

مقاله پژوهشی

بررسی بیوانفورماتیکی اثر miRNAs بر بیان ژن‌های دخیل در فرآیند نورون‌زایی در مغز ماهی گورخری (*Danio rerio*)

مهدی بنایی^{۱*}، شیوا سگوند^۲

تاریخ پذیرش: مهر ۹۷

تاریخ دریافت: تیر ۹۷

چکیده

microRNAهای (miRNA) مختلفی در فرآیند تمایز سلول‌های عصبی و نورون‌زایی در مغز مهره-داران نقش دارند، اما بررسی‌های انجام شده بر miRNAهای در ماهیان و تعیین ژن‌های هدف آن‌ها بسیار محدود است. ریزآرایه به عنوان یک روش استاندارد برای مطالعه کلی ژن‌های تحت کنترل miRNAها است. اما هزینه بسیار زیاد این روش، استفاده از آن را در بسیاری از مواقع محدود کرده است. این در حالی است که با پیشرفت الگوریتم بیوانفورماتیکی و مدل‌سازی کامپیوتری می‌توان اهداف mRNA را برای miRNA پیش‌بینی کرد. از این رو، در مطالعه حاضر تلاش شده است تا از طریق بررسی بیوانفورماتیک ژن‌ها و miRNAهای دخیل در تنظیم ژن‌های فعال در تمایز سلول‌های عصبی و نورون‌زایی در مغز ماهی گورخری، با استفاده از نرم‌افزارهای پایگاه‌های Target Scan و DIANA ژن‌ها و miRNAهای مربوطه شناسایی شود. نتایج بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده نشان داد که بیان ژن‌های *neurod6b*، *neurod2*، *neurod4*، *olfm1a* و *olfm1b*، *gle1*، *sox11a*، *sox11b*، *cadm1b*، *notch2* و *notch1b* با بیشترین احتمال ممکن است در مسیر نورون‌زایی تحت تاثیر dre-miRNAs قرار گیرند. از این رو به نظر می‌رسد که محصول این ژن‌ها می‌تواند به عنوان کاندیدای مناسب جدیدی برای بررسی‌های تجربی شناخت مسیر نورون‌زایی در مغز ماهی گورخری در نظر گرفته شود.

واژگان کلیدی: *miRNAs*، *Target Scan*، *DIANA*، ماهی گورخری، نورون‌زایی.

۱- استادیار گروه شایلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران.

۲- کارشناس ارشد تکثیر و پرورش آبریان، گروه شایلات، دانشکده منابع طبیعی و محیط زیست، دانشگاه صنعتی خاتم الانبیاء (ص) بهبهان، بهبهان، ایران.

* نویسنده مسئول: mahdibanace@yahoo.com

مقدمه

نورون‌زایی توصیف کننده یک فرآیند فیزیولوژیک است که در طی آن سلول‌های بنیادی عصبی غیرتمایز یافته به نورن‌های بالغ و عملکردی و سلول‌های گلیال در سیستم عصبی تبدیل می‌شوند (Kawahara et al., 2012). در یک روند صحیح نورون‌زایی، همه فرآیندهای فیزیولوژیکی از جمله نوسازی سلول‌های بنیادی عصبی، اختصاصی شدن سرنوشت سلول‌ها، مهاجرت عصبی، بلوغ و ادغام سلول‌های عصبی، از طریق یک تعامل پویا بین عوامل رونویسی، کنترل اپی‌ژنتیک، microRNA (miRNA) های تنظیم کننده، پیام‌های خارج از سلولی از ریزمحیط (Niche) سلول‌های بنیادی، جایی که سلول‌های بنیادی در آنجا قرار دارند، تنظیم می‌شود (Shi et al., 2010). بیان بیش از ۲۶۴ نوع miRNA در طی تمایز و تکامل سلول‌های عصبی در مراحل مختلف رشد سیستم عصبی پستانداران حاکی از نقش آن‌ها در کنترل رشد و تمایز سیستم عصبی است. بیان بیشتر miRNAها در زمان رشد سلول‌های عصبی بسیار اندک است و در طی تمایز سلول‌های عصبی افزایش می‌یابد (Spronsen et al., 2013). بیش از ۱۴ نوع miRNA مختلف در رشد و تمایز آکسون‌ها نقش دارند. الگوی بیان بیش از ۵۱ نوع miRNA از جمله miR-185، miR-191، miR-146 و miR-200a در پاسخ به تغییر بیان گیرنده NMDA (ان-متیل دی‌آسپارتیک

نورون‌زایی توصیف کننده یک فرآیند فیزیولوژیک است که در طی آن سلول‌های بنیادی عصبی غیرتمایز یافته به نورن‌های بالغ و عملکردی و سلول‌های گلیال در سیستم عصبی تبدیل می‌شوند (Kawahara et al., 2012). اولین گام در نورون‌زایی، القای سلول‌های بنیادی عصبی و تقسیم سلولی به منظور افزایش تعداد سلول‌های اولیه عصبی است. تمایز سلول‌های بنیادی عصبی در نهایت منجر به تشکیل نورون‌های مختلف و سلول‌های گلیال می‌شود که در تشکیل سیستم عصبی مرکزی نقش مهمی ایفا می‌کنند (Kawahara et al., 2012).

مغز اندام بسیار پیچیده‌ای است، متشکل از انواع مختلف سلول‌های عصبی و غیرعصبی که یک شبکه ارتباطی بسیار پیچیده را تشکیل می‌دهند. مطالعات پیشین نشان می‌دهد که بیان بسیاری از ژن‌ها ممکن است در مراحل مختلف تکاملی و حتی اختلالات عصبی دستخوش تغییراتی شود. مطالعه بخش‌های عملکردی مغز در جانوران بالغ نشان می‌دهد که شکل‌گیری و تکامل سیستم عصبی مرکزی مرهون نسخه‌برداری و بیان ژن‌های منحصر به فرد دخیل در تکامل سیستم عصبی است

اسید، (N-methyl-D-aspartic Acid) مربوط به خاصیت انعطاف‌پذیری در سلول‌های عصبی تغییر می‌کند (Spronsen et al., 2013). همچنین ۳۱ نوع miRNA از جمله miR-107، miR-134، miR-470 و miR-546 در حفظ هومئوستازی انعطاف‌پذیری سلول‌های عصبی نقش دارند (Spronsen et al., 2013). از جمله miRNAهایی که در رشد و تکامل سلول‌های عصبی نقش دارند می‌توان به miR128 اشاره کرد که در کاهش بیان ژن فاکتور نوسازی سلول‌های بنیادی عصبی Bmi-1 نقش دارد (Persengiev et al., 2012). در مغز پستانداران miR-9 و miR-132 در هیپوکامپ و قشر پیشانی مغز بیان می‌شوند (Persengiev et al., 2012; Radhakrishnan and Anand, 2016). بیان miR-9 برای نوروژنزی در سلول‌های بنیادی در محیط کشت ضروری است (Shibata et al., 2011; Persengiev et al., 2012). miR-132 مانع ترجمه p250GAP می‌شود که نقش مهمی در نوروژنزی و گسترش بافت عصبی دارد (Persengiev et al., 2012). علاوه بر این، miR-132 به BDNF (فاکتور نوروτροφیک مشتق شده از مغز، Brain-Derived Neurotrophic Factor) که یکی از اعضای خانواده فاکتور رشد عصبی است و برای بازماندگی سلول‌های عصبی مخطط در مغز موثر است، متصل می‌شود. همچنین MeCP2 با اتصال به پروتئین متصل به توالی سیتوزین-گوانین متیله شده، نقش مهمی در تکامل و توسعه سیستم عصبی مغز پستانداران ایفا می‌کند (Persengiev et al., 2012). خانواده miR-124 نقش مهمی را در نوسازی بافت عصبی برخی جانوران به عهده دارد (Sasidharan et al., 2017). علاوه بر این miR-124a می‌تواند از طریق حذف نسخه‌برداری‌های اضافی نقش مهمی را در تمایز پیش‌ساز سلول‌های عصبی به سلول‌های عصبی بالغ بازی کند (Persengiev et al., 2017; Sasidharan et al., 2012). مطالعه صورت گرفته بر روی بیان miRNAها در بافت عصبی ماهی *Nothobranchius furzeri* نشان می‌دهد که ۱۶۵ miRNA در مغز این ماهیان قابل شناسایی است که از آن جمله می‌توان به miR-15a و miR-20a اشاره کرد (Tozzini et al., 2014).

miRNAها مولکول‌های RNA تک رشته‌ای هستند که طول آن‌ها ۱۹-۲۵ نوکلئوتید است (Xiang-Yang, 2017). پایانه ۳' مولکول‌های یک miRNA انعطاف‌پذیر

است و معمولا دارای یک برآمدگی ۲-۱ نوکلئوتیدی است (Xiang-Yang, 2017). یکی از ویژگی‌های مهمی که برای تمایز miRNAها از سایر RNAهای کوچک حائز اهمیت است این است که یک miRNA بالغ دارای گروه هیدروکسیل در پایانه ۳' و گروه فسفات در پایانه ۵' است (Radhakrishnan and Anand, 2016; Xiang-Yang, 2017). ژن‌های miRNA به وسیله RNA پلیمراز II و III به miRNAهای اولیه رونویسی می‌شوند و با پروتئین دروشا (Drosha) به پیش‌سازهای miRNA (pre-miRNA) ساقه-حلقه در هسته تبدیل می‌شوند. پیش‌سازهای miRNA (pre-miRNA) از طریق پروتئین اکسپورتین ۵ (Exportin-5) به درون سیتوپلاسم منتقل می‌شوند و سپس به وسیله دایسر (Dicer) به الیگونوکلئوتیدهای ۱۸ تا ۲۴ بازی دو رشته‌ای شکسته می‌شود و یک miRNA:miRNA دو رشته‌ای بالغ به وجود می‌آید (Xiang-Yang, 2017). تنها یک رشته از دورشته‌ای miRNA (که به آن راهنمای رشته تک گفته می‌شود) بعدا در درون کمپلکس پروتئینی خاموشگر ناشی از RNA اثرگذار یا RISC (-RNA Induced Silencing Complex) جای می‌گیرد (Sasidharan et al., 2017; Xiang-Yang, 2017).

در جانوران، اغلب miRNAها، بیان ژن هدف را عمدتا در سطح ترجمه و به وسیله اتصال به نواحی ترجمه نشده ۳' (3'-UTR) در RNAهای پیام-رسان هدف سرکوب می‌کنند. از این رو، یک مولکول تک رشته‌ای miRNA می‌تواند ترجمه صدها پروتئین را از طریق القای تخریب یا مهار ترجمه اهداف RNA پیام‌رسان تنظیم کند (Xiang-Yang, 2017). همچنین miRNAهای بالغ می‌توانند با اعضای خانواده پروتئین آرگونت (Ago) واکنش دهند تا کمپلکس RISC را به وجود آورند. شیوه عمل کمپلکس RISC در خاموش کردن بیان ژن هنوز به طور کامل شناخته نشده است (Shibata et al., 2011; Radhakrishnan and Anand, 2016; Xiang-Yang, 2017).

miRNAها در سلول‌ها و بافت‌های مختلف بدن نقش بسیار مهمی را در بسیاری از فرآیندهای زیستی از جمله تنظیم چرخه سلولی و تقسیم سلولی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، تمایز سلولی، رشد و تکامل جنینی، پاسخ به استرس، ایمنی، کنترل تومورزایی و عصب‌زایی ایفا می‌کنند (Wang et al., 2017). از آنجایی که بسیاری از ژن‌های کد کننده پروتئین در ژنوم مهره‌داران مختلف

نرم‌افزارها، پیش‌بینی بر اساس مکمل بودن ناحیه سید (Seed) در miRNA با mRNA هدف و محاسبه پایداری ترمودینامیکی اتصال miRNA و mRNA است. با این وجود الگوریتم‌های محاسبه معیارهای مذکور در هر نرم‌افزار متفاوت و کاملاً اختصاصی است.

هدف از این مطالعه، بررسی نقش ژن‌های مختلف درگیر در تکامل سیستم عصبی مرکز (مغز) ماهی گورخری (*Danio rerio*) و شناسایی miRNAهای دخیل در تنظیم بیان این ژن‌ها در طی فرآیند نورون‌زایی بر اساس پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک با الگوریتم‌های مختلف و توسط نرم‌افزارهای مختلف است. شناسایی توالی کامل ژنوم ماهی گورخری، رشد سریع جنین خارج از بدن، هم‌آوری بالا سبب شده این ماهی به عنوان یک مدل جانوری ایده‌آل برای مطالعات ژنتیکی مورد توجه بسیاری از پژوهشگران باشد. در حال حاضر اطلاعات کاملی از miRNAs شناسایی شده ماهیان از جمله ماهی گورخری در پایگاه اطلاعاتی <http://www.targetscan.org/> fish_62 برای مطالعات بیوانفورماتیکی در دسترس است.

مواد و روش‌ها

توسط miRNA تنظیم می‌شوند (Kawahara et al., 2012)، شناسایی انواع مختلف miRNAs و مکانیسم عمل آن‌ها می‌تواند در درک عمل ژن‌ها و اهمیت بیان ژن‌ها در شکل‌گیری و تکامل بافت‌ها و اندام‌های مختلف از جمله سیستم عصبی مرکزی مفید باشد.

هر چند امروزه به کمک تکنیک‌های مولکولی مختلف از جمله نورترن بلات، ریزآرایه، هیبریداسیون درجا و Real-time PCR می‌توان به وجود miRNAها در بافت‌های خاص پی‌برد (Xiang-Yang, 2017). اما این روش‌ها بسیار هزینه‌بر و زمان‌بر است. در حالی که بهره‌گیری از الگوریتم‌های بیوانفورماتیکی و سیستم‌های مدل‌سازی کامپیوتری در پیش‌بینی هدف‌گیری mRNAها توسط miRNAها و نقش آن‌ها در تمایز سلولی می‌تواند علاوه بر افزایش دقت عمل در شناسایی miRNAها، سرعت عمل پژوهشگران را نیز افزایش دهد و از هزینه‌های اضافی در تکنیک‌های مولکولی برای شناسایی miRNAها بکاهد. در حال حاضر چندین برنامه آنلاین کامپیوتری با الگوریتم‌های متفاوت برای پیش‌بینی اهداف اتصالی miRNAها وجود دارد. وجه اشتراک همه این

(Threshold) DianaTools) با حد آستانه (۰/۵ صورت گرفت. در این پایگاه، الگوریتم شناسایی اهداف miRNA بر مبنای چندین شاخص محاسبه و برای هر miRNA به طور جداگانه ارائه شد. سپس امتیاز نواحی محافظت شده و غیرمحافظت شده با هم ترکیب شد و یک امتیاز کلی که حاکی از تغییر بیان mRNA هدف است، را ارائه داد. هر چه مقدار miTG Score به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، بیانگر دقیق‌تر بودن پیش‌بینی است. در تجزیه و تحلیل miRNAs بر اساس متغیرهایی همچون قدرت اتصال ناحیه هسته مربوط به miRNAهای مختلف و تعداد تکرار ناحیه هدف در قسمت 3'-UTR فاکتور رونویسی، به فاکتورهای رونویسی امتیاز داده شد و در نهایت فاکتورهای رونویسی دارای بالاترین امتیاز به عنوان منتخب بررسی‌های عملی معرفی شد.

نتایج

پروفایل ژن‌های دخیل در تکامل مغز ماهی گورخری و همچنین مشخصات miRNAهای تنظیم‌کننده آن‌ها به ترتیب بر اساس داده‌های به دست آمده از پایگاه‌های اطلاعاتی <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene> و <http://www.mirbase.org/>

پژوهش حاضر به صورت یک بررسی تئوری بیوانفورماتیکی انجام شده است. بدین منظور ابتدا پروفایل ژن‌های دخیل در تکامل مغز ماهی گورخری (*Danio rerio*) از پایگاه اطلاعاتی NCBI (National Center for Biotechnology Information) دریافت شد. سپس پروفایل miRNAهای دخیل در تنظیم بیان ژن‌های مذکور با استفاده از نرم-افزار Target Scan (http://www.targetscan.org/fish_62) مشخص شد. در نرم‌افزار Target Scan نواحی ۷ یا ۸ نوکلئوتیدی که مکمل ناحیه هسته از miRNA است شناسایی شد و پایداری ترمودینامیکی آن نیز بررسی شد. در این پایگاه اطلاعاتی، اهداف پیش‌بینی شده بر اساس فاکتوری به نام احتمال هدف‌گیری محافظت شده، رتبه‌بندی شدند. در واقع این فاکتور بیانگر احتمال هدف‌گیری یک ناحیه محافظت شده توسط یک miRNA خاص بود. هر چقدر امتیاز کسب شده بالاتر باشد، معیار بهتری از اتصال اختصاصی و درست miRNA به هدف خود است. سپس از ژن‌های منتخب یک جدول امتیاز تهیه شد. در مرحله بعد، تجزیه و تحلیل miRNAs در پایگاه DIANA (<http://diana.imis.athena-innovation.gr/>)

هدف قرار می‌دهد. تجزیه و تحلیل miRNAها در پایگاه <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools> با حد آستانه (Threshold) ۰/۵ صورت گرفت و نتایج آن در جدول ۲ ارائه شده است. هر چه مقدار miTG score به عدد ۱ نزدیک‌تر باشد، بیانگر دقیق‌تر بودن پیش‌بینی است. targets.org/fish_62 در جدول ۱ ارائه شده است. بر اساس نتایج ارائه شده در این جدول، بالاترین سطح امتیاز به ترتیب مربوط به dre-miR-731، dre-miR-101b، dre-miR-26ba و dre-miR-26b است که ژن‌های *neurod6b*، *neurod2* و *sox3* را هدف قرار می‌دهند. کمترین امتیاز نیز مربوط به dre-miR-93 است که ژن *sox11b* را

جدول ۱: پروفایل ژن‌های دخیل در تکامل مغز ماهی گورخری و مشخصات miRNAهای تنظیم‌کننده بین آن‌ها

کد شناسایی	نام miRNA	ژن هدف	امتیاز (درصد)
MIMAT0001815	dre-miR-101b	<i>neurod6b</i> (neuronal differentiation 6b)	۹۸
MI0004776	dre-miR-731	<i>neurod2</i> (neurogenic differentiation 2)	۹۶
MIMAT0001795	dre-miR-26b	<i>sox3</i>	۹۶
MIMAT0001794	dre-miR-26ba	<i>sox3</i>	۹۶
MIMAT0001768	dre-miR-1	<i>Notch1</i> (notch homolog)	۹۲
MIMAT0001790	dre-miR-23a	<i>sox11a</i>	۹۲
MIMAT0001791	dre-miR-23b	<i>sox11a</i>	۹۲
MIMAT0001866	dre-miR-206-3p	<i>Notch1</i> (notch homolog)	۹۰
MI0003256	dre-miR-489	<i>olfm1b</i> (olfactomedin 1b)	۸۳
MIMAT0001795	dre-miR-26b	<i>neurod6a</i> (neuronal differentiation 6a)	۷۰
MIMAT0001795	dre-miR-26b	<i>flot2a</i> (flotillin 2a)	۷۰
MIMAT0001875	dre-miR-365	<i>neurod4</i> (neuronal differentiation 4)	۶۷
MIMAT0001270	dre-miR-181b-5p	<i>gle1</i>	۶۰
MIMAT0001623	dre-miR-181a-5p	<i>gle1</i>	۵۶
MIMAT0001825	dre-miR-129-5p	<i>cadherin 2, type 1, N-cadherin</i> (neuronal)	۵۶
MI0004765	dre-miR-722	<i>cadherin 2, type 1, N-cadherin</i> (neuronal)	۵۶
MIMAT0001810	dre-miR-93	<i>sox11b</i>	۵۳

جدول ۲: آنالیز miRNAها در پایگاه اطلاعاتی DIANA با حد آستانه ۰/۵

امتیاز miTG	نام miRNA	نام ژن و کد شناسایی	کد نسخه‌برداری
۰/۹۴۱	dre-miR-731	ENSDARG00000016854 (<i>neurod2</i>)	ENSDART00000002078
۰/۹۱۶	dre-miR-101b	ENSDARG00000020794 (<i>neurod6b</i>)	ENSDART00000111135
۰/۹۱۵	dre-miR-101a	ENSDARG00000020794 (<i>neurod6b</i>)	ENSDART00000111135
۰/۷۸۸	dre-miR-489	ENSDARG00000014053 (<i>olfm1b</i>)	ENSDART00000037265
۰/۷۵۱	dre-miR-26b	ENSDARG00000004830 (<i>flot2a</i>)	ENSDART00000003947
۰/۶۷۶	dre-miR-129-5p	ENSDARG00000042677 (<i>cadm1b</i>)	ENSDART00000062603
۰/۶۲۹	dre-miR-722	ENSDARG00000042677 (<i>cadm1b</i>)	ENSDART00000062603
۰/۶۲۵	dre-miR-206-3p	ENSDARG00000043130 (<i>notch2</i>)	ENSDART00000123104
۰/۶۱۳	dre-miR-1	ENSDARG00000043130 (<i>notch2</i>)	ENSDART00000123104
۰/۵۷۷	dre-miR-26b	ENSDARG00000095743 (<i>sox11b</i>)	ENSDART00000141068
۰/۵۷۶	dre-miR-206-3p	ENSDARG00000052094 (<i>notch1b</i>)	ENSDART00000130888
۰/۵۷۰	dre-miR-1	ENSDARG00000052094 (<i>notch1b</i>)	ENSDART00000130888
۰/۵۳۸	dre-miR-26b	ENSDARG00000043923 (<i>sox9b</i>)	ENSDART00000064500
۰/۵۲۷	dre-miR-181b-5p	ENSDARG00000043559 (<i>gle1</i>)	ENSDART00000128227
۰/۵۲۷	dre-miR-365	ENSDARG00000003469 (<i>neurod4</i>)	ENSDART00000145072
۰/۵۲۲	dre-miR-181a-5p	ENSDARG00000043559 (<i>gle1</i>)	ENSDART00000128227
۰/۵۱۴	dre-miR-101a	ENSDARG00000019566 (<i>neurod</i>)	ENSDART00000011837
۰/۵۱۹	dre-miR-26a	ENSDARG00000077811 (<i>sox11a</i>)	ENSDART00000110040
۰/۵۰۸	dre-miR-101b	ENSDARG00000019566 (<i>neurod</i>)	ENSDART00000011837

بر اساس نتایج ارائه شده در جدول ۲، بحث بالاترین سطح امتیاز به ترتیب مربوط به dre-miR-731، dre-miR-101b و dre-miR-101a است که ژن‌های *neurod2* و *neurod6b* را هدف قرار می‌دهند. نتیجه پژوهش‌های پیشین نشان می‌دهد که miRNAها ممکن است یک فاکتور کلیدی در نورون‌زایی باشند و نقش مهمی را در کنترل رشد و تکامل مغز و سازماندهی ساختار و

احتمال نقش، ممکن است در مسیر نورون‌زایی تحت تاثیر *adre-miRNA* قرار گیرند. ژن‌های *neuroD* نقش اساسی در تقسیم میتوزی و تعیین سرنوشت سلول‌های سیستم عصبی مرکزی و خط جانبی در جنین ماهی گورخری دارند (Ochocinska and Hitchcock, 2017). ژن *neurod2* گروهی از پروتئین‌های عصبی متعلق به خانواده *neuroD* را کد می‌کند که در تمایز نورون‌ها و بقای سلول‌های عصبی نقش مهمی را ایفا می‌کنند. محصول ژن *neurod2* همچنین می‌تواند به طور اختصاصی بر فاکتورهای رونویسی تعیین کننده سرنوشت عصبی سلول‌های اکتودرمی و بیان ژن‌ها در سلول‌های پیش آگهی دهنده عصبی در سیستم عصبی مرکزی و محیطی در حال تکامل تاثیر بگذارد. محصول پروتئینی ژن *neurod2* همچنین نقش مهمی در تمایز و بقای نورون‌های دوپامینرژیک مغز میانی دارد (Bormuth et al., 2013). ژن *neurod6b* نیز مسئول کد کردن گروه دیگری از پروتئین‌های عصبی معروف به فاکتور تمایز نورونی ۶ متعلق به خانواده *neuroD* است که در تمایز نورون‌ها و تکامل سیستم عصبی مرکزی دخالت دارند (Bormuth et al., 2013).

عملکرد آن و همچنین پیری و زوال سلول‌های عصبی و کنترل فرآیندهای متابولیسم آن‌ها ایفا کنند (Persengiev et al., 2012). miRNAها در مسیرهای مختلف زیستی متنوع و چند منظوره دخیل هستند. روابط بین آن‌ها بسیار پیچیده است، ممکن است با یکدیگر همکاری کنند، رقابت کنند و یا فعالیت یکدیگر را تنظیم کنند (Bartel, 2009). ماهی گورخری به عنوان یک گونه مدل برای بسیاری از مطالعات زیست‌شناسی شناخته می‌شود و تقریباً توالی کل ژنوم این ماهی شناسایی شده است. در این مطالعه با بهره‌گیری از پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیک، فهرست miRNAهایی که در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌های دخیل در نورون‌زایی و تکامل سیستم عصبی مرکزی ماهی گورخری نقش دارند، شناسایی شده است. مغز ماهیان گورخری واجد سلول‌های پیش‌ساز بطنی است که توانایی نورون‌زایی را در ماهیان بالغ نیز حفظ می‌کند (Kizil and Brand, 2011). با توجه به بررسی‌های بیوانفورماتیکی انجام شده بیان ژن‌های *olfm1a neurod4 neurod2 neurod6b* و *sox11a*، *gle1 olfm1b* و *sox11b* و *notch2*، *cadm1b* و *notch1b* با بیشترین

در مخچه مهره‌داران ایفا می‌کند (Vong et al., 2015). بنابراین مهار بیان ژن *sox9b* توسط *dre-miR-26b* می‌تواند نقش مهمی در تمایز سلول‌های بنیادی به سلول‌های نورونی داشته باشد. زیرا تنظیم بیان ژن *sox9* برای حفظ نرخ تکامل مخچه در مقایسه با دیگر بافت‌های سیستم عصبی مرکزی ضروری است (Vong et al., 2015). بر اساس نتایج به دست آمده از بررسی‌های بیوانفورماتیکی، *dre-miR-26b* در تنظیم بیان ژن *sox9* نقش دارد.

ژن‌های *olfm1a* و *olfm1b* در رشد و تکامل شبکه چشم و عملکرد صحیح بینایی در ماهی گورخری دخالت می‌کنند. علاوه بر این احتمالاً محصول ژن‌های *olfm1* برای حفظ بقای بافت عصبی، تنظیم رشد آکسون در سیستم عصبی مرکزی جنین و ماهیان بالغ ضروری است (Nakaya et al., 2008). سطح بیان ژن *olfm1* در قشر مغز از جمله لوب بویایی و هیپوکامپ نسبتاً بالا است. بر اساس اطلاعات موجود، پروتئین *olfm1* نقش مهمی را در تهییج مرگ سلول‌های عصبی در موش‌ها (Cheng et al., 2007)، ایجاد تاج عصبی در پرندگان (Barembaum et al., 2000)، حفظ سلول‌های پیش‌ساز عصبی در *Xenopus*

تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک نشان می‌دهد که *dre-miR-101b*، *dre-miR-731*، *dre-miR-365* و *miR-101a* به ترتیب نقش مهمی در تنظیم بیان ژن‌های *neurod2*، *neurod6b* و *neurod4* دارند.

الگوی بیان ژن‌های *sox11a* و *sox11b* در مغز ماهی گورخری نشان می‌دهد که بیان این ژن‌ها در تکامل سیستم عصبی، از جمله مغز پیشین، مغز میانی، مغز خلفی، چشم‌ها و گوش‌ها در مراحل اولیه جنینی نقش به‌سزایی دارد (De Martino et al., 2000). پروتئین *sox11* تمایز نورون‌ها را در سیستم عصبی مرکزی کنترل می‌کند (Bhattaram et al., 2010). بیان ژن *sox11a* توسط *dre-miR-26b* و *dre-miR-26a* تنظیم می‌شود. در حالی که محصول پروتئینی *sox11b* تنها به وسیله *dre-miR-26b* مهار می‌شود. در حالی که در پستانداران بیان ژن *sox11* توسط *miR-212-3p* و *miR-132-3p* تنظیم می‌شود (Haenisch et al., 2015).

محصول ژن *sox9b*، پروتئین *sox9b* یک فاکتور رونویسی دخیل در فرآیند نورون‌زایی و تمایز سلول‌های عصبی است. پروتئین *sox9* از طریق تغییر در ختم نورون‌زایی نقش مهمی را در تعیین سرنوشت نورون‌زیک به گلیکوژنیک

26b می‌تواند با مهار بیان ژن *flot2a* سطح N-کاده‌رین (N-Cadherin) را تنظیم کند. ژن *gle1* در بقای سلول‌های اولیه عصبی نخاع و شکل‌گیری ساختار درختی آکسون نورون‌های حرکتی در ماهیان نقش دارد. ماهی گورخری دارای دو جمعیت از نورون‌های حرکتی نخاعی شامل نورون‌های حرکتی اولیه (PMNs) و نورون‌های حرکتی ثانویه (SMNs) است. نتیجه مطالعات نشان می‌دهد که ژن *gle1* در نورون‌های حرکتی ثانویه (SMNs) نقش دارد (Jao et al., 2012). بیان ژن *gle1* به وسیله *dre-miR-181a* کنترل می‌شود.

در ماهی گورخری ۶ ژن از خانواده ژنی *Cadm* که مشابه ژن‌های پستانداران هستند، شناسایی شده است. تطابق توالی ۶ پروتئین *Cadm* در ماهی گورخری با یکدیگر نشان می‌دهد که حداقل ۳۷ درصد اسیدهای آمینه این پروتئین‌ها مشابه یکدیگر است. در مغز ماهیان گورخری بالغ، سه ایزوفرم مختلف *cadm1a* و یک ایزوفرم *cadm1b* شناسایی شده است (Pietri et al., 2008). ژن *cadm1b* مسئول کد کردن N-کاده‌رین است. این پروتئین نقش مهمی در ایجاد پایداری تقارن سیستم عصبی مرکزی و رشد و تکامل (Moreno and Bronner-Fraser, 2005)، تنظیم اندازه چشم در *Xenopus* و ماهی گورخری و آرایش درختی عصب تک‌توم بینایی در ماهی گورخری ایفا می‌کند (Moreno and Bronner-Fraser, 2005; Nakaya et al., 2012). نتایج تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیکی نشان داد که *dre-miR-489* نقش مهمی در تنظیم بیان ژن *olfm1b* دارد. بیان بیش از حد ژن *olfm1* می‌تواند اثرات متضادی بر بیومارکرهای بینایی، *rx3* و *six3* داشته باشد. از آنجایی که محصول ژن *olfm1* نقش مهمی در تمایز و تکامل اولیه چشم‌ها، توسعه عصب بینایی و انشعاب آکسون انتهایی سلول گانگلیونی دارد (Nakaya et al., 2008)، فعالیت *dre-miR-489* در تکامل و تمایز لوب بینایی و اعصاب بینایی ماهیان بسیار حائز اهمیت است.

ژن *flot2a* احتمالاً نقش کلیدی در رشد و نوسازی آکسون‌ها دارد. علاوه بر این، ژن *flot2* یک پروتئین غشایی سرتاسری، مربوط به پروتئین کاوئولین را کد می‌کند که در انتقال سیگنال‌های عصبی دخیل است (Wang et al., 2017). پروتئین *flot2a* می‌تواند سطح بیان ژن‌های *Cadm* را کاهش دهد (Wang et al., 2017). از این رو، *dre-miR-*

سیستم عصبی بازی می‌کند. پروتئین N-کاده‌رین نوعی کاده‌رین کلاسیک نوع یک است که در شکل‌گیری شبکه عصبی از طریق تنظیم مهاجرت مخروط رشد و شکل‌گیری ارتباطات سیناپسی نقش ایفا می‌کند (Bruses, 2011). با توجه به تجزیه و تحلیل بیوانفورماتیک می‌توان پیش‌بینی کرد که بیان ژن *cadm1b* در سیستم عصبی مرکزی ماهیان گورخری توسط dre-miR-129-5p و dre-miR-722 کنترل می‌شود.

تجزیه و تحلیل داده‌های بیوانفورماتیکی نشان داد که بیان ژن‌های *neurod6b*، *neurod2*، *neurod4*، *olfm1a* و *olfm1b*، *gle1*، *sox11a* و *sox11b*، *cadm1b*، *notch1b* و *notch2* با بیشترین احتمال ممکن است در مسیر نورون‌زایی تحت تاثیر dre-miRNAs قرار گیرند. بنابراین می‌توان چنین استنباط کرد که محصول این ژن‌ها می‌تواند به عنوان کاندیدا مناسب جدیدی برای بررسی‌های تجربی شناخت مسیر نورون‌زایی در مغز ماهی گورخری باشند.

منابع

- Barembaum M., Moreno T.A., LaBonne C., Sechrist J. and Bronner-Fraser M. 2000.** Noelin-1 is a secreted glycoprotein involved in generation of the neural crest. *Nature Cell Biology*, 2: 219–225.
- Bartel D. 2009.** MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215–233.
- Bhattaram P., Penzo-Méndez A., Sock E., Colmenares C., Kaneko K.J., Vassilev A., DePamphilis M.L., Wegner M. and Lefebvre V. 2010.** Organogenesis relies on SoxC transcription factors for the survival of neural and mesenchymal progenitors. *Nature Communications*, 12(1): 1–12.
- Bormuth I., Yan K., Yonemasu T., Gummert M., Zhang M., Wichert S., Grishina O., Pieper A., Zhang W., Goebbels S., Tarabykin V., Nave K.A. and Schwab M.H. 2013.** Neuronal basic helix-loop-helix proteins Neurod2/6 regulate cortical commissure formation before midline interactions. *Journal of Neuroscience*, 33(2): 641–651.
- Bruses J.L. 2011.** N-cadherin regulates primary motor axons growth and branching during zebrafish embryonic development. *Journal of Comparative Neurology*, 519(9): 1797–1815.
- Cheng A., Arumugam T.V., Liu D., Khatri R.G., Mustafa K., Kwak S., Ling H.P., Gonzales C., Xin O., Jo D.G., Guo Z., Mark R.J. and Mattson M.P. 2007.** Pancortin-2 interacts with WAVE1 and Bcl-xL in a mitochondria-associated protein complex that mediates ischemic neuronal death. *Journal of Neuroscience*, 27(7): 1519–1528.
- De Martino S., Yan Y.L., Jowett T., Postlethwait J.H., Varga Z.M., Ashworth A. and Austin C.A. 2000.** Expression of sox11 gene duplicates in zebrafish suggests the reciprocal loss of ancestral gene expression patterns in development. *Developmental Dynamics*, 217(3): 279–292.
- Haenisch S., Zhao Y., Chhibber A., Kaiboriboon K., Do L.V., Vogelgesang S., Barbaro N.M., Alldredge B.K., Lowenstein D.H., Cascorbi I. and Kroetz D.L. 2015.** SOX11 identified by target gene evaluation of miRNAs differentially expressed in focal and non-focal brain tissue of therapy-resistant epilepsy patients. *Neurobiology of Disease*, 77: 127–140.
- Jao L.E., Appel B. and Wentz S.R. 2012.** A zebrafish model of lethal congenital contracture syndrome 1 reveals Gle1 function in spinal neural precursor survival and

- motor axon arborization. *Development*, 139(7): 1316–1326.
- Kawahara H., Imai T. and Okano H. 2012.** MicroRNAs in neural stem cells and neurogenesis. *Frontiers in Neuroscience*, 6: 1–13 (Article 30).
- Kizil C. and Brand M. 2011.** Cerebroventricular microinjection (CVMI) into adult zebrafish brain is an efficient misexpression method for forebrain ventricular cells. *PLoS One*, 6(11): 1–10 (e27395).
- Moreno T.A. and Bronner-Fraser M. 2005.** Noelin3 modulates the timing of neuronal differentiation during development. *Developmental Biology*, 288: 434–447.
- Nakaya N., Lee H.S., Takada Y., Tzchori I. and Tomarev S.I. 2008.** Zebrafish olfactomedin 1 regulates retinal axon elongation in vivo and is a modulator of Wnt signaling pathway. *Journal of Neuroscience*, 28(31): 7900–7910.
- Nakaya N., Sultana A., Lee H.S. and Tomarev S.I. 2012.** Olfactomedin 1 interacts with the Nogo 66 receptor complex to regulate axon growth. *Journal of Biological Chemistry*, 287(44): 37171–37184.
- Ochocinska M.J. and Hitchcock P.F. 2017.** Dynamic expression of the basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD in the rod and cone photoreceptor lineage in the retina of the embryonic and larval zebrafish. *Journal of Comparative Neurology*, 501(1): 1–12.
- Persengiev S.P., Kondova I.I. and Bontrop R.E. 2012.** The impact of microRNAs on brain aging and neurodegeneration. *Current Gerontology and Geriatrics Research*, 1–9 (359369).
- Pietri T., Easley-Neal C., Wilson C. and Washbourne P. 2008.** Six cadm/SynCAM genes are expressed in the nervous system of developing zebrafish. *Developmental Dynamics*, 237(1): 233–246.
- Radhakrishnan B. and Anand A.P. 2016.** Role of miRNA-9 in brain development. *Journal of Experimental Neuroscience*, 10: 101–120.
- Sasidharan V., Marepally S., Elliott S.A., Baid S., Lakshmanan V., Nayyar N., Bansal D., Sanchez Alvarado A., Vemula P.K. and Palakodeti D. 2017.** The miR-124 family of microRNAs is crucial for regeneration of the brain and visual system in the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Development*, 144(18): 3211–3223.
- Shibata M., Nakao H., Kiyonari H., Abe T. and Aizawa S. 2011.** MicroRNA-9 regulates neurogenesis in mouse telencephalon by

- targeting multiple transcription factors. *Journal of Neuroscience*, 31(9): 3407–3422.
- Shi Y., Zhao X., Hsieh J., Wichterle H., Impey S., Banerjee S., Neveu P. and Kosik K.S. 2010.** MicroRNA regulation of neural stem cells and neurogenesis. *Journal of Neuroscience*, 30(45): 14931–14936.
- Spronsen M., Battum E.Y., Kuijpers M., Vangoor V.R., Rietman M.L., Pothof J., Gummy L.F., Ijcken W.F.J., Akhmanova A., Pasterkamp R.J. and Hoogenraad C.C. 2013.** Developmental and activity-dependent miRNA expression profiling in primary hippocampal neuron cultures. *PLOS One*, 8(10): 1–13 (e74907).
- Tozzini E.T., Savino A., Ripa R., Battistoni G., Baumgart M. and Cellerino A. 2014.** Regulation of microRNA expression in the neuronal stem cell niches during aging of the short-lived annual fish *Nothobranchius furzeri*. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8: 1–10.
- Vong K.I., Leung C.K.Y., Behringer R.R. and Kwan K.M. 2015.** Sox9 is critical for suppression of neurogenesis but not initiation of gliogenesis in the cerebellum. *Molecular Brain*, 8: 1–25.
- Wang F., Jia Y., Wang P., Yang Q., Du Q.Y. and Chang Z.J. 2017.** Identification and profiling of *Cyprinus carpio* microRNAs during ovary differentiation by deep sequencing. *BMC Genomics*, 18: 1–17 (333).
- Xiang-Yang M.I.A.O. 2017.** Recent advances in understanding the role of miRNAs in exosomes and their therapeutic potential. *Journal of Integrative Agriculture*, 16(4): 753–761.



Research Paper

Bioinformatics evaluation of the miRNAs effect on expression of genes involved in neurogenesis process in zebrafish (*Danio rerio*)

Mahdi Banaee^{1*}, Shiva Sagvand²

Received: July 2018

Accepted: October 2018

Abstract

Several microRNAs (miRNAs) are involved in the differentiation of neurons and neurogenesis in vertebrates' brain. However, there is scant knowledge of miRNAs and their target genes in fish. Microarray is recognized as a standard method for a general study of genes that are under miRNAs' control, although the high cost of this method has limited its application. With advances in bioinformatics algorithms and computer simulation, mRNA targets for miRNAs can be predicted. Therefore, this study tries to determine genes and the relevant miRNAs by investigating the bioinformatics of genes and miRNAs involved in regulating active genes in differentiating neurons and neurogenesis in the brain of zebrafish with the help of Target Scan and DIANA tools. The results of bioinformatics investigations indicate that expression of neurod6b, neurod2, neurod4, olfm1a and olfm1b, gle1, sox11a and sox11b, c adm1b, notch2 and notch1b genes is more likely to be influenced by dre-miRNAs during neurogenesis. In conclusion, the product of these genes can be used as a new appropriate candidate in experimental studies for understanding neurogenesis in the brain of zebrafish.

Key words: *miRNAs, Target Scan, DIANA, Zebrafish, Neurogenesis.*

1- Assistant Professor in Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Behbahan Khatam Al-anbia University of Technology, Behbahan, Iran.

2- M.Sc. in Aquaculture, Department of Fisheries, Faculty of Natural Resources and Environment, Behbahan Khatam Al-anbia University of Technology, Behbahan, Iran.

*Corresponding Author: mahdibanaee@yahoo.com