi: 10.1038/ncomms7789
 21. Duarte Ramos Matos G. *Free Energy Calculations in Action: Theory, Applications and Challenges of Solvation Free Energies:* UC Irvine; 2018.
 22. Weng J, Zhang P, Yin X, Jiang B. The whole transcriptome involved in denervated muscle atrophy following peripheral nerve injury. *Front Bioeng Biotechnol.* 2018;11:69. doi: https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00069
 23. He Q, Wang Q, Yuan C, Wang Y. Downregulation of miR-7116-5p in microglia by MPP+ sensitizes TNF-α production to induce dopaminergic neuron damage. *Glia.* 2017; 65:8:1251-63. doi: 10.1002/glia.23153.
 24. Pei W, Tao L, Zhang LW, Zhang S, Cao J, Jiao Y, et al. Circular RNA profiles in mouse lung tissue induced by radon. *Environ Health Prev Med.* 2017;22:1:1-10. doi: 10.1186/s12199-017-0627-6.
 25. Wang S, Xu Z, Wang L. Shuanghuang Shengbai granule cures myelosuppression and suppresses lung cancer progression: Mechanism and therapeutic targets from the aspect of microRNAs. *Oncotarget.* 2017;8:37:62154. doi: 10.18632/oncotarget.19129.
 26. Bhat SA, Ahmad SM, Mumtaz PT, Malik AA, Dar MA, Urwat U, et al. Long non-coding RNAs: Mechanism of action and functional utility. *Noncoding RNA Res.* 2016;1. doi: 10.1016/j.ncrna.2016.11.002
 27. Lin Y, Schmidt BF, Bruchez MP, McManus CJ. Structural analyses of NEAT1 lncRNAs suggest long-range RNA interactions that may contribute to paraspeckle architecture. *Nucleic Acids Res.* 2018;46:7:3742-52. doi: 10.1093/nar/gky046.
 28. Антонова Е. Морфометрические показатели ультраструктурных проявлений репаративной регенерации в печени черепах вида *Trachemys scripta elegans* после действия гипертермии. *Вестник Балтийского федерального университета им И Канта Серия: Естественные и медицинские науки.* 2008;7.
 29. Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA,

- Ensminger AW, Fox AH, Chess A, et al. An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell*. 2009;33:6:717-26. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.026.
30. Thakur N, Tiwari VK, Thomassin H, Pandey RR,

Kanduri M, Göndör A, et al. An antisense RNA regulates the bidirectional silencing property of the *Kcnq1* imprinting control region. *Mol cell biol*. 2004;24:18:7855-62. doi: 10.1128/MCB.24.18.7855-7862.2004