

مقایسه پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAهای مرتبط با بیماری آلزایمر با ابزارهای بیوانفورماتیکی آنلاین

مریم کرائی^۱، شمس‌الدین احمدی^{۲*}

• پذیرش مقاله: ۹۹/۵/۲۰

• دریافت مقاله: ۹۹/۲/۲۷

مقدمه: پیش‌بینی میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های هدف با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی، موجب صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌های بررسی آزمایشگاهی می‌شود. در این مطالعه، پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAهای مرتبط با بیماری آلزایمر توسط ابزارهای بیوانفورماتیکی مختلف با داده‌های تجربی گزارش شده مقایسه شد.

روش: ۴۱ میکروRNA که بر اساس نتایج آزمایشگاهی گزارش شده در مقالات موجب تغییر در بیان ۲۱ ژن اصلی دخیل در بیماری آلزایمر شده بودند، انتخاب گردید. سپس پیش‌بینی ژن هدف برای هر میکروRNA به وسیله سه ابزار بیوانفورماتیکی شامل MirTarget، TargetScan و Diana-microT انجام شد و نتایج به دست آمده برای هر سه ابزار با توجه به ژن‌های هدف گزارش شده برای آن‌ها با یکدیگر مقایسه گردید.

نتایج: در بررسی ۴۱ میکروRNA گزارش شده برای ۲۱ ژن دخیل در بیماری آلزایمر، ابزار MirTarget در ۶۶ درصد، TargetScan در ۶۱ درصد و Diana-microT در ۲۷ درصد از موارد اتصال میکروRNAهای مورد نظر را به ژن هدف، تأیید نمود؛ اما اتصال ۲۲ درصد از میکروRNAها به ژن‌های هدف، توسط هیچ‌کدام از ابزارها تأیید نشد.

نتیجه‌گیری: ابزارهای MirTarget و TargetScan نسبت به Diana-microT در پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAهای دخیل در بیماری آلزایمر توانایی بالاتری دارند. با توجه به الگوریتم به کار گرفته شده در MirTarget، این ابزار بیوانفورماتیکی در پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها نتایج عملکردی و واقعی‌تری را ارائه می‌کند و به عنوان یک نرم‌افزار کاربردی در پیش‌بینی اهداف میکروRNAها توصیه می‌شود. همچنین می‌توان نتیجه‌گیری نمود که تغییرات بیان ژن گزارش شده با واسطه میکروRNAها در بیماری آلزایمر، در مواردی نیاز به بررسی بیشتر دارند.

کلید واژه‌ها: میکروRNA، بیوانفورماتیک، پیش‌بینی ژن هدف، بیماری آلزایمر

• **ارجاع:** کرائی مریم، احمدی شمس‌الدین. مقایسه پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAهای مرتبط با بیماری آلزایمر با ابزارهای بیوانفورماتیکی آنلاین. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۹، ۷(۴): ۳۷۶-۳۹۹.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد سلولی و مولکولی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران
۲. دانشیار رشته فیزیولوژی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

* **نویسنده مسئول:** شمس‌الدین احمدی

آدرس: سنندج، بلوار پاسداران، دانشگاه کردستان، دانشکده علوم پایه، گروه علوم زیستی

• **Email:** sh.ahmadi@uok.ac.ir

• **شماره تماس:** ۰۸۷-۳۳۶۶۰۰۷۵

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری تحلیل برنده عصبی غیرقابل برگشت است که اصلی‌ترین عامل دمانس یا زوال عقل در جمعیت افراد مسن جهان به شمار می‌آید. این بیماری با از دست رفتن پیشرونده حافظه و تحلیل رفتن توانایی‌های ذهنی فرد مبتلا مشخص می‌شود و در نهایت منجر به عدم توانایی فرد مبتلا در انجام کارهای روزمره خود می‌شود. با توجه به افزایش جمعیت سالمند در تمام دنیا، شناسایی عوامل ایجاد و یا مؤثر در پیشرفت بیماری آلزایمر در راستای دستیابی به روش‌های کنترلی و درمانی مؤثرتر این بیماری برای نظام سلامت هر کشوری از نظر اجتماعی و اقتصادی از اهمیت بالایی برخوردار است [۱]. از مهم‌ترین عوامل ایجاد بیماری آلزایمر، دو پروتئین به نام‌های آمیلوئید بتا (Amyloid beta) و $A\beta$ و پروتئین تائو (Tau Protein) هستند. این دو پروتئین به ترتیب با تشکیل پلاک‌های آمیلوئیدی در محیط خارج سلولی و کلاف‌های در هم پیچیده داخل نورونی در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر نقش عمده‌ای دارند [۲-۴]. آمیلوئید بتا از شکسته شدن یک پروتئین پیش‌ساز به نام پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید یا (Amyloid precursor protein) APP به وجود می‌آید که تولید زیاد آن نیز موجب تشکیل و رسوب پلاک‌های آمیلوئیدی در فضای خارج سلولی نورون‌ها می‌شود [۵، ۶]. لازم به ذکر است که پپتید آمیلوئید بتا دارای عملکردهای فیزیولوژیکی نیز در مغز هست؛ اما تولید بیش‌ازحد و یا عدم پاک‌سازی به موقع آن از مغز، موجب تجمع این پروتئین و تولید پلاک‌های آمیلوئیدی می‌شود که برای فعالیت نورون‌ها مضر بوده و اختلال سیناپسی و مرگ نورونی را به دنبال دارد [۲]. پروتئین تائو نیز در بیماران آلزایمری دچار هایپرفسفریلاسیون می‌شود و تجمعات نامحلولی به نام رشته‌های ماریچی جفت و در نهایت کلاف‌های در هم پیچیده داخل نورونی را تشکیل می‌دهد. در نتیجه تغییرات ایجاد شده در تائو، ساختار میکروتوبول‌ها و به دنبال آن اسکلت سلولی نورون به ویژه در آکسون و دندریتها تخریب می‌شود و در نهایت ساختار سیناپس‌ها و انتقال پیام بین نورون‌ها دچار آسیب جدی خواهند شد [۲]. همچنین بین آمیلوئید بتا و تائو در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر ارتباط متقابل وجود دارد و افزایش یکی از آن‌ها موجب تشدید تولید دیگری می‌گردد [۷، ۳]. تحقیقات انجام شده در سال‌های اخیر نشان داده‌اند که عوامل متعددی از جمله تغییرات در بیان RNAهای غیرکدکننده به عنوان یکی از عوامل اصلی در تغییرات بیان APP، آمیلوئید بتا

و پروتئین تائو عمل می‌کنند و افزایش اطلاعات مولکولی در مورد نقش و نوع RNAهای غیرکدکننده دخیل در بیماری آلزایمر، در تشخیص زودهنگام، کنترل پیشرفت و درمان آن از اهمیت بالایی برخوردار است [۸-۱۰]. میکروRNAها گروهی از RNAهای غیرکدکننده کوچک هستند که ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید طول دارند. میکروRNAها اگر چه به پروتئین ترجمه نمی‌شوند؛ اما در تنظیم بیان ژن‌ها در سطوح پس از رونویسی نقش مهمی دارند. اتصال میکروRNA به mRNA هدف، از طریق چندین مکانیسم موجب کاهش سطح mRNA هدف می‌شود که شامل القای د-آدنیلایسون (D-adenylation) یا حذف نوکلئوتیدهای آدنین در انتهای mRNA، کاهش پایداری mRNA و افزایش میزان تجزیه آن می‌گردد. میکروRNAها همچنین موجب مهار مراحل آغاز و طول‌سازی ترجمه می‌شوند و به‌طور کلی با این عملکردها از ساخته شدن پروتئین حاصل از ژن هدف جلوگیری می‌کنند [۱۱، ۱۲]. به دلیل پتانسیل میکروRNAها در هدف قرار دادن تعداد زیادی از mRNAها، این دسته از اولیگونوکلوئوتیدها به عنوان تنظیم‌کننده‌های اصلی تعداد زیادی از فرآیندهای زیستی شامل تکوین جنینی، تمایز، تکثیر، مهاجرت سلولی و آپوپتوز شناخته شده‌اند [۱۳، ۱۴]. بر اساس شواهد و مطالعات انجام شده در دو دهه اخیر، اختلال در کارکرد میکروRNAها با ایجاد و پیشرفت بسیاری از بیماری‌ها از جمله بیماری‌های تحلیل برنده عصبی در ارتباط است [۱۵، ۱۶]. نتایج مطالعات زیادی نشان داده‌اند که میکروRNAها نقش حیاتی را در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر ایفا می‌کنند و علاوه بر نقش مستقیمی که در کنترل بیان ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر دارند، می‌توانند از طریق تعامل با RNAهای غیرکدکننده طولی نیز در شروع و پیشرفت بیماری آلزایمر نقش اساسی داشته باشند [۸]. بر اساس نتایج مطالعات تجربی، میکروRNAها در تنظیم تولید مولکول‌های مختلف که عوامل اصلی ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر به شمار می‌آیند، شامل APP، آنزیم بتا سکریتاز (Site Amyloid Precursor - β Protein Cleaving Enzyme) یا BACE1 و آمیلوئید بتا نقش مهمی دارند. همچنین میکروRNAها در مکانیسم‌های پاک‌سازی آمیلوئید بتا و نیز فسفریلاسیون پروتئین تائو تأثیر دارند [۱۷، ۹]؛ بنابراین دانشمندان معتقدند که شناسایی میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های اصلی دخیل در ایجاد و پیشرفت بیماری آلزایمر از اهمیت زیادی برخوردار است، اما با توجه به تعداد زیاد میکروRNAهای شناسایی شده

مقایسه شد. هدف از این تحقیق ارزیابی قدرت و صحت پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها با این ابزارهای بیوانفورماتیکی و شناسایی بهترین ابزارها برای پیش‌بینی میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر است. از طرف دیگر نتایج حاصل از این تحقیق می‌تواند صحت گزارش‌های موجود در مورد میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر را نیز اعتبارسنجی نماید.

روش

استخراج میکروRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در بیماری آلزایمر بر اساس گزارش‌های تجربی منتشر شده

بر اساس شواهد موجود، میکروRNAها در بیماری‌زایی آلزایمر نقش مهمی را ایفا می‌کنند [۲۰]. تأثیر میکروRNAها در مراحل مختلف و کلیدی مؤثر در القاء و پیشرفت بیماری آلزایمر مانند تأثیر بر بیان APP، BACE1 و دیگر مولکول‌های تأثیرگذار بر تولید آمیلوئید بتا تا حد زیادی به اثبات رسیده است. همچنین میکروRNAها بر پاک‌سازی و حذف آمیلوئید بتا و نیز بر فسفریلاسیون پروتئین تائو تأثیر می‌گذارند؛ اما نوع دقیق میکروRNAهای مؤثر در هر یک از این مراحل نیز به مطالعه و آزمایش‌های بیشتری نیاز دارد [۱۷]. در این مطالعه نظری در مرحله اول با بررسی مقالات منتشر شده و بر اساس گزارش‌های موجود در نتایج مطالعات آزمایشگاهی در مورد مکانیسم‌های مولکولی مرتبط با بیماری آلزایمر، ۴۱ میکروRNA مرتبط با ۲۱ ژن اصلی دخیل در بیماری آلزایمر انتخاب گردید. در جدول ۱ به طور خلاصه مهم‌ترین ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر و میکروRNAهای اصلی مرتبط با آن‌ها و نقش و عملکرد آن‌ها در مراحل مختلف بیماری آلزایمر شامل تولید و انباشت آمیلوئید بتا، پاک‌سازی آمیلوئید بتا، سمیت عصبی و اختلال سیناپسی و دیگر مراحل بیماری‌زایی بیماری بر اساس گزارش‌های موجود در مقالات علمی آورده شده است. لازم به ذکر است که در سال‌های اخیر رشد چاپ مقالات علمی در این زمینه افزایش چشمگیری داشته و این موارد به عنوان نمونه‌ای از میکروRNAهای مرتبط با ژن‌های اصلی دخیل در بیماری آلزایمر به شمار می‌روند و ممکن است تمامی موارد منتشر شده در مقالات علمی را شامل نشوند.

هنوز در مورد نحوه دخالت میکروRNAها و نیز انواع با اثرگذاری بیشتر در بیماری آلزایمر اطلاعات کاملی وجود ندارد. خانواده ژنی میکروRNAها یکی از بزرگ‌ترین خانواده‌های ژنی در یوکاریوت‌ها هستند. با توجه به دانش رو به رشد در مورد میکروRNAها و معرفی توالی‌های آن‌ها، پایگاه‌های متنوعی حاوی توالی‌های میکروRNAها راه‌اندازی شده است که یکی از مهم‌ترین آن‌ها داده پایگاه miRBase است. براساس گزارش منتشر شده در نسخه اکتبر سال ۲۰۱۸ تعداد ۳۸۵۸۹ میکروRNA در این داده پایگاه، شناسایی شده‌اند که هر کدام از آن‌ها پتانسیل اتصال به صدها رونوشت از ژن‌های مختلف را دارند [۱۸]. هم‌زمان با شناسایی و کشف میکروRNAها، روش‌های محاسباتی نیز توسعه پیدا کرده‌اند و ابزارهایی برای فهم عملکرد میکروRNAها و پیش‌بینی جفت شدن میکروRNAها با ژن‌های هدف معرفی شده‌اند [۱۹]. در حال حاضر محققان به روش‌هایی روی آورده‌اند که بتوانند ژن‌های هدف میکروRNAها و یا برعکس، میکروRNAهای متصل شونده به ژن‌های خاص را قبل از انجام آزمایش‌های تجربی و صرف زمان و هزینه زیاد، به دقت شناسایی کنند. این روش‌ها می‌توانند موجب تسریع در درک هر چه بهتر عملکرد میکروRNAها در روندهای زیستی و در نتیجه پیش‌بینی اثرات آن‌ها نیز گردد. بر همین اساس، محققین در ابتدا به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی برهمکنش احتمالی ژن‌ها و میکروRNAها را پیش‌بینی نمود و پس از آن به دنبال تأیید تجربی این برهمکنش‌ها و اثبات نقش عملکردی آن‌ها در نمونه‌های زیستی خواهند بود [۱۹]. در این مطالعه در ابتدا قصد با بررسی نتایج منتشر شده مطالعات قبلی آزمایشگاهی، مهم‌ترین ژن‌ها و میکروRNAهای مرتبط با آن‌ها که در بیماری آلزایمر گزارش شده‌اند مشخص خواهد شد. سپس قدرت پیش‌بینی ژن‌های هدف این میکروRNAها با استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی جدیدی به نام MirTarget که در سال ۲۰۱۹ به عنوان جدیدترین و بهترین مدل در شناسایی عملکردی ژن‌های هدف معرفی شده است و نیز با دو نرم‌افزار قدیمی‌تر پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها شامل TargetScan که معمول‌ترین نرم‌افزار برخط مورد استفاده در پیش‌بینی ژن هدف میکروRNA به شمار می‌رود و-Diana microT که در میان ابزارهای پیش‌بینی ژن هدف بالاتر از متوسط قرار دارد، بررسی کرده و نتایج حاصل از آن‌ها با هم

جدول ۱: نام و نقش ژن‌های اصلی دخیل در بیماری‌زایی بیماری آلزایمر و میکروRNAهای گزارش شده برای این ژن‌ها

ردیف	نام ژن	نام میکروRNAهای مرتبط	نقش پروتئین حاصل از ژن هدف در بیماری آلزایمر
۱	<i>APP</i>	miR-200-b, miR-106a, miR-106b, miR-520c, miR-20a, miR-17-5p, miR-153, miR-16, miR-101	بیان بیش‌ازحد پروتئین پیش‌ساز آمیلوئید بتا باعث تولید بیشتر آمیلوئید بتا شده و این فرایند منجر به سمیت عصبی و اختلال سیناپسی و نهایتاً زوال عقل می‌گردد [۲۱].
۲	<i>BACE1</i>	miR-339-5p, miR-29a/b, miR-29c, miR-107, miR-298, miR-328, miR-195, miR-124, miR-135a, miR-135b, miR-186	آنزیم حاصل از این ژن موجب شکستن <i>APP</i> و تولید آمیلوئید بتا می‌شود. فرآیند شکسته شدن <i>APP</i> اولین مرحله و مرحله محدود کننده در تشکیل آمیلوئید بتا است. بنابراین افزایش بیان <i>BACE1</i> تجمع آمیلوئید بتا را افزایش می‌دهد و به تدریج باعث بروز بیماری آلزایمر می‌شود [۲۲].
۳	<i>Tau</i>	miR-132	تاو یک پروتئین مرتبط با میکروتوبول است که در بیماران آلزایمری به شکل غیرطبیعی و بیش از حد فسفریله می‌شود که این حالت موجب عدم تشکیل طبیعی میکروتوبول‌ها و اختلال در شکل زوائد عصبی از جمله آکسون و در نتیجه اختلال در هدایت پیام‌های عصبی می‌شود [۲۳].
۴	<i>Fyn</i>	miR-106-b	حذف آن باعث کاهش فسفریلاسیون تاو می‌شود. بنابراین غیرفعال سازی و حذف آن به عنوان یک راه‌کار درمانی برای درمان بیماری آلزایمر پیشنهاد شده است [۲۴].
۵	<i>PTPN1</i>	miR-124	در اختلال سیناپسی نقش دارد. سرکوب <i>PTPN1</i> به طور چشمگیری باعث اختلالات سیناپسی و کاهش حافظه می‌شود. آزمایش‌هایی نشان داده است که حذف آن در موش باعث ایجاد فنوتیپ شبه آلزایمری می‌شود [۲۵].
۶	<i>ITPKB</i>	miR-132	در تجمع و انباشت آمیلوئید بتا نقش دارد. <i>ITPKB</i> باعث فعال شدن آنزیم <i>BACE1</i> می‌شود و افزایش آن باعث افزایش فعالیت <i>BACE1</i> و در نتیجه باعث القای بیماری آلزایمر می‌شود [۲۶].
۷	<i>Sirt1</i>	miR-132	با د-استیل‌کردن اهداف پروتئینی مختلف، اثر محافظتی در برابر بیماری آلزایمر دارد. بیان بیش از حد <i>SIRT1</i> باعث کاهش تولید $A\beta$ و پلاک‌های آمیلوئیدی می‌شود در حالی که حذف <i>SIRT1</i> سطح $A\beta$ را افزایش می‌دهد. <i>SIRT1</i> علاوه بر کاهش پلاک‌های $A\beta$ ، قادر است سطح تاو فسفریله شده را از طریق د-استیل‌شدن تنظیم کند؛ بنابراین افزایش فعالیت <i>SIRT1</i> ممکن است برای بررسی راه‌های درمانی این بیماری مهم باشد [۲۷].
۸	<i>NOS1</i>	miR-132	در مسیر فسفریلاسیون تاو درگیر است. افزایش آن باعث افزایش هایپر فسفریلاسیون تاو شده و بدین ترتیب در بروز بیماری آلزایمر نقش ایفا می‌کند [۲۸].
۹	<i>PTEN</i>	miR-132, miR-212	در سمیت عصبی آمیلوئید بتا نقش دارد و مهار آن می‌تواند با سمیت عصبی ناشی از آمیلوئید بتا مقابله کند [۲۹].
۱۰	<i>FOXO3</i>	miR-132, miR-212	در سمیت عصبی آمیلوئید بتا نقش دارد و مهار آن می‌تواند با سمیت عصبی ناشی از آمیلوئید بتا مقابله کند [۲۹].
۱۱	<i>TNFAIP1</i>	miR-137	در سمیت عصبی آمیلوئید بتا نقش دارد. با غیرفعال کردن مسیر <i>NF-kB</i> از طریق هدف قرار دادن <i>TNFAIP1</i> ، سمیت عصبی ناشی از آمیلوئید بتا کاهش می‌یابد. فعال‌سازی مسیر <i>NF-kB</i> به تخریب نورون‌ها در <i>AD</i> کمک می‌کند. بنابراین، مهار مسیر <i>NF-kB</i> ممکن است در درمان بیماران آلزایمری مؤثر باشد [۳۰].
۱۲	<i>BDNF</i>	miR-10a	<i>BDNF</i> به عنوان یک نوروتروفین برای جنبه‌های مختلف عصبی از جمله بقای سلولی و انعطاف‌پذیری سیناپسی در سیستم عصبی مرکزی (<i>CNS</i>) ضروری است و باعث افزایش تمایز و بهبود بقای بافت‌های عصبی می‌شود و تغییر در بیان <i>BDNF</i> در زیرگروه‌های عصبی خاص ممکن است به آلزایمر منجر شود [۳۱].
۱۳	<i>Rb1</i>	miR-26b	تزریق $A\beta_{42}$ در رت باعث از دست رفتن حافظه و یادگیری می‌شود؛ اما تزریق <i>Rb1</i> می‌تواند این فرایند را معکوس کند و موجب بهبودی شود. همچنین <i>Rb1</i> می‌تواند عملکردهای شناختی و حافظه را با مهار سطوح میانجی‌گرهای پیش‌آپوپتوزی در مغز رت بهبود بخشد [۳۲].
۱۴	<i>UCHL1</i>	miR-922	افزایش بیش‌ازحد آن باعث کاهش عملکردهای سیناپسی و شناختی در موش می‌شود [۳۳].
۱۵	<i>RARA</i>	miR-138	در فسفریلاسیون تاو نقش دارد و مهار آن باعث افزایش هایپر فسفریلاسیون تاو می‌شود [۳۴].
۱۶	<i>SNX6</i>	miR-98-5p	در افزایش مقدار $A\beta_{40}$ ، $A\beta_{42}$ و نیز <i>BACE1</i> و ژن‌های دیگر دخیل در بیماری آلزایمر نقش دارد [۳۵].
۱۷	<i>ROCK1</i>	miR-146a	در هایپر فسفریلاسیون پروتئین تاو نقش دارد. مهار آن باعث کاهش فسفریلاسیون غیرطبیعی تاو می‌شود [۳۶].
۱۸	<i>VAMP2</i>	miR-34C	در اختلال سیناپسی نقش دارد. از آنجا که <i>VAMP2</i> به شدت در همجوشی وزیکول سیناپسی نقش دارد، تغییر در سطح بیان آن ممکن است باعث تغییر در انتقال دهنده‌های عصبی شود. میزان <i>VAMP2</i> در بیماران مبتلا به آلزایمر کاهش می‌یابد [۳۷].
۱۹	<i>SPHK1</i>	miR-125b	موجب بهبود شرایط بیماری در موش‌های مدل آلزایمری می‌شود و کاهش آن در نورون‌ها باعث کاهش ترشح <i>SPM</i> ها و فاگوسیتوز غیرطبیعی مشابه با شرایط بیماری آلزایمر می‌شود [۳۸].
۲۰	<i>VAV1</i>	miR-330	بیان بیش‌ازحد آن در بیماران آلزایمری با استرس اکسیداتیو و از کارافتادگی میتوکندریایی در ارتباط است [۳۹].
۲۱	<i>ApoE</i>	miR-1908	در پاک‌سازی آمیلوئید بتا نقش دارد؛ بنابراین افزایش بیان آن باعث کاهش تجمع آمیلوئید بتا می‌شود [۴۰].

APP: amyloid precursor protein / BACE1: β -site amyloid precursor protein cleaving enzyme / Fyn: Src family tyrosine kinase / PTPN1: protein tyrosine phosphatase non-receptor type 1 / ITPKB: inositol-trisphosphate 3-kinase B / Sirt1: sirtuin 1 / NOS1: nitric oxide synthase1 / PTEN: phosphatase and tensin homolog / FOXO3: forkhead box O3 / TNFAIP1: TNF alpha induced protein 1 / BDNF: Brain-derived neurotrophic factor / Rb1: RB transcriptional corepressor 1 / UCHL1: ubiquitin C-terminal hydrolase L1 / RARA: retinoic acid receptor alpha / SNX6: sorting nexin 6 / ROCK1: Rho associated coiled-coil containing protein kinase 1 / VAMP2: vesicle associated membrane protein 2 / SPHK1: sphingosine kinase 1 / VAV: vav guanine nucleotide exchange factor 1 / ApoE: apolipoprotein E

وجود خواهد داشت. همچنین در مواردی که یک داده پایگاه و ابزار بیوانفورماتیکی آن قادر به پیش‌بینی جفت شدن میکروRNA و رونوشت ژن موردنظر نبود، نمره صفر به عنوان کمترین عدد ممکن برای اتصال آن میکروRNA به ژن هدف در نظر گرفته شد.

نتایج

عدم پیش‌بینی اتصال تعدادی از میکروRNAها به ژن‌های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی

بر اساس بررسی‌های انجام شده، از تعداد ۴۱ میکروRNA مورد بررسی در این تحقیق، اتصال ۱۱ مورد از آن‌ها به ژن‌های هدف گزارش شده در مطالعات آزمایشگاهی توسط هیچ‌کدام از نرم‌افزارهای برخط مورد استفاده شامل Diana-microT، TargetScan و MirTarget تأیید نشد. نوع این میکروRNAها و ژن‌های هدف مربوط به هریک از آن‌ها در جدول ۲ خلاصه شده است.

بررسی اتصال میکروRNAهای موردنظر به ژن‌های هدف با استفاده از سه ابزار بیوانفورماتیکی برخط

پس از تهیه لیستی از ژن‌ها و میکروRNAهای مرتبط با بیماری آلزایمر، در مرحله بعد قابلیت اتصال هر میکروRNA معرفی شده برای هر ژن که در نتایج تحقیقات آزمایشگاهی معرفی شده بود، توسط سه نرم‌افزار برخط پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAها شامل داده پایگاه‌ها و نرم‌افزارهای برخط miRDB که از ابزار بیوانفورماتیکی جدید MirTarget استفاده می‌کند، TargetScan و Diana-microT مورد ارزیابی و مقایسه قرار گرفت. در هر نرم‌افزار پس از بررسی امکان اتصال هر میکروRNA به هر ژن، نمره‌ای از صفر تا ۱۰۰ توسط الگوریتم نرم‌افزار به اتصال آن میکروRNA به ژن هدف مورد نظر اختصاص داده می‌شود. هر چه این نمره به ۱۰۰ نزدیک‌تر باشد نشان دهنده این است که به احتمال زیاد آن میکروRNA به رونوشت ژن مورد نظر متصل خواهد شد و پیش‌بینی انجام شده به واقعیت نزدیک‌تر است و در نتیجه امکان تنظیم بیان آن ژن به وسیله آن میکروRNA خاص

جدول ۲: میکروRNAهای با عدم پیش‌بینی اتصال به رونوشت ژن‌های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی

ردیف	نوع میکروRNA	ژن هدف	نمره Diana-microT	نمره TargetScan	نمره MirTarget
۱	miR-200-b	APP	.	.	.
۲	miR-186	BACE1	.	.	.
۳	miR-132	Tau	.	.	.
۴	miR-132	ITPKB	.	.	.
۵	miR-132	NSO1	.	.	.
۶	miR-132	PTEN	.	.	.
۷	miR-212	PTEN	.	.	.
۸	miR-137	TNFAIP1	.	.	.
۹	miR-146a	ROCK1	.	.	.
۱۰	miR-125b	SPHK1	.	.	.
۱۱	miR-330	VAV1	.	.	.

میکروRNA را به رونوشت ژن‌های هدف پیش‌بینی نمود که دو نرم‌افزار دیگر قادر به پیش‌بینی آن‌ها نبودند. نرم‌افزار TargetScan اتصال دو میکروRNA را به ژن‌های هدف گزارش شده، پیش‌بینی نمود که دو نرم‌افزار دیگر نتوانستند آن‌ها را پیش‌بینی کنند. اما نرم‌افزار Diana-microT نتوانست اتصال هیچ میکروRNAی را از میان ۴۱ مورد بررسی شده پیش‌بینی نماید که توسط دو نرم‌افزار دیگر پیش‌بینی نشده باشند.

میکروRNAهای با قابلیت پیش‌بینی اتصال به ژن‌های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط یکی از نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی

نتایج اتصال ۴۱ میکروRNA گزارش شده برای ۲۱ ژن مرتبط با بیماری آلزایمر که فقط توسط یکی از سه ابزار بیوانفورماتیکی شامل TargetScan، MirTarget و Diana-microT پیش‌بینی شد، در جدول ۳ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که ابزار MirTarget اتصال چهار

جدول ۳: میکروRNAهای با پیش بینی اتصال به رونوشت ژن های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط یکی از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی

ردیف	نوع میکروRNA	ژن هدف	نمره Diana-microT	نمره Target-Scan	نمره MirTarget
۱	miR-1908	<i>ApoE</i>	.	۹۰	.
۲	miR-106b	<i>Fyn</i>	.	۸۸	.
۳	miR-298	<i>BACE1</i>	.	.	۷۶
۴	miR-328	<i>BACE1</i>	.	.	۷۶
۵	miR-107	<i>BACE1</i>	.	.	۶۰
۶	miR-98-5p	<i>SNX6</i>	.	.	۵۰

میکروRNAهای با قابلیت پیش بینی اتصال به ژن های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر، حداقل توسط دو نرم افزار بیوانفورماتیکی

از میان ۴۱ میکروRNA گزارش شده برای ۲۱ ژن مرتبط با بیماری آلزایمر، ژن هدف تعدادی از آنها حداقل توسط دو تا از سه ابزار بیوانفورماتیکی شامل TargetScan، MirTarget و Diana-microT قابل پیش بینی و نمره دهی بود که در جدول ۴ نشان داده شده است. نتایج نشان داد که قابلیت اتصال miR-10a که بر اساس گزارش های موجود به ژن BDNF متصل می شود، توسط هر دو نرم افزارهای

TargetScan و Diana-microT با نمره بالایی تأیید شد. همچنین قابلیت اتصال miR-132 به ژن Sirt1 به طور مشترک توسط نرم افزارهای Diana-microT و MirTarget با نمره تقریباً بالایی قابل پیش بینی بود؛ اما نرم افزارهای TargetScan و MirTarget توانستند به طور مشترک اتصال ۱۳ مورد از ۴۱ میکروRNA مورد بررسی را به ژن های هدف پیش بینی نمایند (جدول ۴). لازم به ذکر است که میانگین نمره دهی TargetScan در پیش بینی اتصال این ۱۳ میکروRNA حدود ۸۹ بود؛ اما میانگین نمره دهی MirTarget حدود ۷۹ به دست آمد.

جدول ۴: میکروRNAهای با پیش بینی اتصال به رونوشت ژن های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط حداقل دو نرم افزار بیوانفورماتیکی

ردیف	نوع میکروRNA	ژن هدف	نمره Diana-microT	نمره Target-Scan	نمره MirTarget
۱	miR-10a	<i>BDNF</i>	۹۹	۹۹	.
۲	miR-132	<i>Sirt1</i>	۹۹	.	۸۹
۳	miR-34C	<i>VaMp2</i>	.	۸۲	۹۴
۴	miR-153	<i>APP</i>	.	۹۸	۹۲
۵	miR-26b	<i>Rb1</i>	.	۷۳	۹۱
۶	miR-106a	<i>APP</i>	.	۹۷	۸۹
۷	miR-17-5p	<i>APP</i>	.	۹۷	۸۹
۸	miR-520c	<i>APP</i>	.	۹۵	۸۵
۹	miR-135b	<i>BACE1</i>	.	۹۳	۷۶
۱۰	miR-135a	<i>BACE1</i>	.	۹۲	۷۶
۱۱	miR-16	<i>APP</i>	.	۹۵	۶۹
۱۲	miR-29a/b	<i>BACE1</i>	.	۸۹	۶۸
۱۳	miR-29c	<i>BACE1</i>	.	۷۷	۶۸
۱۴	miR-195	<i>BACE1</i>	.	۹۰	۶۵
۱۵	miR-124	<i>BACE1</i>	.	۸۳	۶۰

میکروRNAهای با قابلیت پیش بینی اتصال به ژن های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط سه نرم افزار بیوانفورماتیکی

نتایج پیش بینی اتصال میکروRNA به رونوشت ژن هدف از میان ۴۱ میکروRNA گزارش شده برای ۲۱ ژن مرتبط با بیماری آلزایمر نشان داد که ۹ عدد از میکروRNAها توسط

هر سه نرم افزار برخط شامل MirTarget، TargetScan و Diana-microT قابل پیش بینی و نمره دهی بودند که مشخصات آنها و میزان نمره دهی هر یک از ابزارها به اتصال های مورد نظر در جدول ۵ نشان داده شده است. البته لازم به ذکر است که در مورد پیش بینی اتصال این ۹ میکروRNA، دامنه نمره دهی Diana-microT از ۹۱ تا ۹۹ با

میانگین ۸۹/۴۴ بود.

میانگین ۹۸/۷۸، دامنه نمره‌دهی TargetScan از ۸۸ تا ۹۹ با
میانگین ۹۵/۳۳ و دامنه نمره‌دهی MirTarget از ۷۶ تا ۹۷ با

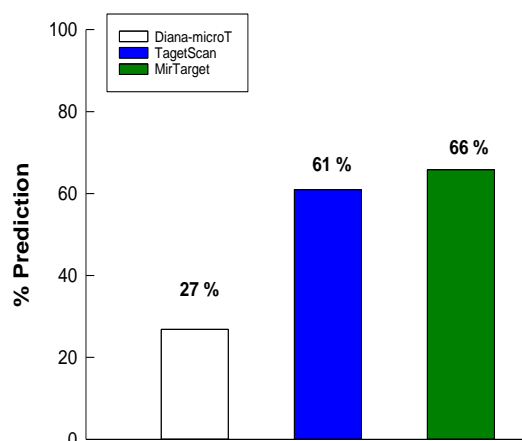
جدول ۵: میکروRNAهای با پیش‌بینی اتصال به ژن‌های هدف مرتبط با بیماری آلزایمر توسط سه ابزار بیوانفورماتیکی

ردیف	نوع میکروRNA	ژن هدف	نمره Diana-microT	نمره Target-Scan	نمره MirTarget
۱	miR-138	RARA	۹۰	۹۹	۹۷
۲	miR-339-5p	BACE1	۹۷	۹۷	۹۷
۳	miR-101	APP	۹۸	۹۹	۹۵
۴	miR-922	UCHL1	۹۲	۹۹	۹۴
۵	miR-20a	APP	۹۴	۹۶	۸۹
۶	miR-106b	APP	۹۱	۹۶	۸۹
۷	miR-132	FOXO3	۹۹	۹۰	۸۴
۸	miR-212	FOXO3	۹۹	۸۸	۸۴
۹	miR-124	PTPNI	۹۳	۹۴	۷۶

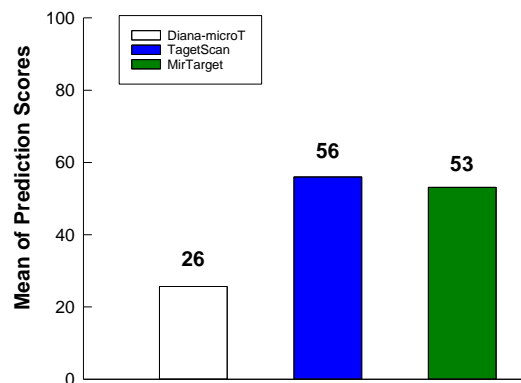
مقایسه درصد پیش‌بینی و میانگین کل نمره‌دهی پیش‌بینی اتصال میکروRNAهای بررسی شده به رونوشت ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر توسط سه نرم‌افزار بیوانفورماتیکی در ادامه بررسی‌ها تعداد میکروRNAهایی که ژن هدف آنها توسط هر نرم‌افزار پیش‌بینی شد، شمارش گردید و مشخص شد که نرم‌افزار Diana-microT در کل اتصال ۱۱ میکروRNA (۲۷ درصد)، TargetScan در کل اتصال ۲۵ میکروRNA (۶۱ درصد) و MirTarget در کل اتصال ۲۷ میکروRNA (۶۶ درصد) را پیش‌بینی کرده است. میانگین نمره‌های گزارش شده، پیش‌بینی نمودند (نمودار ۱). میانگین نمره‌های تعلق گرفته به پیش‌بینی‌های انجام شده برای هر نرم‌افزار نیز محاسبه گردید و مشخص شد که میانگین نمره‌های پیش‌بینی در نرم‌افزار Diana-microT برابر با ۲۶، در TargetScan برابر با ۵۳ و در MirTarget برابر با ۵۳ از ۱۰۰ برای ۴۱ میکروRNA بررسی شده بود (نمودار ۲).

مقایسه درصد پیش‌بینی و میانگین کل نمره‌دهی پیش‌بینی اتصال میکروRNAهای بررسی شده به رونوشت ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر توسط سه نرم‌افزار بیوانفورماتیکی

در ادامه بررسی‌ها تعداد میکروRNAهایی که ژن هدف آنها توسط هر نرم‌افزار پیش‌بینی شد، شمارش گردید و مشخص شد که نرم‌افزار Diana-microT در کل اتصال ۱۱ میکروRNA (۲۷ درصد)، TargetScan در کل اتصال ۲۵ میکروRNA (۶۱ درصد) و MirTarget در کل اتصال ۲۷ میکروRNA (۶۶ درصد) را پیش‌بینی کرده است.



نمودار ۱: مقایسه درصد پیش‌بینی اتصال ۴۱ میکروRNA بررسی شده به ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر توسط سه ابزار بیوانفورماتیکی



نمودار ۲: مقایسه میانگین نمره‌دهی پیش‌بینی اتصال ۴۱ میکروRNAی به ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر توسط سه نرم‌افزار بیوانفورماتیکی

بحث و نتیجه‌گیری

از زمان کشف اولین میکروRNAها و ژن‌های هدف آن‌ها در سال ۱۹۹۳، شناسایی و معرفی میکروRNAها رشد چشمگیری داشته است. شناسایی ژن‌های هدف میکروRNAها نیز یکی از عوامل مهم در مشخص شدن عملکرد آن‌ها به شمار می‌آید. با توجه به این که هر میکروRNA می‌تواند بیان ژن‌های مختلف را کنترل کند و هر ژن به وسیله میکروRNAهای زیادی تحت تأثیر قرار می‌گیرد؛ بنابراین بررسی تغییرات بیان ژن در اثر میکروRNAها بسیار پرهزینه و زمان‌بر است. در سال‌های اخیر روش‌های تشخیص و آنالیز میکروRNAها به سرعت توسعه یافته است. با این وجود آنالیز میکروRNAها با توجه به ویژگی‌های منحصر به فرد آن‌ها مانند کوچک بودن توالی، فراوانی کم و شباهت در توالی بین اعضای یک خانواده نیازمند شرایط ویژه‌ای است. اندازه کوچک میکروRNAها بسیاری از روش‌های سنجش آن‌ها که بر پایه PCR و یا هیبریداسیون است را پیچیده کرده است؛ زیرا پرایمرهای استفاده شده در بسیاری از PCRهای معمولی از نظر طول به میکروRNAها شبیه‌اند و پرایمرهای کوتاه‌تر از پرایمرهای معمول برای سنجش آن‌ها نیاز است که این عامل بر روی بازده PCR تأثیرگذار خواهد بود. همچنین در روش‌های تشخیصی بر پایه هیبریداسیون، نشان‌دار کردن پروب کوتاه برای شناسایی میکروRNA دشوار است. در ضمن دمای ذوب پروب دو رشته‌ای و توالی هدف آن نیز پایین است که به شدت باعث کاهش میزان هیبریداسیون و افزایش تلاقی هیبریداسیون می‌شود؛ بنابراین افزایش استراتژی‌های جدید در جهت افزایش اختصاصیت اندازه‌گیری پروفایل میکروRNAها، ضروری است

[۱۹]. با توجه به محدودیت‌های موجود در مطالعه میکروRNAها، پیش‌بینی ژن‌های هدف آن‌ها به کمک روش‌های محاسباتی و بیوانفورماتیکی می‌تواند به پیشرفت تحقیقات در این زمینه کمک شایانی نماید. از سال ۲۰۰۲، ابزارهای بیوانفورماتیکی به منظور تحقیق در مورد میکروRNAها همراه با توسعه روش‌های آزمایشگاهی گسترش یافته‌اند. با وجود پیشرفت‌های فراوان در زمینه برنامه‌های پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها، الگوریتم‌ها و ابزارهای بیوانفورماتیکی که در دسترس هستند هنوز کارایی کاملی ندارند و در پیش‌بینی ژن‌های هدف اشتباهات مکرر دارند و این امر در انجام کارهای آزمایشگاهی مشکلاتی را برای محققین به وجود می‌آورد که گاهی از نظر زمانی و اقتصادی بسیار هزینه‌بر است [۴۲، ۴۱]؛ بنابراین شناسایی نقاط ضعف و قوت این ابزارها و پیشرفت‌های بیشتر در پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی از چالش‌های مهم تحقیقات حال و آینده است [۴۳، ۴۴].

در این مطالعه نظری، ۴۱ میکروRNA متصل‌شونده به ۲۱ ژن مرتبط با بیماری آلزایمر بر اساس نتایج کارهای آزمایشگاهی و تجربی بر روی مدل‌های حیوانی و یا در بیماران آلزایمری انتخاب شدند و پیش‌بینی اتصال این میکروRNAها به ژن‌های مربوطه به وسیله سه ابزار بیوانفورماتیکی و نرم‌افزار برخط شامل Diana-، TargetScan، MirTarget و microT بررسی شد. با توجه به نتایج حاصل از این بررسی مشاهده شد که اتصال ۱۱ مورد از ۴۱ میکروRNA بررسی شده به رونوشت ژن‌های هدف شامل اتصال miR-200-b به

مورد استفاده در این تحقیق قدرت پیش‌بینی بیشتری دارد. نتایج همچنین مشخص نمود که میانگین نمره اهداف پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار MirTarget کم‌تر از میانگین نمره اهداف پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار TargetScan است که ممکن است به دلیل حساسیت بالای الگوریتم به کار گرفته شده و ارتقاء یافته در ابزار MirTarget در نمره‌دهی به اتصال‌های مورد نظر باشد؛ زیرا این ابزار علاوه بر بررسی امکان اتصال میکروRNA به ژن هدف، داده‌های مربوط به کاهش بیان ژن هدف را نیز مدنظر قرار می‌دهد [۴۵]. بر اساس این پیشنهاد ارائه شده می‌توان نتیجه گرفت که اگر اهداف پیش‌بینی شده توسط ابزار MirTarget نمره بالایی داشته باشند، به احتمال زیاد در بررسی آزمایشگاهی نیز از صحت و دقت بیشتری برخوردار خواهند بود؛ بنابراین می‌توان به محققین پیشنهاد نمود که برای پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAها یکی از گزینه‌های بسیار مناسب که نتایج عملکردی یعنی امکان کاهش بیان ژن هدف را نیز بررسی می‌کند، ابزار MirTarget است.

این احتمال وجود دارد که اگر حداقل دو ابزار از ابزارهای بیوانفورماتیکی اتصال میکروRNAها به ژن‌های هدف را پیش‌بینی نمایند، نتیجه می‌تواند از اعتبار بیشتری برخوردار باشد. بر اساس نتایجی که در این مطالعه به دست آمد، ژن‌های هدف ۱۵ مورد از ۴۱ میکروRNAی بررسی شده در این تحقیق حداقل توسط دو ابزار بیوانفورماتیکی مورد استفاده قابل پیش‌بینی بود. نتایج جدول ۴ نشان داد که اتصال miR-10a به ژن *BDNF* به طور مشترک توسط Diana-microT و TargetScan، اتصال miR-132 به ژن *Sirt1* به طور مشترک توسط Diana-microT و MirTarget و اتصال ۱۳ میکروRNA شامل اتصال miR-34C به ژن *Vamp2*، miR-26b به *Rb1*، اتصال miR-153، miR-106a، miR-17-5p، miR-520c و miR-16 به ژن *APP* اتصال miR-135a، miR-135b، miR-29a/b، miR-124 و miR-195، 29c به ژن *BACE1* به طور مشترک توسط MirTarget و TargetScan قابل پیش‌بینی و نمره‌دهی بودند. بر اساس نتایج این بخش، دو ابزار MirTarget و TargetScan در مجموع برتری نسبی بر Diana-microT نشان دادند.

در ادامه بررسی‌ها، امکان پیش‌بینی اتصال میکروRNAها به ژن‌های هدف به طور مشترک توسط هر سه ابزار بیوانفورماتیکی نیز بررسی شد و نتایج نشان داد که ژن‌های

APP، miR-186 به *BACE1*، miR-132 به *Tau*، miR-132 به *JTPKB*، miR-132 به *NOS1*، miR-137 به *PTEN*، miR-212 به *TNFAIP1*، miR-146a به *ROCK1*، miR-125b به *SPHK1* و miR-330 به *VAV1* توسط هیچ‌کدام از سه ابزار مورد استفاده قابل پیش‌بینی نبود. در تفسیر این نتایج می‌توان پیشنهاد نمود در مطالعاتی که ارتباط بین این میکروRNAها و ژن‌های مورد نظر را گزارش کرده‌اند و تغییراتی در بیان این ژن‌های هدف مشاهده شده است، احتمالاً این میکروRNAها به طور مستقیم بر بیان این ژن‌ها تأثیر نگذاشته باشند و به رونوشت این ژن‌ها نچسبیده باشند بلکه ممکن است به طور غیرمستقیم و از طریق تأثیر بر بیان عوامل دیگری مانند سایر میکروRNAها و یا ژن‌های دیگر، موجب تغییر در بیان ژن‌های گزارش شده برای این نوع از میکروRNAها شده باشند [۴۵]. البته می‌توان در حالت بدبینانه‌تری نیز پیشنهاد نمود که گزارش‌های موجود در مورد اتصال این میکروRNAها به ژن‌های گزارش شده برای آن‌ها از صحت کافی برخوردار نبوده و ادعای ارتباط آن‌ها با بیماری آرایمر نیازمند آزمایش‌های بیشتری است.

برای پی بردن به توانایی اختصاصی هر یک از سه نرم‌افزار، سعی بر آن بود احتمال اتصال میکروRNAهای مورد نظر که به طور انحصاری توسط یک نرم‌افزار قابل پیش‌بینی باشد، مورد بررسی قرار گیرد. نتایج به دست آمده نشان داد که در این مورد Diana-microT ضعیف‌ترین عملکرد را دارد و هیچ میکروRNAی نبود که این نرم‌افزار بتواند اتصال آن را به ژن هدف پیش‌بینی نماید در حالی که برای دو نرم‌افزار دیگر قابل پیش‌بینی نبوده باشد. نتایج همچنین نشان داد که TargetScan قادر به پیش‌بینی اتصال دو میکروRNA شامل miR-1908 به *ApoE* و miR-106b به *Fyn* بود در حالی که دو ابزار دیگر یعنی MirTarget و Diana-microT برای این موارد قادر به پیش‌بینی ژن هدف نبودند. نتایج همچنین نشان داد که در چهار مورد از میکروRNAهای بررسی شده، ابزار بیوانفورماتیکی MirTarget توانست اتصال miR-298، miR-328 و miR-107 به ژن *BACE1* و اتصال miR-98-5p به ژن *SNX6* را پیش‌بینی و در حد بالایی نمره‌دهی کند و این در حالی بود که TargetScan و Diana-microT قادر به پیش‌بینی هیچ‌کدام از این موارد نبودند. با توجه به نتایجی که در این بخش حاصل شد می‌توان پیشنهاد نمود که ابزار MirTarget نسبت به سایر ابزارهای

ویژگی‌های حساسیت و اختصاصیت هستند؛ اما می‌توانند به محققینی که اهداف جدید میکروRNAها را بررسی می‌کنند، کمک‌های ارزشمندی ارائه دهند [۴۳]. در این مطالعه نتایج منتشر شده در مورد تأثیر تعدادی میکروRNA در کنترل بیان ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر توسط سه ابزار بیوانفورماتیکی مورد بررسی مجدد قرار گرفت. با توجه به تنوع ابزارهای بیوانفورماتیکی، نتایج چنین تحقیقات نظری نیز می‌تواند با تعیین میزان دقت و کارایی ابزارهای موجود برای انجام پیش‌بینی‌های دقیق‌تر در این زمینه مؤثر باشد و به نظر می‌رسد که با ادغام چنین رویکردهای محاسباتی با نتایج حاصل از مطالعات تجربی برای ژن‌ها و بیماری‌های مختلف، تحقیقات در مورد ژن‌های هدف میکروRNAها موفق‌تر از گذشته خواهد بود. از آنجایی که الگوریتم‌های موجود برای پیش‌بینی اهداف میکروRNAها بر فرضیات مختلفی متکی هستند و از الگوهای جفت‌شوندگی مختلفی بین میکروRNA و رونوشت ژن هدف استفاده می‌کنند، به نظر می‌رسد ترکیب نتایج حاصل از ابزارهای مختلف یک رویه مناسب باشد و اغلب در کاهش مثبت‌های کاذب و نتایج منفی یا عدم درستی در پیش‌بینی اتصال میکروRNA به ژن هدف تا حد امکان مؤثر باشد. بر این اساس، با بررسی توانایی ابزارهای بیوانفورماتیکی جدید مشاهده می‌شود که الگوریتم‌های موجود به تدریج دقیق‌تر شوند و با بهره‌گیری از دانش جدید به طور مداوم بهبود می‌یابند [۴۴، ۴۸].

داده پایگاه miRDB یک پایگاه اطلاعاتی برخط برای پیش‌بینی اهداف و تفسیر عملکردی اتصال میکروRNAها به رونوشت ژن‌های هدف است [۴۹]. همه ژن‌های هدف میکروRNAها در miRDB به وسیله یک ابزار بیوانفورماتیکی به نام MirTarget به‌وسیله آنالیز هزاران برهمکنش میکروRNA با ژن‌های هدف که از آزمایش‌های توالی‌یابی با توان بالا به دست آمده‌اند، پیش‌بینی می‌شوند. نسخه جدید ابزار بیوانفورماتیکی جدید MirTarget در داده‌پایگاه miRDB در سال ۲۰۱۹ به عنوان جدیدترین و بهترین مدل در شناسایی عملکردی ژن‌های هدف میکروRNAها معرفی شده است [۴۵]. همچنین در داده پایگاه miRDB با ترکیب آنالیزهای عملکردی و استخراج داده‌های مقالات، میکروRNAهای فعال و عملکردی در موش و انسان که موجب تغییراتی واقعی در بیان ژن با عواقب عملکردی در سلول و تغییر در عملکردهای فیزیولوژیک شده‌اند، شناسایی و معرفی شده‌اند [۴۵]. به طور کلی با توجه به سخت‌گیری

هدف ۹ میکروRNA از ۴۱ مورد بررسی شده توسط هر سه ابزار قابل پیش‌بینی بود. بر اساس نتایج این بخش، اتصال miR-138 به *RARA*، miR-339-5p به *BACE1*، miR-101، miR-20a و miR-106b به *APP*، miR-922 به *UCHL1*، miR-132 و miR-212 به *FOXO3* و miR-124 به *PTPN1* توسط هر سه ابزار پیش‌بینی گردید. شاید بتوان ادعا نمود که گزارش‌های موجود در مورد این میکروRNAها و اتصال آن‌ها به ژن‌های هدف گزارش شده از صحت کافی برخوردار باشند و می‌توانند در تحقیقات آزمایشگاهی با اطمینان بیشتری مورد استناد قرار گیرند.

با توجه به این که هر یک از ابزارهای TargetScan و MirTarget حدود ۹۱ درصد (۱۰ میکروRNA از ۱۱ مورد) از اهداف میکروRNAهای قابل پیش‌بینی توسط Diana-microT را پیش‌بینی نمودند، می‌توان این‌گونه پیشنهاد نمود که در پیش‌بینی میکروRNAهای با قابلیت اتصال به ژن‌های هدف دخیل در بیماری آلزایمر، نیاز خاصی به استفاده از Diana-microT وجود ندارد. همچنین اگرچه ابزار MirTarget در مقایسه با TargetScan درصد بیشتری (به ترتیب ۶۶ درصد و ۶۱ درصد) از اتصال میکروRNAهای مورد بررسی به رونوشت ژن‌های مورد نظر را پیش‌بینی نمود؛ اما میزان همپوشانی نتایج این دو در حدود ۸۱/۵ درصد است که می‌تواند نشان‌دهنده توانایی بالای هر دوی این ابزارها در پیش‌بینی میکروRNAهای کنترل‌کننده ژن‌های دخیل در بیماری آلزایمر باشد. با این وجود میانگین نمره‌دهی به اتصال میکروRNAها به ژن‌های هدف در ابزار MirTarget کمتر از TargetScan بود (به ترتیب ۵۳ و ۵۶ درصد)؛ بنابراین، اگرچه نرم‌افزار برخط TargetScan نسبت به سایر نرم‌افزارها و ابزارهای موجود به طور وسیع‌تری در پیش‌بینی اتصال میکروRNAها به رونوشت ژن‌های هدف استفاده می‌شود؛ اما بر اساس نتایج حاصل از بررسی‌های به عمل آمده در این مطالعه نظری، استفاده از ابزار بیوانفورماتیکی جدید MirTarget در داده پایگاه miRDB برای دستیابی به نتایج عملکردی یا به عبارت دیگر منجر شونده به تغییر در بیان ژن هدف توصیه می‌شود.

با توجه به فقدان داده‌های با کیفیت بالا از مطالعات تجربی، تلاش‌ها برای توسعه الگوریتم‌های ابزارهای بیوانفورماتیکی در زمینه پیش‌بینی ژن هدف میکروRNAها با محدودیت‌هایی نیز مواجه است [۴۶، ۴۷]. اگرچه این الگوریتم‌ها هنوز فاقد

آزمایشگاهی در مورد نتایج عملکردی تغییرات بیان ژن در اثر تغییر در میزان میکروRNAها، استفاده ترکیبی از هر دو ابزار TargetScan و MirTarget می‌تواند در پیش‌بینی دقیق‌تر ژن‌های هدف میکروRNAهای دخیل در بیماری‌ها به ویژه بیماری آلزایمر مؤثرتر باشد و در راستای صرفه‌جویی در وقت و هزینه‌های اقتصادی برای بررسی‌های آزمایشگاهی برای محققین این حوزه بسیار کاربرد خواهد داشت.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچ‌گونه تضاد منافی ندارند.

References

1. Khaledi S, Ahmadi S. Cellular and molecular mechanisms of vitamin D deficiency in aging and Alzheimer's disease. *Shefaye Khatam* 2020; 8(3):97-110. [In Persian] doi:10.29252/shefa.8.3.97
2. Khaledi S, Ahmadi S. Amyloid Beta and Tau: from Physiology to Pathology in Alzheimer's disease. *Shefaye Khatam* 2016; 4(4):67-88. [In Persian] doi: 10.18869/acadpub.shefa.4.4.67
3. Nisbet RM, Polanco JC, Ittner LM, Götz J. Tau aggregation and its interplay with amyloid-beta. *Acta Neuropathol* 2015;129(2):207-20. doi: 10.1007/s00401-014-1371-2
4. Thal DR, Walter J, Saido TC, Fandrich M. Neuropathology and biochemistry of Abeta and its aggregates in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 2015;129(2):167-82. doi: 10.1007/s00401-014-1375-y
5. Kamenetz F, Tomita T, Hsieh H, Seabrook G, Borchelt D, Iwatsubo T, et al. APP processing and synaptic function. *Neuron* 2003;37(6):925-37. doi: 10.1016/s0896-6273(03)00124-7
6. O'Brien RJ, Wong PC. Amyloid precursor protein processing and Alzheimer's disease. *Annu Rev Neurosci* 2011;34:185-204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613
7. Han P, Shi J. A Theoretical Analysis of the Synergy of Amyloid and Tau in Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 2016;52(4):1461-70. doi: 10.3233/JAD-151206
8. Ahmadi S, Zobeiri M, Bradburn S. Molecular mechanisms underlying actions of certain long noncoding RNAs in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis* 2020;35(5):681-93. doi: 10.1007/s11011-020-00564-9
9. Delay C, Mandemakers W, Hebert SS. MicroRNAs in Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis* 2012;46(2):285-90. doi: 10.1016/j.nbd.2012.01.003
10. Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Bergmans B, Papadopoulou AS, Delacourte A, et al. MicroRNA regulation of Alzheimer's Amyloid precursor protein expression. *Neurobiol Dis* 2009;33(3):422-8. doi: 10.1016/j.nbd.2008.11.009
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis,

الگوریتم MirTarget در نمره‌دهی به میزان جفت‌شدگی میکروRNA و رونوشت ژن هدف و نیز لحاظ نمودن داده‌های مربوط به کاهش بیان قابل تشخیص در ژن مورد نظر و کاهش در پروتئین حاصل از آن، می‌تواند نتایج حاصل از پیش‌بینی ژن‌های هدف میکروRNAها توسط ابزار MirTarget را به واقعیت نزدیک‌تر دانست [۴۵]. با این وجود با توجه به محدودیت‌های موجود در جهت کامل شدن الگوریتم ابزارهای بیوانفورماتیک برای پیش‌بینی دقیق ژن‌های هدف میکروRNAها، عدم کامل بودن میکروRNAهای شناسایی شده و ثبت شده در داده پایگاه‌ها و نیز کامل نبودن داده‌های

- mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5
12. Li LC, Okino ST, Zhao H, Pookot D, Place RF, Urakami S, et al. Small dsRNAs induce transcriptional activation in human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(46):17337-42. doi: 10.1073/pnas.0607015103
 13. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature* 2004;431(7006):350-5. doi: 10.1038/nature02871
 14. Parvini N, Ahmadi S. Role of MicroRNAs in Development of Immune Cells and Nervous System and their Relation to Multiple Sclerosis. *The Neuroscience Journal of Shefaye Khatam* 2015; 3:131-44. [In Persian] doi:10.18869/acadpub.shefa.3.1.131
 15. Juzwik CA, S SD, Zhang Y, Paradis-Isler N, Sylvester A, Amar-Zifkin A, et al. microRNA dysregulation in neurodegenerative diseases: A systematic review. *Prog Neurobiol* 2019;182:101664. doi: 10.1016/j.pneurobio.2019.101664
 16. Quinlan S, Kenny A, Medina M, Engel T, Jimenez-Mateos EM. MicroRNAs in Neurodegenerative Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* 2017; 334:309-43. doi: 10.1016/bs.ircmb.2017.04.002
 17. Wang M, Qin L, Tang B. MicroRNAs in Alzheimer's Disease. *Front Genet* 2019;10:153. doi: 10.3389/fgene.2019.00153
 18. Kozomara A, Griffiths-Jones S. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Res* 2011;39(Database issue):D152-7. doi: 10.1093/nar/gkq1027
 19. Riffo-Campos AL, Riquelme I, Brebi-Mieville P. Tools for Sequence-Based miRNA Target Prediction: What to Choose? *Int J Mol Sci* 2016;17(12):1987. doi: 10.3390/ijms17121987
 20. Femminella GD, Ferrara N, Rengo G. The emerging role of microRNAs in Alzheimer's disease. *Front Physiol* 2015;6:40. doi: 10.3389/fphys.2015.00040
 21. Patel N, Hoang D, Miller N, Ansaloni S, Huang Q, Rogers JT, et al. MicroRNAs can regulate human APP levels. *Mol Neurodegener* 2008;3:10. doi: 10.1186/1750-1326-3-10

22. Lei X, Lei L, Zhang Z, Zhang Z, Cheng Y. Downregulated miR-29c correlates with increased BACE1 expression in sporadic Alzheimer's disease. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8(2):1565-74.
23. Derisbourg M, Leghay C, Chiappetta G, Fernandez-Gomez FJ, Laurent C, Demeyer D, et al. Role of the Tau N-terminal region in microtubule stabilization revealed by new endogenous truncated forms. *Sci Rep* 2015; 5:9659. doi: 10.1038/srep09659
24. Liu W, Zhao J, Lu G. miR-106b inhibits tau phosphorylation at Tyr18 by targeting Fyn in a model of Alzheimer's disease. *Biochem Biophys Res Commun* 2016;478(2):852-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2016.08.037
25. Wang X, Liu D, Huang HZ, Wang ZH, Hou TY, Yang X, et al. A Novel MicroRNA-124/PTPN1 Signal Pathway Mediates Synaptic and Memory Deficits in Alzheimer's Disease. *Biol Psychiatry* 2018;83(5):395-405. doi: 10.1016/j.biopsych.2017.07.023
26. Salta E, Sierksma A, Vanden Eynden E, De Strooper B. miR-132 loss de-represses ITPKB and aggravates amyloid and TAU pathology in Alzheimer's brain. *EMBO Mol Med* 2016;8(9):1005-18. doi: 10.15252/emmm.201606520
27. Donmez G. The Effects of SIRT1 on Alzheimer's Disease Models. *Int J Alzheimers Dis* 2012; 2012:509529. doi: 10.1155/2012/509529
28. Wang Y, Veremyko T, Wong AH, El Fatimy R, Wei Z, Cai W, et al. Downregulation of miR-132/212 impairs S-nitrosylation balance and induces tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2017;51:156-66. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.12.015
29. Zhao Y, Zhao R, Wu J, Wang Q, Pang K, Shi Q, et al. Melatonin protects against Abeta-induced neurotoxicity in primary neurons via miR-132/PTEN/AKT/FOXO3a pathway. *Biofactors* 2018;44(6):609-18. doi: 10.1002/biof.1411
30. He D, Tan J, Zhang J. miR-137 attenuates Abeta-induced neurotoxicity through inactivation of NF-kappaB pathway by targeting TNFAIP1 in Neuro2a cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;490(3):941-7. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.06.144
31. Wu BW, Wu MS, Guo JD. Effects of microRNA-10a on synapse remodeling in hippocampal neurons and neuronal cell proliferation and apoptosis through the BDNF-TrkB signaling pathway in a rat model of Alzheimer's disease. *J Cell Physiol* 2018;233(7):5281-92. doi: 10.1002/jcp.26328
32. Wang Y, Li Y, Yang W, Gao S, Lin J, Wang T, et al. Ginsenoside Rb1 inhibit apoptosis in rat model of Alzheimer's disease induced by Abeta1-40. *Am J Transl Res* 2018; 10(3): 796-805.
33. Ohrfelt A, Johansson P, Wallin A, Andreasson U, Zetterberg H, Blennow K, et al. Increased Cerebrospinal Fluid Levels of Ubiquitin Carboxyl-Terminal Hydrolase L1 in Patients with Alzheimer's Disease. *Dement Geriatr Cogn Dis Extra* 2016;6(2):283-94. doi: 10.1159/000447239
34. Wang X, Tan L, Lu Y, Peng J, Zhu Y, Zhang Y, et al. MicroRNA-138 promotes tau phosphorylation by targeting retinoic acid receptor alpha. *FEBS Lett*. 2015;589(6):726-9. doi: 10.1016/j.febslet.2015.02.001
35. Li Q, Li X, Wang L, Zhang Y, Chen L. miR-98-5p Acts as a Target for Alzheimer's Disease by Regulating Abeta Production Through Modulating SNX6 Expression. *J Mol Neurosci* 2016;60(4):413-20. doi: 10.1007/s12031-016-0815-7
36. Wang G, Huang Y, Wang LL, Zhang YF, Xu J, Zhou Y, et al. MicroRNA-146a suppresses ROCK1 allowing hyperphosphorylation of tau in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2016;6:26697. doi: 10.1038/srep26697
37. Hu S, Wang H, Chen K, Cheng P, Gao S, Liu J, et al. MicroRNA-34c Downregulation Ameliorates Amyloid-beta-Induced Synaptic Failure and Memory Deficits by Targeting VAMP2. *J Alzheimers Dis* 2015;48(3):673-86. doi: 10.3233/JAD-150432
38. Jin Y, Tu Q, Liu M. MicroRNA125b regulates Alzheimer's disease through SphK1 regulation. *Mol Med Rep* 2018;18(2):2373-80. doi: 10.3892/mmr.2018.9156
39. Zhou Y, Wang ZF, Li W, Hong H, Chen J, Tian Y, et al. Protective effects of microRNA-330 on amyloid beta-protein production, oxidative stress, and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease by targeting VAV1 via the MAPK signaling pathway. *J Cell Biochem* 2018;119(7):5437-48. doi: 10.1002/jcb.26700
40. Wang Z, Qin W, Wei CB, Tang Y, Zhao LN, Jin HM, et al. The microRNA-1908 up-regulation in the peripheral blood cells impairs amyloid clearance by targeting ApoE. *Int J Geriatr Psychiatry* 2018;33(7):980-6. doi: 10.1002/gps.4881
41. Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *RNA* 2004;10(10):1507-17. doi: 10.1261/rna.5248604
42. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010;11(8):R90. doi: 10.1186/gb-2010-11-8-r90
43. Min H, Yoon S. Got target? Computational methods for microRNA target prediction and their extension. *Exp Mol Med*. 2010;42(4):233-44. doi: 10.3858/emmm.2010.42.4.032
44. Chen L, Heikkinen L, Wang C, Yang Y, Sun H, Wong G. Trends in the development of miRNA bioinformatics tools. *Brief Bioinform* 2019;20(5):1836-52. doi: 10.1093/bib/bby054
45. Liu W, Wang X. Prediction of functional microRNA targets by integrative modeling of microRNA binding and target expression data. *Genome Biol* 2019;20(1):18. doi: 10.1186/s13059-019-1629-z
46. Reczko M, Maragkakis M, Alexiou P, Grosse I, Hatzigeorgiou AG. Functional microRNA targets in protein coding sequences. *Bioinformatics* 2012;28(6):771-6. doi: 10.1093/bioinformatics/bts043
47. Liu C, Mallick B, Long D, Rennie WA, Wolenc A, Carmack CS, et al. CLIP-based prediction of

mammalian microRNA binding sites. *Nucleic Acids Res* 2013;41(14):e138. doi: 10.1093/nar/gkt435

48. Dweep H, Sticht C, Gretz N. In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions. *Curr Genomics* 2013;14(2):127-36. doi: 10.2174/1389202911314020005

49. Wong N, Wang X. miRDB: an online resource for microRNA target prediction and functional annotations. *Nucleic Acids Res* 2015;43(Database issue):D146-52. doi: 10.1093/nar/gku1104

Comparing MicroRNA Target Gene Predictions Related to Alzheimer's Disease Using Online Bioinformatics Tools

Koraei Maryam¹, Ahmadi Shamseddin^{2*}

• Received: 16 May 2020

• Accepted: 10 Aug 2020

Introduction: The prediction of microRNAs related to target genes using bioinformatics tools saves time and costs of the experimental analyses. In the present study, the prediction of microRNA target genes relevant to Alzheimer's Diseases (AD) were compared with the experimentally reported data using different bioinformatics tools.

Method: A total of 41 microRNAs associated with 21 essential genes involved in AD were selected based on experimental results reported in previously published literature. Then, the prediction of the target gene for each microRNA was done using three bioinformatics tools, including MirTarget, TargetScan, and Diana-microT. The results of the predictions for all three tools considering the reported target genes were compared with each other.

Results: The results showed that MirTarget, TargetScan, and Diana-microT correctly predicted 66%, 61%, and 27% of microRNAs' attachment to the previously reported target genes involved in AD, respectively. However, none of the tools could predict the attachment of 22% of the microRNAs to the target genes reported in the literature.

Conclusion: It can be concluded that MirTarget and TargetScan can better predict the target gene for microRNAs involved in AD compared with Diana-microT. Considering the algorithm used in MirTarget, this bioinformatics tool provides more functional and accurate results in predicting the target genes for microRNAs and it is recommended for predicting the target genes of microRNAs. It can also be concluded that the reported target genes for microRNAs involved in AD need further investigations in some cases.

Keywords: MicroRNA, Bioinformatics, Target Gene Prediction, Alzheimer Disease

• **Citation:** Koraei M, Ahmadi S. Comparing MicroRNA Target Gene Predictions Related to Alzheimer's Disease Using Online Bioinformatics Tools. *Journal of Health and Biomedical Informatics* 2021; 7(4): 376-89. [In Persian]

1. M.Sc. Student in Cellular and Molecular Biology, Biological Science Dept., Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

2. Associate Professor in Physiology, Biological Science Dept., Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

*Corresponding Author: Shamseddin Ahmadi

Address: Biological Sciences Dept., Faculty of Science, University of Kurdistan, Pasdaran Blvd., Sanandaj, Iran

• Tel: +98-87-33660075

• Email: sh.ahmadi@uok.ac.ir