

Original Article

Bioinformatics study and cloning of a stem loop structure required for it's over expression

Zahra Shabaninejad, Fatemeh Yousefi, Bahram Mohammad Soltani*, Seyed Javad Mowla

Department of Molecular Genetics, School of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding author; E-mail: soltanib@modares.ac.ir

Received: 15 November 2015 Accepted: 26 January 2016 First Published online: 29 April 2018
Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July; 40(2):50-56

Abstract

Background: ERBB2 is a member of the human epidermal growth factor receptor family and is located at large arm of chromosome 17. This receptor can activate a variety of signaling pathways which inhibit apoptosis and induce cell proliferation. MiRNAs are small, single strand, non coding RNAs that regulate gene expression at post transcriptional level and control important cellular processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and tumor genesis. Genomic location of miRNAs demonstrated that they are located at fragile and/ or cancer related chromosomal regions. The aim of this study is production of necessary structure to over express the predicted area of a novel miRNA in ERBB2 gene following its bioinformatics prediction.

Methods: Different bioinformatics software was used to investigate stem loop structures with a potential to produce novel miRNAs, Dicer and Drosha enzymes recognition sites and conservation of interested area. Then the surrounding area of candidate stem loop structure was cloned in pEGFPC1 expression vector successfully.

Results: Different software study shows a high probability of processing a mature miRNA. The required construct for more studies was cloned in pEGFPC1 expression vector successfully.

Conclusion: Bioinformatics analysis predictING stem loop structure has a potential to produce a novel miRNA.

Keywords: Bioinformatics, ERBB2 Gene, Cloning

How to cite this article: Shabaninejad Z, Yousefi F, Mohammad Soltani B, Mowla S.J. [Bioinformatics Study and Cloning of a Stem loop Structure required for its Overexpression]. Med J Tabriz Uni Med Sciences Health Services. 2018 June-July;40(2):50-56. Persian.

مقاله پژوهشی

مطالعه بیوانفورماتیکی ساختار ساقه حلقه و کلون نمودن سازه لازم جهت بیش بیان آن

زهره شبانی‌نژاد، فاطمه یوسفی، بهرام محمدسلطانی*، سید جواد مولی

گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*نویسنده مسئول؛ ایمیل: soltanib@modares.ac.irدریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۳ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۹ انتشار برخط: ۱۳۹۷/۲/۹
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷ خرداد و تیر؛ ۴۰(۲): ۵۰-۵۶

چکیده

زمینه: ERBB2 عضوی از خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی بوده و بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷ قرار گرفته‌است. این گیرنده می‌تواند باعث فعال شدن مسیرهای پیام‌رسانی شده و در نهایت تکثیر سلولی را افزایش و از آپوپتوز جلوگیری کند. miRNA ها RNA های غیرکدکننده تک‌رشته‌ای کوچکی هستند که به عنوان تنظیم‌کننده‌های بیان ژن در سطح پس از رونویسی عمل می‌کنند. miRNA ها فرایندهای مهم سلولی مانند تکثیر، تمایز، آپوپتوز و تومورزایی را کنترل می‌کنند. ناحیه ژنومی miRNA ها نشان می‌دهد که آن‌ها در نواحی کروموزومی حساس و مرتبط با سرطان قرار گرفته‌اند. هدف از این تحقیق انجام مطالعات اولیه بیوانفورماتیکی جهت شناسایی miRNA جدید در ژن مهم ERBB2 و ساختن سازه لازم جهت بیش بیان ناحیه مورد نظر است. روش کار: در تحقیق حاضر ابتدا با نرم‌افزارهای مختلف توانایی ایجاد ساختار ساقه حلقه، محل برش آنزیم‌های Dicer و Drosha و حفاظت‌شدگی ناحیه مورد نظر بررسی گردید. سپس ناحیه اطراف ساختار ساقه حلقه کاندید در حامل بیانی pEGFPC1 کلون گردید. یافته‌ها: بررسی با نرم‌افزارهای مختلف نشان داد که از این توالی و ساختار miRNA بالغ، با احتمال بالا می‌تواند پردازش گردد. جهت ادامه مطالعات سازه مورد نیاز در حامل بیانی pEGFPC1 با موفقیت کلون گردید. نتیجه‌گیری: نتایج مبنی بر تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی نشان‌دهنده امکان تولید miRNA جدید از این ساختار ساقه حلقه می‌باشد.

کلید واژه‌ها: بیوانفورماتیک، ژن ERBB2، کلون سازی

نحوه استناد به این مقاله: شبانی‌نژاد ز، یوسفی ف، محمدسلطانی ب، مولی س.ج. مطالعه بیوانفورماتیکی ساختار ساقه حلقه و کلون نمودن سازه لازم جهت بیش بیان آن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز. ۱۳۹۷؛ ۴۰(۲): ۵۰-۵۶

حق تألیف برای مؤلفان محفوظ است.

این مقاله با دسترسی آزاد توسط دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی تبریز تحت مجوز کرییتیو کامنز (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>) منتشر شده که طبق مفاد آن هرگونه استفاده تنها در صورتی مجاز است که به اثر اصلی به نحو مقتضی استناد و ارجاع داده شده باشد.

مقدمه

در انسان چهار عضو از خانواده گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی با اسامی ۱، ۲، ۳، ۴ ERBB وجود دارد (۱). از این میان ERBB2 به طور مستقیم به لیگاند متصل نمی‌شود و با تشکیل هتروکمپلکس با سایر اعضای خانواده EGFR به ویژه ERBB1 و ERBB3 در پیام‌رسانی شرکت می‌کند (۲). سلول‌های اپتیلیال طبیعی، میزان کمی از پروتئین ERBB2 را بر روی غشاء پلاسمایی‌شان به صورت الگوی اختصاصی بافتی بیان می‌کنند. این گیرنده توسط ژن ERBB2، واقع بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۷، کد می‌شود. در سلول‌های توموری خطا در همانندسازی DNA، اغلب باعث ایجاد نسخه‌های چندگانه ژن بر روی یک کروموزوم منفرد می‌گردد. تشدید ژن ERBB2 تقریباً در ۲۵ درصد بیماران با نوع مهاجم سرطان پستان دیده می‌شود (۳). این افزایش بیان منجر به بزرگ شدن اندازه تومور، گسترش سرطان به گره‌های لنفاوی، افزایش سلول‌های فاز S سیکل سلولی، آنیوپلوئیدی در سلول و کاهش گیرنده‌های هورمون‌های استروئیدی می‌گردد. بیش بیان این گیرنده در دیگر سرطان‌ها همچون ریه، پانکراس، کولون، مثانه، نای، معده و رحم نیز گزارش شده است (۴-۶). سلول‌های دارای بیان بالای ERBB2 با گذر سریع از مرحله G1/S، تقسیم سلولی را در زمان کوتاه‌تری انجام می‌دهند (۷). علاوه بر این فعال شدن گیرنده ERBB2 موجب فعال شدن سرین پروتئاز الاستاز، می‌گردد. فرم بالغ و فعال cyclinE با شکسته شدن توسط الاستاز ایجاد می‌گردد. در نتیجه فعال شدن cyclinE سلول در زمان کوتاه‌تری از مرحله G1 عبور می‌کند (۸). microRNA (miRNA) ها، خانواده‌ای از RNA های کوچک غیرکد کننده به طول ۲۴-۲۰ نوکلئوتید هستند که در تنظیم پس از رونویسی ژن‌ها دخالت دارند (۹). MiRNA ها در گیاهان، جانوران و تعدادی از ویروس‌ها یافت شده و به خوبی در طی تکامل حفظ شده‌اند. این RNA ها معمولاً توسط RNA polymerase II رونویسی شده و سپس کلاهک‌گذاری و اضافه شدن دم پلی A روی آن‌ها صورت می‌گیرد. رونوشت اولیه توسط آنزیم Drosha بریده و پیش‌ساز ساقه حلقه‌ای به طول تقریبی ۷۰ نوکلئوتید تولید می‌گردد. پس از انتقال این پیش‌ساز از هسته به سیتوپلاسم، توسط آنزیم Dicer بریده شده و فرم بالغ miRNA ایجاد می‌شود. miRNA بالغ درون کمپلکس RISC قرار گرفته و با ناحیه 3' UTR در mRNA ژن‌های هدف جفت می‌شود که در نهایت موجب تجزیه یا ممانعت از ترجمه mRNA می‌شود (۱۰). به نظر می‌رسد miRNA ها بتوانند بیان یک سوم از ژن‌های کدکننده پروتئین را تنظیم نمایند. miRNA ها در تنظیم فرآیندهای مختلف سلولی همچون رشد، تکثیر، تمایز، تومورزایی، تهاجم، رگ‌زایی و متاستاز نقش کلیدی ایفا می‌کنند. بیان غیر طبیعی miRNA ها در بسیاری از سرطان‌ها گزارش شده‌است. این شواهد نشان می‌دهد miRNA ها می‌توانند

به‌عنوان ژن سرطانزا یا سرکوب‌گر تومور در بسیاری از بدخیمی‌های انسانی نقش کلیدی داشته باشند (۱۱). Lin-4 و Let-7 اولین miRNA هایی هستند که در سی-الگانس (Caenorhabditis elegans) کشف شدند. از آن زمان تاکنون توالی‌های miRNA زیادی در انسان، گیاهان و جانداران دیگری شناسایی و ثبت شده است (۱۲). از آنجایی که بخش اعظم ژنوم انسان پروتئین کد نمی‌کند انتظار می‌رود بیش از ۵۵۰۰۰ ژن کدکننده miRNA در ژنوم انسان وجود داشته‌باشد. در ابتدا کشف miRNA های جدید با کلون‌سازی و تعیین توالی‌های گسترده انجام می‌شد. پس از شناسایی خصوصیات بیشتری از miRNA ها همچون ساختار ثانویه ساقه حلقه و حفاظت‌شدگی، استفاده از بیوانفورماتیک رایج‌تر گردید. نرم‌افزارهای زیادی براساس پارامترهای لازم برای miRNA طراحی شدند. در این حالت گستره جستجو از کل ژنوم به مناطق مستعد برای تولید miRNA محدود می‌گردد. علاوه بر این miRNA هایی که در یک بافت یا زمان خاص بیان می‌شوند نیز شناسایی می‌شوند (۱۳). با توجه به اهمیت بالای ژن ERBB2 مطالعات اولیه بیوانفورماتیکی جهت شناسایی miRNA جدید در این ژن انجام و سازه لازم جهت بیش بیان ناحیه مورد نظر ساخته شد. بیش بیان‌سازی شناسایی miRNA بالغ را تسهیل می‌نماید. علاوه بر این می‌توان از این سازه جهت مطالعه اثرات احتمالی miRNA احتمالی بر فرآیندهای سلولی همچون چرخه سلولی و یا شناسایی ژن‌های هدف آن استفاده نمود.

روش کار

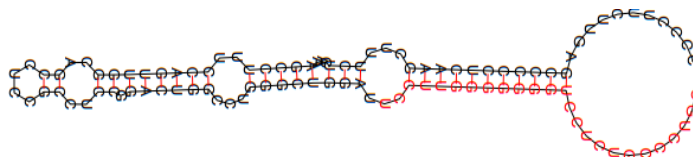
پیشگویی بیوانفورماتیکی ساختار سنجاق سری به منظور جستجوی ساختارهای سنجاق سری احتمالی در منطقه ژنومی مورد نظر، ابتدا از نرم‌افزار SCC profiler (<http://miRNA.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html>) استفاده شد. نرم‌افزار (MirEval/<http://tagc.univ-mrs.fr/mireval>) نیز با آنالیز همزمان تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید قادر است توالی‌های شبه پیش ساز را پیش‌بینی کند. به منظور تشخیص ساختارهای pre-miRNA واقعی از غیر واقعی از نرم‌افزار miPRED (<http://www.bioinf.seu.edu.cn/miRNA>) استفاده گردید. بررسی میزان حفاظت‌شدگی با وارد کردن توالی مورد نظر در سایت UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu>)، درفت سال ۲۰۰۴ انجام گردید. با استفاده از نرم‌افزارهای Mature miR- (Bayes/<http://mirna.imbb.forth.gr/MatureBayes.html>)، FIND (<http://140.120.14.132:8080/MicroRNAProject-MaturePred>) و Web (<http://nclab.hit.edu.cn/maturepred>) (جایگاه برش آنزیم Dicer و Drosha و miRNA بالغ احتمالی) پیش‌بینی گردید. با نرم‌افزار Mature Bayes محل قرارگیری ساقه و

یافته‌ها

miRNAهای احتمالی ساقه‌های ۳' و ۵' بررسی شد. در نرم‌افزار FIND-miR پس از وارد کردن توالی مورد نظر، توالی پیش‌ساز miRNA و ساختار دوم احتمالی آن پیشنهاد شد. همچنین این نرم‌افزار miRNAهای بالغ احتمالی ساقه‌های ۵' و ۳' را نیز معرفی و اهداف احتمالی آن‌ها را با نرم‌افزار Target scan بررسی نمود. به منظور کلون‌کردن پیش‌ساز miRNA ابتدا با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo analyzer و Oligo7 طراحی پرایمر انجام گردید. پرایمر Forward با توالی TCCAAGAGACTGGCGCTTTC و پرایمر Reverse با توالی TATGCCACCCTCCACTCCA پس از Blast کردن در پایگاه داده NCBI و تایید اختصاصیت مطلوب پرایمرها، انتخاب گردید. DNA ژنوم انسانی طبق روش استاندارد از سلول‌های سفید خونی استخراج و به عنوان الگو جهت انجام PCR استفاده گردید. واکنش PCR با آنزیم Taq پلیمراز و پرایمرهای ذکر شده انجام شد. برای تعیین بهترین دمای اتصال، PCR در گرادینانت دما از ۵۴ درجه سانتیگراد تا ۶۰ درجه سانتیگراد انجام و دمای ۵۸ درجه سانتیگراد انتخاب گردید. برنامه PCR برای ازدیاد قطعه مورد نظر به شرح زیر انجام گرفت: ۵ دقیقه واسرشت اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتیگراد سپس ۳۰ چرخه تکثیر که هر چرخه شامل: ۳۰ ثانیه واسرشت سازی در دمای ۹۵ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای اتصال در ۵۸ درجه سانتیگراد، ۳۰ ثانیه دمای طولی سازی در ۷۲ درجه سانتیگراد انجام گردید. پس از انجام PCR بر روی DNA ژنومی، قطعه تکثیر شده با اندازه مورد نظر روی ژل آگارز ۱/۵٪ مشاهده و با استفاده از کیت (Gene All, South Korea) از ژل استخراج گردید. واکنش الحاق‌سازی محصول PCR مورد نظر و TA وکتور pTZ57R/T در دمای ۱۶°C به مدت ۱ ساعت انجام و با روش شوک حرارتی در باکتری مستعد DH5α ترانسفورم گردید. کلونی‌های نو ترکیب با استفاده از پرایمرهای وکتور (M13) و قطعه، بررسی و در نهایت کلونی حاوی پلاسمید مطلوب انتخاب و در LB (Luria-Bertani)

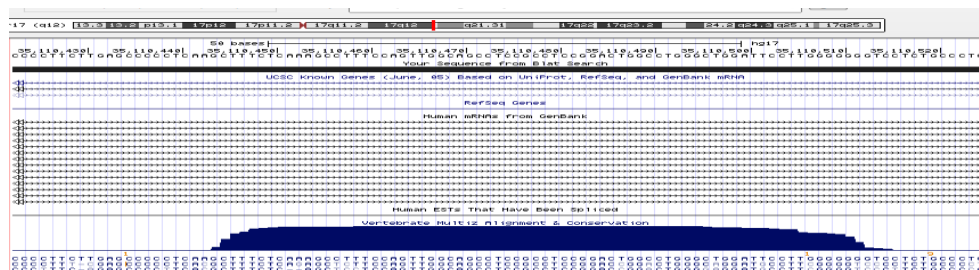
ب

ج



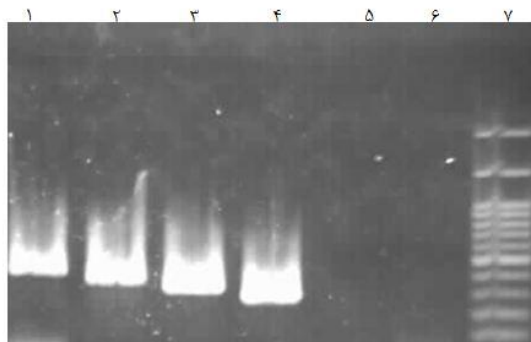
شکل ۱: آنالیز توالی توسط نرم افزار **SSC profiler** (الف) جایگاه کروموزومی و رشته قرارگیری ساختار ساقه حلقه را بر اساس نسخه هفدهم ژنوم انسان، مشخص می‌کند (ب) توالی و ساختار دوم پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد (ج) نحوه جفت شدن بازها و تشکیل ساختار ساقه حلقه آورده شده‌است. نواحی قرمز رنگ در ردیف‌های **Hela** بیان می‌شوند.

Pre-miRNA-like Hairpin? Yes
Pre-miRNA-like Hairpin? Yes
The Secondary Structure :
(((((((((((...((...(((((((...(((...))..)))....))))))...))))))...)))))))))
MFE: -40.30
p-value (shuffle times:1000): 0.03
Prediction result: Real microRNA precursor
Prediction confidence: 60.3%



با کنترل منفی (DNA با آب جایگزین شد) الکتروفورز گردید. نتایج ژل نشان داد که اندازه محصولات PCR با اندازه قطعات مورد انتظار یکسان بوده‌اند. سپس قطعه استخراج شده از ژل در TA وکتور pTZ57R/T کلون گردید. کلونی‌های نو ترکیب بر اساس مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین غربالگری شدند. کلونی‌های دارای قطعه مورد نظر با کلونی PCR چندگانه انتخاب شدند. با استفاده از جایگاه‌های EcoR1 و BamH1 در تنه حامل TA قطعه مورد نظر بریده شد و در حامل pEGFP1 بریده شده کلون گردید و پس از غربالگری با کانامایسین و کلونی PCR، باکتری نو ترکیب مناسب انتخاب گردید (شکل ۳). در روش کلونی PCR با تلفیقی از پرایمرهای حامل و قطعه روی باکتری‌های مورد نظر PCR انجام می‌گیرد. در نهایت سازه مورد نظر جهت تعیین توالی ارسال و تایید گردید.

نرم‌افزار Mature Bayes با آنالیز توالی وارد شده جایگاه ساقه ۳' و ۵' را مشخص و miRNA بالغ هر ساقه را پیشگویی نمود. مقایسه نتایج حاصل از این نرم‌افزار و miPRED نشان داد هر دو نرم‌افزار جایگاه ساقه‌ها را تقریباً یکسان پیش بینی نموده‌اند. در نرم‌افزار miR-FIND پس از وارد کردن توالی مورد نظر، نرم‌افزار یک توالی پیش‌ساختار MiRNA، و ساختار دوم احتمالی آن را پیشنهاد نمود. همچنین این نرم‌افزار miRNA های بالغ احتمالی ساقه ۵' و ۳' را نیز معرفی و اهداف احتمالی آن‌ها را با نرم‌افزار Target scan بررسی می‌نماید. کلون سازی ساختار ساقه‌حلقه در حامل pEGFPc1 بدین صورت انجام گرفت. انجام واکنش PCR روی DNA ژنوم انسانی با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده صورت گرفت که موجب تکثیر قطعه مورد نظر به اندازه ۳۰۰ جفت باز گردید. محصولات PCR ب روی ژل آگارز ۱.۵٪ همراه



شکل ۳: الکتروفورس ژل آگارز محصول کلونی PCR شش گانه: از چپ به راست: ستون (۱) Forward و Reverse (۲) وکتور، و Reverse، قطعه ستون (۳) Forward و Reverse، قطعه ستون (۴) Forward و Reverse، ستون (۵) Forward، Reverse، و ستون (۶) Reverse، قطعه و وکتور، ستون (۷) نشانگر DNA

بحث

تقریباً یکسانی را معرفی کرده و یکدیگر را تایید می‌کنند. در مطالعات بیوانفورماتیکی جهت کاهش میزان خطا لازم است از چندین نرم‌افزار و سایت به موازات هم استفاده شود تا در نهایت به ساختاری دست یابیم که بیشترین امتیاز را برای واقعی بودن پیش ساز miRNA داشته باشد. اولین مرحله در شناسایی فرم بالغ miRNA احتمالی کلون نمودن آن در یک حامل بیانی مناسب است تا بتوان سازه مورد نظر را بیش بیان نمود (۱۴). بدین منظور از حامل pEGFPC1 استفاده شد. از جمله خصوصیات مفید این حامل بیش بیان مناسب و بالای قطعه کلون شده و دارا بودن نشانگر GFP است که میزان ترانسفکت شدن حامل به درون سلول‌ها را نشان می‌دهد. این حامل تعداد نسخه بالایی در سلول E-coli داشته و بنابراین می‌توان مقدار مناسب آن را استخراج نمود. علاوه بر این به دلیل اندازه مناسب (۴/۷ کیلو جفت باز) نرخ ترانسفکت آن به رده‌های سلولی نسبتاً بالا است (۱۷). پس از تکثیر قطعه از روی DNA ژنوم انسانی با واکنش PCR، قطعه در حامل TA کلون گردید. دلیل استفاده از حامل TA اطمینان از هضم دوگانه با آنزیم‌های محدودالثر است. سپس قطعه بریده شده در حامل بیانی کلون گردید. نتایج کلونی PCR شش‌گانه نشان می‌دهد قطعه مورد نظر با اندازه مناسب و در جهت صحیح در حامل کلون گردیده است که این نتایج با تعیین توالی تایید گردید. با کلون کردن این پیش ساز احتمالی miRNA امکان شناسایی ساده‌تر فرم بالغ و تاثیر آن بر ژن‌های هدف احتمالی و فرایندهای سلولی همچون چرخه سلولی فراهم می‌گردد.

نتیجه‌گیری

با توجه به مطالعات بیوانفورماتیکی انجام شده به نظر می‌رسد این توالی و ساختار توانایی پردازش miRNA بالغ را داشته باشد. این نتایج نیاز به تایید آزمایشگاهی دارد. به این منظور سازه لازم جهت بیش‌بیان با موفقیت ساخته شد. در ادامه مطالعات لازم است با استفاده از نتایج بیوانفورماتیکی و سازه کلون شده وجود miRNA به تایید آزمایشگاهی برسد.

قدردانی

این پژوهش بخشی از پایان‌نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک مولکولی تصویب شده در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس بوده و با حمایت مالی این دانشگاه انجام شده است.

References

1. Zhang H, Berezov A, Wang Q, Zhang G, Drebin J, Murali R, et al. ErbB receptors: from oncogenes to targeted cancer

در سال ۲۰۱۵ Dokanehiifard و همکاران با انجام مطالعات بیوانفورماتیکی و بیش بیان سازه ساختارهای ساقه حلقه موفق به کشف miRNA های جدیدی در ژن TrkC شدند (۱۴). ساختار ثانویه ساقه-حلقه از خصوصیات ضروری یک پیش ساز miRNA است. بنابراین تعدادی از نرم‌افزارهای کشف miRNA نیز بر همین اساس طراحی شده و امکان تشکیل ساختار ساقه حلقه را بررسی می‌کنند. از جمله این نرم‌افزارها می‌توان به SSC profiler اشاره نمود. پس از وارد کردن جایگاه کروموزومی توالی ساختار ثانویه توالی را پیش‌بینی و انرژی آزاد آن را محاسبه می‌شود. علاوه بر این این نرم‌افزار قادر است بر اساس داده‌های بیانی سلول‌های HeLa و HepG2 سطوح بیان ساختار پیش‌بینی شده نیز بررسی کند (۱۵). نتایج حاصل از آنالیز توالی با این نرم‌افزار نشان می‌دهد این توالی دارای ساختار ثانویه ساقه-حلقه با انرژی آزاد مناسب بوده و ناحیه‌ای از آن در رده سلولی HeLa دارای بیان می‌باشد. استفاده از نرم‌افزار miPred برای تشخیص ساختارهای واقعی پیش‌ساز miRNA از دیگر ساختارهای غیرواقعی شبه ساختارهای ساقه-حلقه‌ای بسیار مفید است. برای این نرم‌افزار ۹۸/۲ درصد اختصاصیت و ۹۵ درصد حساسیت گزارش شده- است (۱۶). آنالیز توالی ساقه-حلقه با این نرم‌افزار نشان داد این ساختار می‌تواند با درصد اطمینان قابل قبولی یک پیش‌ساز واقعی miRNA باشد. مطالعات با مقایسه ژنهای miRNA انسانی و همولوگهای آنها در ژنوم موش، رت، جوجه و شمیمانه نشان می‌دهد که الگوی حفظ شدگی خاصی بین این ژنها وجود دارد. بنابراین حفاظت شدگی توالی به‌ویژه در نواحی ایترونی می‌تواند دلیلی بر پردازش miRNA از ساختار ساقه-حلقه باشد. بررسی الگوی حفاظت شدگی توالی با نرم‌افزار UCSC Genome Browser نشان می‌دهد این توالی در طول تکامل به خوبی حفظ شده است. یک پیش‌ساز واقعی miRNA لازم است توسط آنزیم-های Dicer و Drosha بریده شوند تا miRNA بالغ تولید گردد. جهت پیشگویی توالی شناسایی این دو آنزیم از نرم‌افزارهای Mature Bayes و miR-FIND استفاده گردید. این دو نرم‌افزار توالی پیش‌ساز را پیش‌بینی و miRNA های بالغ ساقه‌های ۳' و ۵' را معرفی می‌کنند. علاوه بر این نرم‌افزار miR-FIND براساس نرم‌افزار Target Scan اهداف miRNA های بالغ احتمالی را بررسی می‌نماید. نتایج بررسی توالی با این دو نرم‌افزار miRNA های بالغ احتمالی را معرفی می‌کند که می‌توان از این اطلاعات جهت تایید آزمایشگاهی miRNA بالغ استفاده نمود. نتایج پیش‌بینی پیش ساز سه نرم‌افزار SSC profiler، Mature Bayes و miR-FIND توالی

therapies. *Journal of Clinical Investigation* 2007; 117(8): 2051-2058. doi: 10.1172/JCI32278

2. Linggi B, Carpenter G. ErbB receptors: new insights on mechanisms and biology. *Trends in Cell Biology* 2006; **16**(12): 649-656. doi: 10.1016/j.tcb.2006.10.008
3. Piccart-Gebhart A, Procton M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *New England Journal of Medicine* 2005; **353**(16): 1659-1672. doi: 10.1517/14656566.7.5.631
4. Gravalos C, Jimeno A. HER2 in gastric cancer: a new prognostic factor and a novel therapeutic target. *Annals of Oncology* 2008; **19**(9): 1523-1529. doi: 10.1093/annonc/mdn169
5. Teplinsky E, Muggia F. Targeting HER2 in ovarian and uterine cancers: Challenges and future directions. *Gynecologic Oncology* 2014; **135**(2): 364-370. doi: 10.1016/j.ygyno.2014.09.003
6. Koeppen H, Wright B, Burt A, Quirke P, McNicol A, Dybdal N, et al. Overexpression of HER2/neu in solid tumours: an immunohistochemical survey. *Histopathology* 2001; **38**(2): 96-104. doi: 10.1046/j.1365-2559.2001.01084.x
7. Sahin Ö, Fröhlich H, Löbke C, Korf U, Burmester S, Majety M, et al. Modeling ERBB receptor-regulated G1/S transition to find novel targets for de novo trastuzumab resistance. *BMC Systems Biology* 2009; **3**(1): 1. doi: 10.1186/1752-0509-3-1
8. Le X, Claret F, Lammayot A, Tian L, Deshpande D, LaPushin R, et al. The role of cyclin-dependent kinase inhibitor p27Kip1 in anti-HER2 antibody-induced G1 cell cycle arrest and tumor growth inhibition. *Journal of Biological Chemistry* 2003; **278**(26): 23441-23450. doi: 10.1074/jbc.m300848200
9. Meng F, Henson R, Wehbe J, Hania G, Kalpana J, Samson T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* 2007; **133**(2): 647-658. doi: 10.1053/j.gastro.2007.05.022
10. Bartel D.P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**(2): 281-297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5
11. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics* 2010; **11**(9): 597-610. doi: 10.1038/nrg2843
12. Lindow M, Kauppinen S. Discovering the first microRNA-targeted drug. *The Journal of Cell Biology* 2012; **199**(3): 407-412. doi: 10.1083/jcb.201208082
13. Oulas A, Boutla A, Gkirtzou K, Reczko M, Kalantidis K, Poirazi P. Prediction of novel microRNA genes in cancer-associated genomic regions-a combined computational and experimental approach. *Nucleic Acids Research* 2009; **37**(10): 3276-3287. doi: 10.1093/nar/gkp120
14. Dokanehiifard S, Soltani B, Parsi S, Hosseini F, Javan M, Mowla J. Experimental verification of a conserved intronic microRNA located in the human TrkC gene with a cell type-dependent apoptotic function. *Cellular and Molecular Life Sciences* 2015; **72**(13): 2613-2625. doi: 10.1007/s00018-015-1868-4
15. Parsi S, Soltani B, Hosseini E, Tousi S, Mowla J. Experimental verification of a predicted intronic microRNA in human NGFR gene with a potential pro-apoptotic function. *PloS one* 2012; **7**(4): e35561. doi: 10.1371/journal.pone.0035561
16. Jiang P, Wu H, WangW, MaW, Sun X, Lu Zg. MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. *Nucleic Acids Research* 2007; **35** suppl 2: W339-W344. doi: 10.1093/nar/gkm368
17. Zhang G, Gurtu V, Kain S.R. An enhanced green fluorescent protein allows sensitive detection of gene transfer in mammalian cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1996; **227**(3): 707-711. doi: 10.1006/bbrc.1996.1573.