

Constructing microRNA-mRNA Integrative Network of miR-204-5p and miR-211-5p in RPE Cells Going Through EMT

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Authors

Mowla S.J.^{*1} PhD,
Shahriari F.¹ MSc,
Moradi Sh.² PhD,
Totonchi M.² PhD,
Sattarian L.² PhD,
Baharvand H.² PhD

How to cite this article

Mowla S.J, Shahriari F, Moradi Sh, Totonchi M, Sattarian L, Baharvand H. Constructing microRNA-mRNA Integrative Network of miR-204-5p and miR-211-5p in RPE Cells Going Through EMT. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(3): 425-432.

¹Molecular Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares Tehran, Iran

²Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, Academic Center for Education, Culture and Research (ACECR), Tehran, Iran

*Correspondence

Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82883464
Fax: +98 (21) 82884717
sjmowla@modares.ac.ir

Article History

Received: July27,2018 Accepted: December 1, 2018
ePublished: September 21, 2019

ABSTRACT

Aims The retinal pigment epithelium cells (RPE) have crucial roles in the health and functionality of retina. Any damage or dysfunction of these cells can lead to severe retinopathies. Identification of signaling pathways and biological processes involved in RPE differentiation can be useful in devising more robust therapeutic approaches.

Materials and Methods In the present study, we used the intersection of three online prediction databases and their union with one experimental database to select microRNAs gene targets. Next, by the intersect of the targeted genes with an increase in their expression in epithelial to mesenchymal transition (EMT) of RPE cells, we tried to build a microRNA-mRNA integrative network. Further, several pathway analyses tools were used to perform a more accurate and comprehensive analysis of the signaling pathways and biological processes being regulated by selected miRs in the EMT of the RPE cells.

Findings Our study revealed that among the 3406 genes being upregulated over the course of EMT in RPE cells, adj p-value≤0.05, fold change≥1.5, 93 genes were miR-204-5p and miR-211-5p target genes. Further analysis of the obtained target gene list demonstrated that these two microRNAs are mostly involved in maintaining RPE cells from going through EMT via regulation of cell adhesion and secretion subnetworks and also MAPK and TGF-β1 signaling pathways while preserving cells from apoptosis and neuronal fates.

Conclusion This study indicated that miR-204-5p and miR-211-5p are involved in protecting RPE cells from EMT and reinforce their epithelial cell identity.

Keywords Retinal pigment epithelium; microRNA; Transcriptome

CITATION LINKS

[1] Prevalence of age-related macular degeneration in the ... [2] Prevalence of age-related macular degeneration in europe: the past and ... [3] Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA ... [4] Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and ... [5] Widespread changes in protein synthesis induced by ... [6] Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle ... [7] Principles of microRNA-target ... [8] Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate ... [9] Study of MicroRNA expression profiles of esophageal ... [10] Biological ... [11] MicroRNAs can generate thresholds in target gene ... [12] Impaired RPE survival on aged submacular human Bruch's ... [13] Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGFbeta pathway ... [14] MicroRNAs 204/211 promotes differentiation of human... [15] Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 ... [16] The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and ... [17] Growth factors and their receptors in the retina and ... [18] Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment ... [19] Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented ... [20] Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene ... [21] Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye ... [22] Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in ... [23] Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic ... [24] MicroRNAs are essential for differentiation of the retinal pigmented epithelium and maturation of ... [25] Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific ... [26] Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in ... [27] Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the ...

بررسی شبکه ژنی تحت کنترل miR-204-5p و miR-211-5p در سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه طی تبدیل از حالت اپیتلیالی به مزانشیمی از طریق آنالیز ادغامی miRNA-mRNA

سید جواد مولی* PhD

گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

فاطمه شهریاری MSc

گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

شریف مرادی PhD

مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

مهدی توتونچی PhD

مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

لیلا ستاریان PhD

مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

حسین بهاروند PhD

مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده فناوری و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی رویان، جهاد دانشگاهی، تهران، ایران

چکیده

اهداف: سلول‌های اپیتلیالی رنگدانه‌دار شبکیه (RPE) در حفظ سلامت و عملکرد شبکیه نقش مهمی ایفا می‌کنند، به‌طوری که نقص در عملکرد یا سلامت این سلول‌ها علت بیش از ۲۰۰ نوع بیماری دژنراسیون شبکیه است. یافتن مسیرهای پیام‌رسانی و زیستی مربوط به تمایز RPE می‌تواند در تولید این سلول‌ها مفید واقع شده و امکان کاربرد کلینیکی خواهد داشت.

مواد و روش‌ها: در مطالعه حاضر در مرحله اول با استفاده از انتخاب مجموعه ژن‌های هدف از اشتراک سه پایگاه داده پیش‌بینی‌کننده ژن‌های هدف microRNA و اجتماع مجموعه حاصل با پایگاه داده تجربی ژن‌های هدف microRNA، ژن‌های هدف با ضریب اطمینان بالاتری انتخاب شدند. در مرحله بعدی با انطباق ژن‌های هدف با ژن‌های دارای افزایش بیان در همان شرایط سلولی سعی شد تا عامل وابستگی اثر microRNA به شرایط ترانسکریپتوم در نظر گرفته شود. در ادامه از اشتراک نتایج چندین پایگاه داده مسیریابی مختلف در کنار هم استفاده شد تا آنالیز دقیق‌تر و جامع‌تری از مکانیزم اثرگذاری microRNA‌های مورد مطالعه ارائه شود.

یافته‌ها: در این مطالعه سعی شده است تا شبکه ژنی تحت کنترل miR-204-5p و miR-211-5p، دو microRNA موثر در سلول‌های RPE، را تا حد زیادی شبیه‌سازی کرده و فرآیندهای زیستی و مسیرهای پیام‌رسانی درگیر را مورد بررسی قرار دهیم.

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد این دو microRNA در سلول‌های RPE در تنظیم زیرساخت‌های ترشحی، اتصالات و اسکلت سلولی و مسیرهای درگیر در التهاب و پاسخ زخمی به‌طور خاص در مسیر TGF-β1 نقش ایفا می‌کنند. **کلیدواژه‌ها:** سلول‌های اپیتلیالی رنگدانه‌دار شبکیه، microRNA، ترانس‌کریپتوم

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۵/۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۹/۱۰

*نویسنده مسئول: sjmowla@modares.ac.ir

مقدمه

سلول‌های RPE سلول‌های تک‌لایه اپیتلیالی هستند که قسمت عصبی شبکیه را از قسمت کوروئیدی جدا می‌کنند. این سلول‌ها در انتقال متابولیت‌ها و کاتابولیت‌ها بین این دو قسمت نقش اصلی را بر عهده دارند. سلول‌های RPE همچون بسیاری از سلول‌های اپیتلیالی دارای ساختارهای تخصص‌یافته‌ایی از اتصالات بین سلولی و انتقالات بین سلولی هستند و با ترشح طیف وسیعی از فاکتورهای موثر، در رشد، تمایز و نگهداری شبکیه تاثیر بسزایی دارند. این سلول‌ها همچنین از طریق میکروویلی‌های سمت فوقانی با فاگوسیتوزکردن دائم ذرات حاصل از ریزش قسمت خارجی فوتورسپتورها نقش مهمی در سلامت این سلول‌ها بازی می‌کنند. به علاوه این سلول‌ها در سیکل بینایی با تبدیل فرم سیس به ترانس رتینوئیک‌اسید نقش دارند. نقص عملکردی این سلول‌ها عامل بسیاری از بیماری‌های منجر به نابینایی از جمله رتینیت پیگمنتوزا (RP) و تحلیل شبکیه وابسته به سن (AMD) است. AMD اولین عامل نابینایی در کشورهای پیشرفته محسوب می‌شود، به‌طوری که در ۶/۵٪ افراد بالای ۴۰ سال در این جوامع، علایمی از آن دیده می‌شود^[1]. از اولین علایم این بیماری تجمع رسوبات خارج سلولی به نام ذرات دروسن بین سلول‌های RPE و غشای بروخ است. با پیشرفت این بیماری تعداد و اندازه این ذرات افزایش یافته و سلول‌های RPE در تماس با این ذرات به مرور ماهیت اپیتلیالی و فعالیت‌های فیزیولوژیک حیاتی خود را از دست می‌دهند^[2].

MicroRNAها، RNAهایی با طول تقریباً ۱۸ تا ۲۴ نوکلئوتید هستند که به‌طور معمول بیان ژن‌های هدف خود را در سطح بعد از نسخه‌برداری کاهش می‌دهند^[3]. هر چند بسیاری از microRNAها و محل اتصال آنها روی mRNA هدف طی تکامل بسیار محافظت‌شده هستند، اما این RNAهای کوچک مولکول روی ژن‌های هدف خود اثر نسبی (حدود دوبرابر کاهش) دارند و در بسیاری از موارد حذف آنها اثر فنوتیپی قابل توجهی از خود به‌جای نمی‌گذارد^[4, 5]. MicroRNAها از طریق مکانیزم‌های مختلفی اثر خود بر فیزیولوژی سلول را افزایش می‌دهند؛ به‌عنوان مثال یک microRNA با تنظیم بیان ژن یک فاکتور رونویسی بر بیان طیف وسیعی از ژن‌های هدف فاکتور رونویسی مذکور تاثیر می‌گذارد. به علاوه یک microRNA می‌تواند با هدف قراردادن دسته‌ای از ژن‌ها که در یک کمپلکس پروتئینی، فرآیند زیستی خاص یا یک مسیر پیام‌رسانی دخیل هستند تا حدودی به‌صورت هدفمند تاثیر خود را متمرکز کند^[6]. به‌طور کلی دو فرضیه در توجیه نحوه عملکرد microRNAها در سلول مطرح است. از لحاظ تاریخی ابتدا فرضیه‌ایی مبنی بر نقش تقویت‌کنندگی microRNAها شکل گرفت، به این صورت که عملکرد آنها در راستای خطی مشی نسخه‌برداری ژن‌ها در جهت دقیق‌ترکردن مراحل تکوین و تقویت هویت سلولی است. در این شرایط حضور microRNA و هدف آن به‌صورت متقابل انحصاری است، به این معنی که حضور یکی در شرایط عدم حضور دیگری است. این نوع اثر بیشتر در تفکیک جین

شبکه با شماره پاساژ بالا (پاساژ ۵) و شماره پاساژ پایین (شماره پاساژ صفر) هر کدام سه نمونه، بعد از ۳۲ روز بودند. پس از تهیه لیست اهداف microRNA انتخابی از پایگاه‌های داده طبق ضوابط ذکرشده، اشتراک لیست مذکور با لیست ژن‌های دارای افزایش بیان در همان شرایط مطابقت داده شد. شبکه ژنی تحت کنترل microRNAهای انتخابی توسط نرم‌افزار Cytoscape v3.3.3 رسم شد. مجموعه ژن‌های به‌دست‌آمده که شامل اهداف واقعی microRNAهای انتخابی بودند با استفاده از پایگاه داده Enrichr (adj P-value ≤ 0.01) مورد تحلیل مسیریابی و در v10.5 STRING مورد بررسی برهم‌کنش پروتئین-پروتئین قرار گرفتند.

یافته‌ها

رسم شبکه ژنی تحت تنظیم microRNAهای انتخابی: اهداف miR-204-5p و miR-211-5p مطابق (شکل ۱) از پایگاه‌های داده ذکرشده به دست آمد و درنهایت با توجه به هم‌خانواده‌بودن این دو microRNA اجتماع اهداف آنها که شامل تعداد ۷۱۸ ژن بود، مد نظر قرار داده شد.

از آنالیز داده مایکرواری با شماره دستیابی GEO: GSE67899 پلتفورم (GPL4133) تعداد ۳۴۰۶ ژن دارای افزایش بیان با ضریب تغییرات بیانی $\geq 1/5$ و $\text{adj } p\text{-value} \leq 0.05$ بودند، انتخاب شدند. از آنجایی که microRNAهای انتخابی، miR-204-5p و miR-211-5p در شرایط فوق دارای بیشترین کاهش بیان بوده‌اند؛ بنابراین انتظار می‌رود تعدادی از ژن‌های دارای افزایش بیان فوق، اهداف مستقیم microRNAهای انتخابی بوده باشند. از اشتراک میان ۳۴۰۶ ژن دارای افزایش بیان و ۷۱۸ ژن هدف miR-204-5p و miR-211-5p به‌دست‌آمده از پایگاه‌های داده آنالیز، تعداد ۹۳ ژن به دست آمد. با استفاده از داده‌های فوق به علاوه فاکتورهای رونویسی که در جایگاه پروموتوری ژن *TMPR3* ژن میزبان *miR-204-5p* و ژن *TMPR1* میزبان *miR-211-5p*، شبکه ژنی تحت کنترل microRNAهای فوق رسم شد (شکل ۲).

آنالیز فرآیندها و مسیرهای پیام‌رسانی تحت تاثیر microRNAهای انتخابی با استفاده از روش تجمع‌یابی ژنی: برای مشخص‌نمودن ساختارها و فرآیندهای زیستی و همچنین مسیرهای پیام‌رسانی که ژن‌های هدف miR-204-5p و miR-211-5p بیشترین تجمع را در آنها دارند، ژن‌های هدف موجود در پایگاه داده Enrichr مورد بررسی تحلیل مسیریابی قرار گرفتند و نتایج حاصل از پایگاه‌های داده متفاوت، به‌طور کلی چند فرآیند و مسیر پیام‌رسانی مرتبط را مشخص کردند (نمودار ۱)، از آن جمله می‌توان به عناصر و فرآیندهای مرتبط با اتصالات سلولی و اسکلت سلولی همچون اتصالات سلولی با واسطه اینتگرین و اتصالات فوکل که خود در ارتباط با مسیرهای پیام‌رسانی مورد تنظیم، همچون مسیر پیام‌رسانی cAMP و MAPK هستند و همچنین مسیریابی اکسونی که ارتباط مستقیم با برهم‌کنش‌های اسکلت سلولی دارد، اشاره کرد. ساختارها و فرآیندهای مرتبط با آگروسیتوز سلولی همچون ساختار

تکوین سلول‌های یک بافت که دارای پیش‌ساز مشترک هستند دیده می‌شود^[7]. در مطالعات دیگر نشان داده شد که microRNAها می‌توانند نقش بافری را برای ژن‌های هدف خود بازی کنند و در این شرایط حضورشان هم‌زمان با حضور ژن هدف است^[8,9]. هر دو این موارد در راستای افزایش پایداری یک سیستم زیستی است^[10]. MicroRNAها در مهار بیان ژن‌های هدف خود دارای حد آستانه هستند. این حد آستانه به تعداد محل اتصال microRNA و تمایل اتصال آن بستگی دارد^[11]. از آنجایی که هر microRNA دارای چند ده تا چند صد ژن هدف است، به‌علت رقابت ژن‌های هدف مذکور برای microRNA مربوطه، این حد آستانه برای هر ژن در سلول‌های مختلف و تحت شرایط متفاوت، متغیر است؛ در نتیجه اثر یک microRNA وابستگی مستقیمی به ترانسکریپتوم سلولی در شرایط مورد مطالعه دارد.

در مطالعه حاضر در مرحله اول با استفاده از الگوریتم‌های سختگیرانه‌تر، همچون انتخاب مجموعه ژن‌های هدف از اشتراک سه پایگاه داده پیش‌بینی‌کننده و اجتماع مجموعه حاصل با پایگاه داده تجربی، ژن‌های هدف با ضریب اطمینان بالاتری انتخاب شدند. در مرحله بعدی با انطباق ژن‌های هدف microRNA با ژن‌های دارای افزایش بیان در همان شرایط سلولی سعی شد تا عامل وابستگی اثر microRNA به شرایط ترانسکریپتوم در نظر گرفته شود. در ادامه سعی شد تا از اشتراک نتایج چندین پایگاه داده مسیریابی مختلف در کنار هم استفاده و آنالیز دقیق‌تر و جامع‌تری از مکانیزم اثرگذاری microRNAهای مورد مطالعه ارایه شود.

مواد و روش‌ها

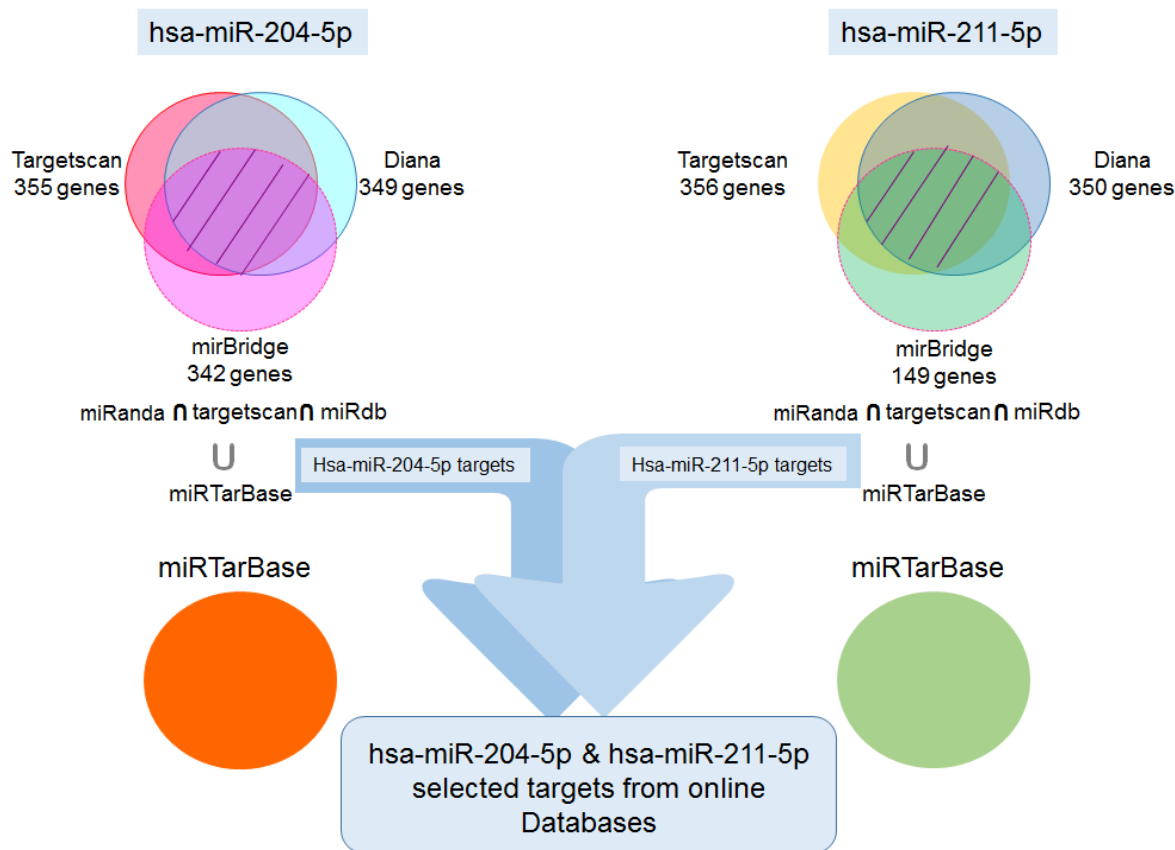
اهداف miR-204-5p و miR-211-5p از پایگاه‌های داده mRNAهای هدف تجربی و پیش‌بینی‌شده microRNAها به شرح زیر به دست آمد. برای تهیه لیست mRNAهای هدف microRNAهای انتخابی، mRNAهای پیش‌بینی‌شده به‌عنوان هدف از اشتراک سه پایگاه داده پیش‌بینی‌کننده Targetscan، mirBridge و Diana به دست آمد و نتیجه حاصل با mRNAهای هدف تاییدشده حاصل از پایگاه داده تجربی miRTarBase اجتماع گرفته شد. در ادامه با توجه به این که microRNAهای فوق از یک خانواده هستند، اهداف این دو microRNAها با هم جمع شدند. فاکتورهای رونویسی کنترل‌کننده microRNAهای انتخابی از پایگاه داده Harmonizome به دست آمد.

از آنجایی که تاثیر microRNAها وابسته به شرایط سلول یا به عبارتی دیگر به ترانسکریپتوم سلولی است، برای انطباق با شرایط ترانسکریپتوم، از آنالیز داده‌های مایکرواری با شماره دستیابی GEO: GSE67899 پلتفورم (GPL4133) ژن‌های دارای افزایش بیان در همان شرایط سلولی با ضریب تغییرات بیانی $\geq 1/5$ و $\text{adj } p\text{-value} \leq 0.05$ انتخاب شدند. شرایط سلولی مورد مطالعه مایکرواری انتخابی فوق شامل مقایسه افتراقی بین کشت سلول‌های رنگدانه‌دار

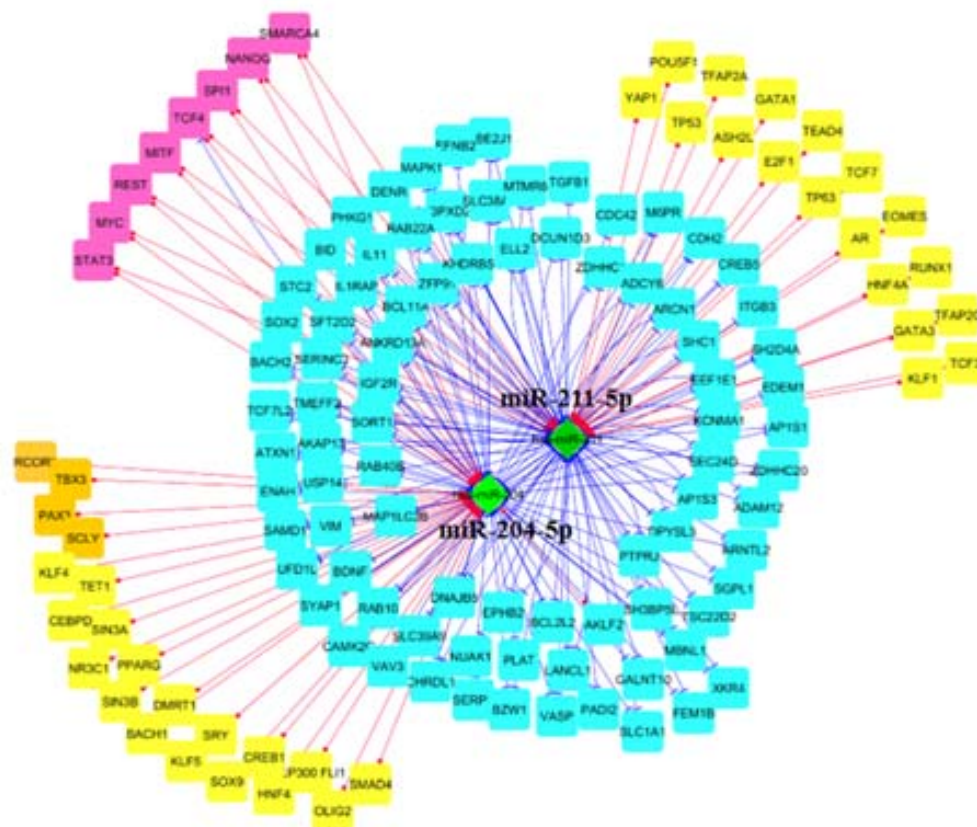
حاصل از متن کاوی، بعد از مطابقت با مقالات بوده است (شکل ۳). همان‌طور که مشاهده می‌شود شبکه برهم‌کنش پروتئینی با نتایج حاصل از آنالیز ساختارها و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مطابقت قابل توجهی دارد. به‌عنوان مثال ژن‌های دخیل در سازوکار انتقال وزیکول‌های ترشحی شامل AP1S1، M6PR، IGF2R، SORT1 و AP1S3 در کنار هم و در برهم‌کنش با BDNF که خود یک فاکتور نوروتروفیک ترشحی به شمار می‌رود، زیرساختاری از این شبکه را تشکیل می‌دهند.

در پایگاه داده CORUM اطلاعات پروتئین‌های زیرمجموعه کمپلکس‌های پروتئینی جمع‌آوری شده است. پایگاه فوق حاوی اطلاعاتی است که از رسوب‌دهی با آنتی‌بادی کمپلکس‌های پروتئینی و انجام اسپکترومتری جرمی متعاقب آن به دست آمده‌اند. برای دسترسی به منبع فوق از Enrichr طبق ضوابط آماری پیش‌تر ذکرشده، استفاده شد. براساس اطلاعات پایگاه مذکور miR-204-5p دو عضو از کمپلکس پروتئینی مسیر TGF- β 1 شامل TGF β R1-TGF β R2-TGF β 1 و miR-211-5p نیز سه عضو از این کمپلکس پروتئینی که شامل TGF β R1-TGF β R2-TGF β 1 را تنظیم می‌کنند. هر دو این microRNAها همچنین کمپلکس پروتئینی MAPK1-MAP2K1 و نیز کمپلکس پروتئینی آداپتوری AP1 که در ایجاد وزیکول‌های با غشای کلاترینی نقش دارد را هدف قرار می‌دهند، دو پروتئین این کمپلکس، AP1S1 و AP1S3 از ژن‌های هدف microRNAهای مورد مطالعه هستند.

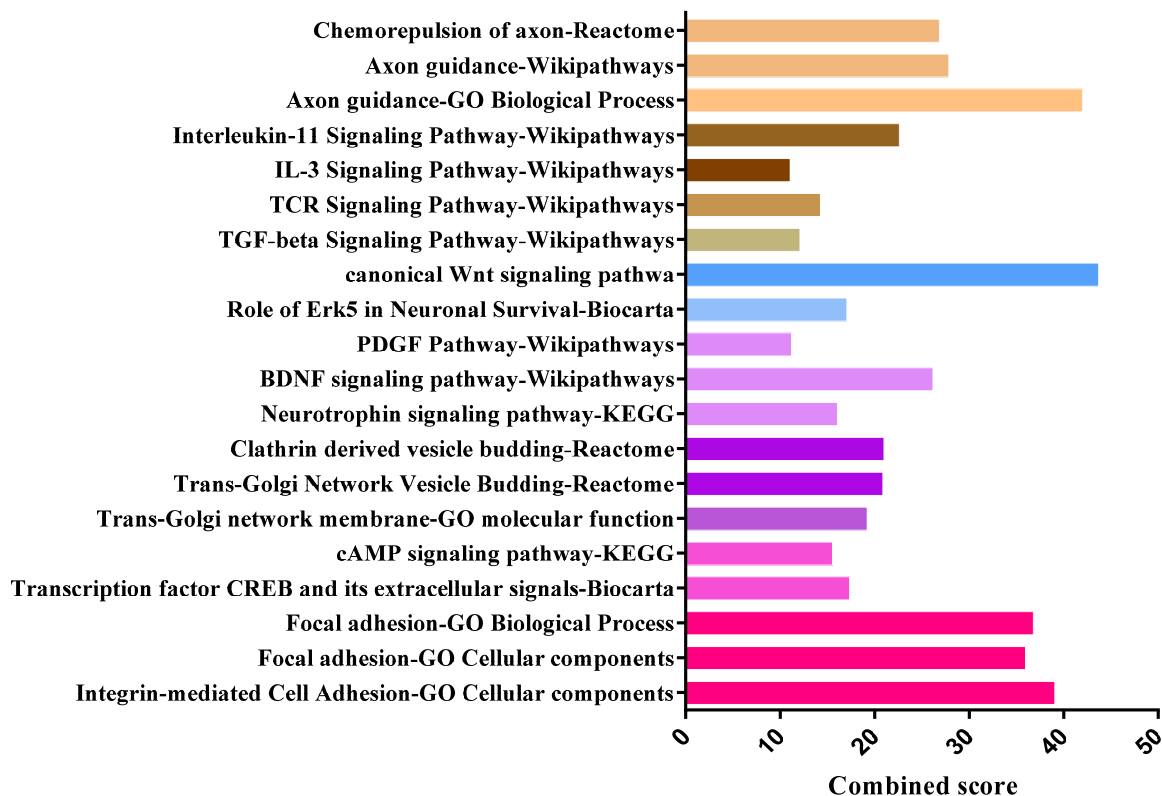
شبکه گلژی و ساختارهای مرتبط با جوانه‌زنی وزیکول‌های با پوشش کلاترین و ترشح فاکتورهای نوروتروفیک از جمله BDNF و PDG نیز از موارد مورد تنظیم microRNAهای فوق هستند. به نظر می‌رسد microRNAهای مورد مطالعه از طریق فاکتورهای نوروتروفیک در کنار دیگر عواملی مانند مسیر پیام‌رسانی WNT موثر بر مسیر آپوپتوز و مسیر Erk5 بر بقای سلول‌ها تاثیر دارند. متعاقب پاساژ سلول که خود نیازمند هضم آنزیمی اتصالات بین سلولی توسط آنزیم‌های پروتئاز است، مسیر TGF- β 1 و سیکل سلولی، همچنین مسیرهای التهابی و محرک سیستم ایمنی فعال می‌شوند که فعالیت مجموعه این مسیرها در کنار هم در حالت کلی با عنوان مسیر پاسخ به زخم نامیده می‌شوند. در تحلیل مسیریابی ژن‌های هدف دو microRNA منتخب، مشاهده شد که بسیاری از عوامل این مسیر توسط این دو میر تنظیم بیان می‌شوند (نمودار ۱).
آنالیز فرایندها و مسیرهای پیام‌رسانی تحت تاثیر microRNAهای انتخابی با استفاده از بررسی برهم‌کنش بین‌پروتئینی: به‌منظور بررسی برهم‌کنش بین‌پروتئینی ژن‌های هدف از وب‌افزار STRING v10.5 و همچنین پایگاه‌های داده CORUM و PPI hub Protein استفاده شد (شکل ۳). در پایگاه داده STRING v10.5 برهم‌کنش‌های پروتئینی توسط الگوریتم‌های متفاوتی تبیین می‌شود که از آن میان رویکرد ما در درجه اول انتخاب برهم‌کنش‌های اثبات‌شده در آزمایشات قبلی و برداشت‌شده از دیگر پایگاه‌های تجربی و در درجه بعدی داده‌های



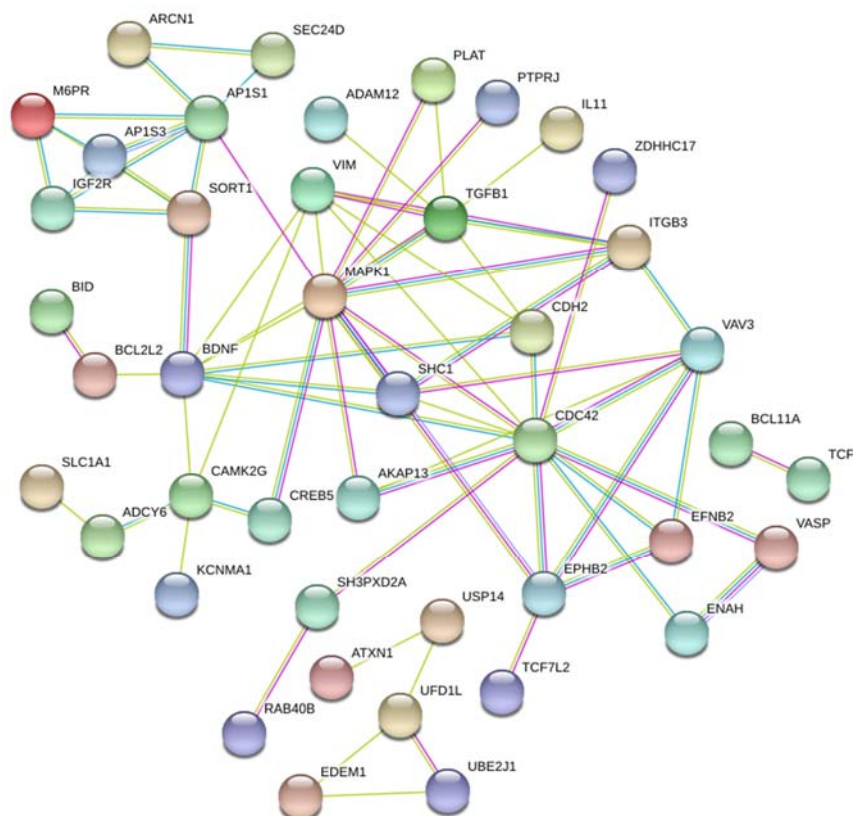
شکل ۱) نحوه انتخاب اهداف miR-211-5p و miR-204-5p از پایگاه‌های داده آنلاین



شکل ۲) شبکه ژنی مرتبط با miR-211-5p و miR-204-5p ژن‌های هدف microRNAهای منتخب با رنگ آبی، فاکتورهای رونویسی‌کننده هر microRNA با رنگ زرد، فاکتورهای رونویسی‌کننده مشترک دو microRNA با رنگ بنفش و خود microRNAها با رنگ سبز، ارتباط microRNA با ژن هدف با خط آبی رنگ و ارتباط microRNA با فاکتور رونویسی‌کننده با رنگ قرمز مشخص شده‌اند



نمودار ۱) نمودار فرآیندها، ساختارها و مسیرهای پیام‌رسانی سلولی مورد تنظیم توسط miR-211-5p و miR-204-5p با استفاده از وب‌افزار قطب Enrichr براساس Combined Score و $adi\ p\text{-value} \leq 0.01$



شکل ۳) شبکه‌ای از پروتئین‌های هدف دارای برهم‌کنش با استفاده از STRING v10.5؛ خطوط بنفش برهم‌کنش‌های برداشت‌شده از دیگر پایگاه‌ها، خطوط آبی برهم‌کنش‌های تجربی و خطوط زرد رنگ برهم‌کنش‌های به‌دست‌آمده از داده‌های متن‌کاوی مقالات

بحث

این دو microRNA با استفاده از الگوریتم‌های پیش‌بینی‌کننده ژن‌های هدف microRNA، مهار مسیر TGF- β II بود [14]. در مطالعه حاضر پایگاه‌های داده پیش‌بینی‌کننده Diana و Targetscan به‌عنوان اولین و دومین پایگاه‌های موفق در پیش‌بینی ژن‌های هدف استفاده شدند. پایگاه داده mirBridge به‌علت استفاده از الگوریتم محاسباتی که برهم‌کنش‌های انتهای ۳' از microRNA با 5'-UTR ژن‌های هدف را نیز در نظر می‌گیرد و ژن‌های هدف با تغییرات بیشتری در سطح پروتئین را گزارش می‌دهد، در کنار دو پایگاه قبلی مورد استفاده قرار گرفت. به علاوه در مطالعه حاضر علاوه بر ژن‌های هدف پیش‌بینی‌شده، ژن‌های هدف تجربی نیز از پایگاه داده miRBase 2016 که حاوی اطلاعات جامعی از آزمایشات AGO-CLIP و AGO-CLASH است، به دست آمد. به‌منظور اعمال شرایط ترانسکرپتوم، با اشتراک‌گیری از ژن‌های دارای افزایش بیان در شرایط مشابه (حدود ۳۰۰۰ ژن) و ژن‌های هدف دو microRNA مورد مطالعه (حدود ۷۰۰ ژن)، تعداد ۹۳ ژن به دست آمد که در ادامه مورد بررسی‌های شبکه ژنی، تحلیل مسیرهای درون سلولی و برهم‌کنش‌های پروتئینی قرار گرفتند.

فاکتورهای رونویسی موثر بر تنظیم بیان این دو با استفاده از پایگاه داده CHEA حاوی اطلاعات تجربی فاکتورهای رونویسی (CHEA Transcription Factor Targets) از طریق قطب Harmonizome به دست آمدند [16] و با استفاده از داده‌های به‌دست‌آمده شبکه ژنی در ارتباط با miR-204-5p و miR-211-

سلول‌های RPE (سلول‌های اپی‌تلیالی رنگدانه‌دار شبکه) نقش مهمی را در حفظ سلامت و عملکرد شبکه ایفا می‌کنند. این سلول‌ها می‌توانند تحت تاثیر عواملی مانند ضربه‌های مکانیکی (همچون موارد ایجاد PVR) یا انباشت ذرات دروسن و ایجاد AMD، ماهیت اپی‌تلیالی و همچنین عملکردهای حیاتی خود در شبکه از دست دهند [12]. طبق مطالعات انجام‌شده در شرایط "درون شیشه" در صورت کشت این سلول‌ها در دانسیته پایین ماهیت این سلول‌ها تغییر یافته و دچار تبدیل از هویت اپی‌تلیالی به مزانشیمی می‌شوند و علائم مشابهی با بیماری‌های ذکرشده را نشان می‌دهند [13]. در یک مطالعه پروفایل microRNA سلول پس از کشت در دانسیته پایین و مشاهده تغییر هویت اپی‌تلیالی سلول و تبدیل از هویت اپی‌تلیالی به مزانشیمی بررسی و مشاهده شد microRNAهای دارای بیشترین کاهش بیان به‌ترتیب miR-204-5p، miR-211-5p، miR-125b-5p و خانواده let-7 بودند [14]. در این مطالعه با افزایش بیان miR-204-5p و miR-211-5p موفق شدند هویت اپی‌تلیالی سلول را در شرایط ذکرشده، حفظ کنند و مانع تبدیل از هویت اپی‌تلیالی به مزانشیمی سلول شوند. به علاوه در این مطالعه نشان داده شد که در صورت ناک‌داون ژن *MITF*، فاکتور رونویسی اصلی در سلول‌های RPE، افزایش بیان هم‌زمان این دو microRNA قادر به حفظ ماهیت و عملکرد سلولی یا به اصطلاح نجات سلول است [15]. در مطالعه مذکور مکانیزم پیشنهادی عملکرد

یکی از مهم‌ترین مسیرهای پیام‌رسانی درگیر در پاسخ به زخم، مسیر TGF- β 1 است. miR-204-5p و miR-211-5p از طریق تنظیم مستقیم ژن‌های *TGFBR1*، *TGFBR2* و *TGFB1* بر این مسیر تاثیر می‌گذارند. به‌علاوه این دو microRNA از طریق مهار مسیرهای پیام‌رسانی TCR و همچنین مسیرهای اینترلوکین ۳ و ۱۱ پاسخ‌های التهابی و تحریک سیستم ایمنی را تنظیم کرده و در مجموع پاسخ به زخم را تا حدی کنترل می‌کنند (نمودار ۱).

ساختار دیگری که در بررسی‌های بیوانفورماتیکی ژن‌های هدف این دو microRNA مشخص شده است ساختارهای اکسونی هستند. با توجه به این که سلول‌های RPE سلول‌هایی مشتق از نورال‌کتودرم بوده و در بسیاری از مطالعات در حضور بعضی فاکتورهای خارجی به سمت دیگر هویت‌های عصبی می‌روند [26, 27]، چنین به نظر می‌رسد که microRNAهای مورد بررسی از طریق ژن‌هایی مانند *BDNF*، *SHC1*، *ITGB3*، *MAPK1*، *EPHB2* و *ENAH* ترانسکریپتوم را نسبت به تغییر هویت به سمت هویت‌های عصبی حفظ می‌کنند.

مطالعه حاضر از انطباق داده‌های مینوم و ترانسکریپتوم سلول‌های رنگدانه‌دار شبکیه موجود در پایگاه داده NCBI جهت پیش‌بینی نقش miR-204-5p و miR-211-5p در سرنوشت این سلول‌ها استفاده کرده است، پیشنهاد می‌شود نقش‌های پیش‌بینی‌شده طی مطالعات آتی در آزمایشگاه به‌صورت تجربی مورد بررسی قرار گیرند.

نتیجه‌گیری

شبکه حاصل از برهم‌کنش پروتئین‌های هدف در مطابقت با نتایج آنالیز مسیرها و ساختارهای تحت تنظیم با مشخص کردن محوریت چند ژن خاص بوده است. در یک شبکه نقاطی که بیشترین برهم‌کنش را با دیگر اجزا دارند یا به عبارتی تعداد خطوط بیشتری آنها را به دیگر نقاط متصل می‌کند از اهمیت بیشتری برخوردارند. بر این اساس اهمیت بعضی ژن‌ها همچون *CDC42* و *MAPK1* در کنار *TGF- β 1* مشهود است. ژن‌های فوق به مثابه نقاط تلاقی چندین مسیر پیام‌رسانی سلولی موثر در تغییر ماهیت سلولی هستند. به‌عنوان مثال *MAPK1* علاوه بر مسیر MAPK در مسیرهای پیام‌رسانی *BDNF*، *VEGFA*، *TGF- β 1* و *CREB* و همچنین تنظیم اتصالات بین سلولی از طریق *PTPRJ* و *CDC42* نقش دارد. با توجه به نقاط ضعف و قوت پایگاه‌های داده مسیریابی تحلیل تجمعیابی ژن‌های تحت تاثیر این دو microRNA نشان داد که از لحاظ ساختاری اکثر ژن‌های هدف در اتصالات بین سلولی و همچنین در غشای وزیکول‌های ترشحی کلاترین‌دار تجمع یافته‌اند.

تشکر و قدردانی: نویسندگان این مقاله بدین‌وسیله از زحمات دکتر علی شریفی زارچی در آموزش آنالیز داده‌های بیوانفورماتیکی و راهنمایی‌های ارزنده ایشان قدردانی کرده و همچنین از زحمات

5p ترسیم شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود در این شبکه فاکتورهای رونویسی *STAT3*، *MITF*، *NANOG*، *SP11*، *TCF4*، *MYC*، *SMARCA4* و *REST* بیان هر دو microRNA را تحت تاثیر قرار می‌دهند که از این میان *TCF4* هدف miR-204-5p نیز است (شکل ۲).

آنالیز ساختارها و فرآیندهای زیستی دخیل و مسیرهای پیام‌رسانی تحت تنظیم microRNAهای مورد مطالعه با استفاده هم‌زمان از چندین پایگاه مسیریابی *Reactome*، *Biocarta*، *Wikipathways* و *KEGG* در کنار استفاده از کنسرسیوم بین‌المللی GO انجام شد. این آنالیزها ساختارها، فرآیندهای زیستی و مسیرهای پیام‌رسانی مشخص و مرتبطی را تحت تاثیر microRNAهای انتخابی با محوریت چند ژن خاص همچون *BDNF*، *TGFB1*، *CDC42* و *MAPK1* نشان دادند (نمودار ۱).

سلول‌های RPE طیف وسیعی از فاکتورهای رشد و فاکتورهای موثر در حفظ شبکیه و کوریوکیپلاری را تولید و ترشح می‌کند [17]، از آن جمله می‌توان به تولید و ترشح فاکتور رشد شبه‌انسولینی-۱ (*IGF-1*) [18] و فاکتور رشد مشتق‌شده از پلاکت (*PDGF*) [19] فاکتور رشد مشتق از سلول‌های RPE (*PEDF*) [20] فاکتور رشد اندوتلیال عروقی (*VEGF*) [21] و فاکتور رشد مشتق از مغز (*BDNF*) [22] نام برد. بسیاری از این فاکتورهای نوروتروفیک، نورون‌ها را در برابر آپوپتوز ناشی از سمیت گلوتامات یا کاهش اکسیژن محافظت می‌کنند [23]. آنالیز مسیرهای پیام‌رسانی در ارتباط با ژن‌های هدف microRNAهای انتخابی نشان داد که microRNAهای فوق مسیرهای ترشحی مذکور را از طریق تنظیم ژن‌های مسیرهای انتقال وزیکول‌های ترشحی از شبکه گلژی همچون *AP1S3*، *M6PY* و *AP1S1* و *CDC42* و به‌طور خاص ترشح *PDGF* [19] و *BDNF* [22] را تنظیم می‌کنند. این microRNAها علاوه بر تنظیم فاکتورهای ترشحی موثر بر بقای نورون‌ها، از طریق تنظیم مستقیم مسیرهای بقای نورون‌ها همچون مسیر *Erk5* (*BCL2*، *IGF2R*) و *MAPK1* (و همچنین برهم‌کنش مستقیم با اجزای مسیر آپوپتوز از طریق ژن‌های *BID*، *EEF1E1*، *KCNMA1*، *DCUN1D3* و *AKAP13* و *VAV3* دیگر مسیرهای مرتبط با آپوپتوز همچون مسیر *WNT* محرک آپوپتوز از طریق ژن‌های *TCF7L2* و *KCNMA1* در حفظ سلامت و بقای سلول‌های RPE و دیگر جمعیت‌های نورونی شبکیه به‌خصوص فوتورسپتورها نقش عمده‌ای ایفا می‌کنند (نمودار ۱). این نتایج در مطابقت کامل با نتایج مطالعات قبلی ناکاوت ژن *DICER* که با حذف microRNAهای درون سلولی افزایش میزان آپوپتوز در سلول‌های RPE و همچنین فوتورسپتورها مشاهده شده بود، قرار داشت [24].

فیبروز و آنژیوژنر نابه‌جا، التهاب و تحریک سیستم ایمنی منشا بسیاری از بیماری‌های منجر به نابینایی از جمله AMD هستند [13]. مطالعات گسترده آنالیز پروفایل بیانی ژن‌ها طی بیماری فوق فرضیه‌ای مبنی بر این که عامل اصلی این بیماری ایجاد پاسخ به زخم مزمن که در نتیجه انباشت ذرات دروسن است را مطرح کرده

13- Radeke MJ, Radeke CM, Shih YH, Hu J, Bok D, Johnson LV, et al. Restoration of mesenchymal retinal pigmented epithelial cells by TGFbeta pathway inhibitors: implications for age-related macular degeneration. *Genome Med.* 2015;7(1):58.

14- Adjianto J, Castorino JJ, Grunwald GB, Philp NJ. MicroRNAs 204/211 promotes differentiation of human retinal pigment epithelial (RPE) cells. *Investig Ophthalmol Visual Sci.* 2012;53(14):1129.

15- Adjianto J, Castorino JJ, Wang ZX, Maminishkis A, Grunwald GB, Philp NJ. Microphthalmia-associated transcription factor (MITF) promotes differentiation of human retinal pigment epithelium (RPE) by regulating microRNAs-204/211 expression. *J Biol Chem.* 2012;287(24):20491-503.

16- Rouillard AD, Gundersen GW, Fernandez NF, Wang Z, Monteiro CD, McDermott MG, et al. The harmonizome: a collection of processed datasets gathered to serve and mine knowledge about genes and proteins. *Database.* 2016;2016.

17- Tanihara H, Inatani M, Honda Y. Growth factors and their receptors in the retina and pigment epithelium. *Prog Retin Eye Res.* 1997;16(2):271-301.

18- Martin DM, Yee D, Feldman EL. Gene expression of the insulin-like growth factors and their receptors in cultured human retinal pigment epithelial cells. *Brain Res Mol Brain Res.* 1992;12(1-3):181-6.

19- Campochiaro PA, Hackett SF, Viores SA, Freund J, Csaky C, LaRochelle W, et al. Platelet-derived growth factor is an autocrine growth stimulator in retinal pigmented epithelial cells. *J Cell Sci.* 1994;107(Pt 9):2459-69.

20- Steele FR, Chader GJ, Johnson LV, Tombran-Tink J. Pigment epithelium-derived factor: neurotrophic activity and identification as a member of the serine protease inhibitor gene family. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90(4):1526-30.

21- Witmer AN, Vrensen GF, Van Noorden CJ, Schlingemann RO. Vascular endothelial growth factors and angiogenesis in eye disease. *Prog Retin Eye Res.* 2003;22(1):1-29.

22- Ming M, Li X, Fan X, Yang D, Li L, Chen S, et al. Retinal pigment epithelial cells secrete neurotrophic factors and synthesize dopamine: possible contribution to therapeutic effects of RPE cell transplantation in Parkinson's disease. *J Transl Med.* 2009;7:53.

23- Ogata N, Wang L, Jo N, Tombran-Tink J, Takahashi K, Mrazek D, et al. Pigment epithelium derived factor as a neuroprotective agent against ischemic retinal injury. *Curr Eye Res.* 2001;22(4):245-52.

24- Ohana R, Weiman-Kelman B, Raviv S, Tamm ER, Pasmanik-Chor M, Rinon A, et al. MicroRNAs are essential for differentiation of the retinal pigmented epithelium and maturation of adjacent photoreceptors. *Development.* 2015;142(14):2487-98.

25- Newman AM, Gallo NB, Hancox LS, Miller NJ, Radeke CM, Maloney MA, et al. Systems-level analysis of age-related macular degeneration reveals global biomarkers and phenotype-specific functional networks. *Genome Med.* 2012;4(2):16.

26- Park CM, Hollenberg MJ. Basic fibroblast growth factor induces retinal regeneration in vivo. *Dev Biol.* 1989;134(1):201-5.

27- Coulombre JL, Coulombre AJ. Regeneration of neural retina from the pigmented epithelium in the chick embryo. *Dev Biol.* 1965;12(1):79-92.

مهندس سید/احمد موسوی در رفع اشکالات کدنویسی کمال امتنان خود را اعلام می‌دارند.

تأییدیه اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

سهم نویسندگان: فاطمه شهریاری (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۴۰٪)؛ شریف مرادی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۲۰٪)؛ مهدی توتونچی (نویسنده سوم)، تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۱۰٪)؛ لیلا ستاریان (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۱۰٪)؛ سید جواد مولی (نویسنده پنجم)، روش‌شناس/پژوهشگر کمکی/تحلیلگر آماری/نگارنده بحث (۱۰٪)؛ حسین بهاروند (نویسنده ششم)، پژوهشگر کمکی/نگارنده بحث (۱۰٪)

منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان گزارش نشده است.

منابع

1- Klein R, Chou CF, Klein BE, Zhang X, Meuer SM, Saaddine JB. Prevalence of age-related macular degeneration in the US population. *Arch Ophthalmol.* 2011;129(1):75-80.

2- Colijn JM, Buitendijk GHS, Prokofyeva E, Alves D, Cachulo ML, Khawaja AP, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in europe: the past and the future. *Ophthalmology.* 2017;124(12):1753-63.

3- Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature.* 2010;466(7308):835-40.

4- Lee EJ, Baek M, Gusev Y, Brackett DJ, Nuovo GJ, Schmittgen TD. Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA.* 2008;14(1):35-42.

5- Selbach M, Schwanhäusser B, Thierfelder N, Fang Z, Raya Khanin R, Rajewsky N. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature.* 2008;455(7209):58-63.

6- Linsley PS, Schelter J, Burchard J, Kibukawa M, Martin MM, Bartz SR, et al. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* 2007;27(6):2240-52.

7- Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* 2005;3(3):e85.

8- Shkumatava A, Stark A, Sive H, Bartel DP. Coherent but overlapping expression of microRNAs and their targets during vertebrate development. *Genes Dev.* 2009;23(4):466-81.

9- Mishima T, Akagi I, Miyashita M, Ishibashi O, Mizuguchi Y, Tajiri T, et al. Study of MicroRNA expression profiles of esophageal cancer. *J Nippon Med Sch.* 2009;76(1):43.

10- Kitano H. Biological robustness. *Nat Rev Genet.* 2004;5(11):826-37.

11- Mukherji S, Ebert MS, Zheng GX, Tsang JS, Sharp PA, van Oudenaarden A. MicroRNAs can generate thresholds in target gene expression. *Nat Genet.* 2011;43(9):854-9.

12- Gullapalli VK, Sugino IK, Van Patten Y, Shah S, Zarbin MA. Impaired RPE survival on aged submacular human Bruch's membrane. *Exp Eye Res.* 2005;80(2):235-48.