

ABSTRACT

Structural and Contextual Study of MicroRNA-Target Site Interaction in 3'UTR of Protein Coding Genes, Based on Exact Validated Evidences

Morteza Mahdavi*, Mohammadreza Nassiri, Mojtaba Tahmoorespur

The objective of this study was to investigate the underlying characteristics of micro-RNA (miRNA) interaction and their target sites based on highly accurate published wet lab findings. The miRNAs are a subclass of noncoding RNA with a widespread function in the majority of biological processes via their roles in regulating gene expression. A dilemma regarding the implicating of miRNAs in genetics engineering is their complicate mechanism for target detection and their extended functions. In this regard, we investigated characteristics of miRNA and mRNA interaction. After collecting validated interactions and filtering non-informatic and less accurate records, structural attributes and contextual characteristics of these interactions were investigated. The features were: statistically significant for target site observation in 3'UTR sequence, correlation with AREs elements, composition of nucleotides and their status in duplex, and some structural and positional attributes. Our findings approved previous suggested features and brought out new results such as the relationship of target sites with AREs and some structural and contextual attributions which place emphasis on the importance of positional and compositional state of nucleotide in miRNA-mRNA interaction.

Key words: MicroRNAs; Gene Expression Regulation; RNA Interference; Binding Sites; Forecasting

*Morteza Mahdavi, Ph.D. Candidate

Ph.D. Candidate, Ferdowsi University, Faculty of Agriculture, Department of Animal Sciences

Email: fum.authors@gmail.com

Submission Date: 15. Jun. 2014 • Acceptance Date: 27. Jul. 2014

مطالعه ویژگی های بافتی و ساختاری برهم کنش بین microRNA و جایگاه هدف آن در ناحیه 3'UTR ژنهای کد کننده پروتئین بر اساس شواهد دقیق آزمایشگاهی

مرتضی مهدوی*، محمدرضا نصیری، مجتبی طهمورث پور

دانشگاه فردوسی مشهد، گروه علوم دامی

چکیده/ هدف از انجام این مطالعه شناسایی ویژگی های نهفته در برهم کنش بین مایکرو آر ان ای (miRNA) و جایگاه های هدف آنها بر اساس نتایج تأیید شده آزمایشگاهی بود. miRNA ها توالی های کوتاه از جنس RNA های غیر کد کننده می باشند که به طور گسترده ای در تعدیل و تنظیم بیان ژنها در تمامی موجودات پریاخته ای نقش دارند. مهمترین چالش پیش رو در بکارگیری این مولکولها سطح وسیع فعالیت و مکانیسم های پیچیده و ناشناخته ای است که در زمینه تشخیص ژنهای هدف توسط آنها بکار می رود. به منظور شناسایی این مکانیسم ها اقدام به بررسی ویژگی های موجود در برهم کنش بین توالی miRNA و mRNA شد. بدین منظور miRNA ها و جایگاه های هدف آنها از پایگاه های مرتبط گردآوری و پالایش شدند. ویژگی های مختلف از جمله معنی داری آماری حضور miRNA در توالی 3'UTR، ارتباط جایگاه هدف با موتیف های AREs، ویژگی های موقعیتی جایگاه هدف در 3'UTR و ترکیب نوکلئوتیدی، ماهیت و وضعیت نوکلئوتیدها نسبت به یکدیگر در بخش های مختلف برهم کنش مورد بررسی قرار گرفت. یافته های ما نتایج ارائه شده قبلی را تأیید می کند. علاوه برخی ویژگی های جدید مانند ارتباط بین عناصر AREs و جایگاه هدف و همچنین برخی ویژگی های ساختاری و بافتی که نشان دهنده اهمیت موقعیت و وضعیت نوکلئوتیدها در برهم کنش miRNA-mRNA می باشد را ارائه می نماید.

واژگان کلیدی: MicroRNAs؛ تنظیم بیان ژن؛ تداخل RNA؛ جایگاه اتصال؛ پیش بینی جایگاه

مقدمه

ایفا می کنند (۲). گفته می-شود که آنها با بسیاری از فرایندهای بیولوژیکی مانند نمو، افتراق سلولی، متابولیسم، چرخه سلولی و پیری در ارتباط هستند (۳-۶). با توجه به اهمیت miRNA ها یکی از دغدغه های اصلی محققین در این زمینه تعیین ویژگی هایی است که miRNA ها بر اساس آن جایگاه های هدف خود را شناسایی کرده و یا بر روی آنها اثر می گذارند. تشخیص جایگاه هدف miRNA در جانوران پریاخته ای غالباً بر اساس مکمل بودن جزئی بین توالی آنها و ناحیه 3'UTR ترانسکرپت ها می باشد

توالی های miRNA قطعات کوتاه از RNA های غیر کدکننده با طولی حدود ۲۲ نوکلئوتید می باشند که با اتصال به نواحی غیر قابل ترجمه انتهای 3' از mRNA (3'UTR)، منجر به تجزیه یا کاهش بیان آنها در مرحله پس از نسخه برداری می شوند (۱). در طول سالهای اخیر مشخص شده است که miRNA ها عواملی کلیدی در تنظیم بیان ژن بوده و در غالب مسیرهای بیولوژیکی نقش

* مرتضی مهدوی، دانشجوی داکترا

دانشجوی مقطع دکتری دانشگاه فردوسی مشهد - دانشگاه فردوسی مشهد،

گروه علوم دامی

پست الکترونیک: fum.authors@gmail.com

تاریخ دریافت: ۹۳/۲/۲۵ • تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۵

(شما می توانید برای مشاهده تصاویر به صورت رنگی، مقاله را از وب سایت ما به آدرس www.g3m.ir دانلود نمایید.)

(۷). با این وجود مشخص شده است که شناسایی جایگاه هدف توسط miRNA ها به عوامل دیگری نیز وابسته است (۸-۱۰). هدف از این مطالعه بررسی جایگاه های فعال و دارای کارکرد miRNA و بررسی چگونگی تعامل بین miRNA ها و این جایگاه ها آنها از لحاظ ویژگی های بافتی و ساختاری بود.

روش کار

گردآوری داده ها

برهم کنش بین miRNA ها و ترانسکرپت ژنهای مختلف از منابع (۱۱-۱۳) جمع آوری شدند. سپس داده های حاصل از روش های با دقت پایین، فاقد جایگاه مشخص و فاقد ساختار تشریح شده، حذف گردیدند. در ادامه برهم کنش دقیق ارائه شده از مقالات منبع استخراج شد و تمامی توالی های مرجع 3'UTR ژنوم انسان نسخه hg19 و ژنوم موش نسخه mm10 از پایگاه Ensembl (۱۴،۱۵) دریافت شد.

محاسبات و مدل سازی

محاسبه توزیع احتمال نوکلئوتیدها و همچنین برآورد پارامترهای مدل مارکو (MCM) برای تولید مدل پس زمینه، بر اساس تمامی توالی های مرجع ناحیه 3'UTR ژنوم انسان و موش صورت گرفت. بررسی میزان بیش نمایش جایگاه های هدف به کمک روش SPAT (۱۶) و آماره گاوس از طریق محاسبه تعداد و واریانس مشاهدات مورد انتظار و در نهایت استنتاج سطح معنی داری جایگاه انجام پذیرفت. جستجوی موتیف های AREs نیز بر اساس روش (۱۷) و مبتنی بر الگوی ارائه شده توسط (۱۸) انجام شد. تمامی برنامه های مورد نیاز تحت زبان پرل نگارش شدند و محاسبات آماری به کمک برنامه MedCalc نسخه ۱۲،۷ (۱۹) و R نسخه ۳،۰،۲ (۲۰) انجام شد. آزمونهای مقایسه میانگین بر اساس روش t-test و χ^2 و مقایسه واریانس بر اساس آزمون F-test صورت گرفت.

نتایج

پس از بررسی برهم کنش های جمع آوری شده از میان ۵۰۰۰۰ رکورد اولیه در نهایت ۳۳۹ رکورد گزینش و برای انجام مطالعه از منابع علمی استخراج شدند. تمامی این رکوردها با روشهای آزمایشگاهی معتبر مانند وسترن بلاتینگ و سنجش گزارشگر مورد تایید قرار گرفته بودند. نتایج حاصله به قرار زیر می باشد.

ویژگی های مرتبط با توالی های 3'UTR

در این مطالعه میانگین طول توالی های 3'UTR حاوی جایگاه

هدف، به طور معنی داری ($P < 0.01$) بزرگتر از میانگین طول توالی های 3'UTR ژنهای کد کننده بود (۲۴۷۱ باز در مقابل ۱۳۷۷). با تقسیم بندی هر توالی 3'UTR به ۵ قسمت از سمت کدون خاتمه، مشخص شد که ۳۰ درصد جایگاه های فعال در یک پنجم ابتدایی توالی 3'UTR واقع شده اند. همچنین ۹۳ درصد نمونه ها به طور معنی داری ($P < 0.05$) نسبت به توالی 3'UTR بیش نمایش نشان می دهند. در این مطالعه ۸/۳ درصد توالی های 3'UTR حاوی عناصر AREs بودند که ۷۵ درصد این نواحی از نوع ۲ بود. میانگین محتوای آدنین- اوراسیل (AU) توالی های 3'UTR جایگاه هدف کارکردی به طور معنی داری با میانگین ژنوم متفاوت است ($P < 0.01$). همچنین بخش فرادست جایگاه دارای محتوای AU کمتری نسبت به بخش فرودست است (۵۵ درصد نسبت به ۶۱ درصد) ($P < 0.01$). این قضیه برای ۵۰ و ۱۰۰ باز بخش فرادست و فرودست نیز به همین شکل است اما برای ۲۵ باز اطراف جایگاه اختلاف معنی داری بین بخش فرادست و فرودست و همچنین با میانگین ژنوم مشاهده نشد ($P < 0.01$).

پیوستگی نواحی مکمل در ساختار داپلکس

با توجه به اهمیت پیوستگی نواحی مکمل در برهم کنش بین miRNA-mRNA (۷, ۲۱-۲۳) تصمیم به ایجاد یک شاخص جدید تحت عنوان بزرگترین قطعه پیوسته (MCF) برای اندازه گیری بلندترین ناحیه دارای بازهای جور، ناهمگور و دارای فاصله یا گپ نمودیم. MCF بازهای مکمل در ۱/۲ درصد نمونه ها ۴ تا ۵ نوکلئوتید بود و در ۹۴ درصد موارد طولی بین ۶ تا ۱۰ نوکلئوتید و در یک سوم طول ۸ نوکلئوتیدی داشت. شاخص MCF برای جفت بازهای ناجور نشان دهنده وجود ساختار حلقه و MCF گپ نشان دهنده ساختار برآمدگی در داپلکس می باشد. میانگین اندازه بزرگترین حلقه موجود در بخش خارج از سید برابر ۲/۴۱ و میانگین اندازه برآمدگی در جایگاه هدف و miRNA به ترتیب ۰/۳۹ و ۰/۶۴ بود که اختلاف معنی داری می باشد ($P < 0.01$). در مواردی که برآمدگی وجود دارد بزرگترین طول آن در اکثر موارد ۲ نوکلئوتید می باشد. همچنین در برخی موارد، گپ ها در فاصله بین سید و ناحیه خارج از آن توسعه پیدا می کنند.

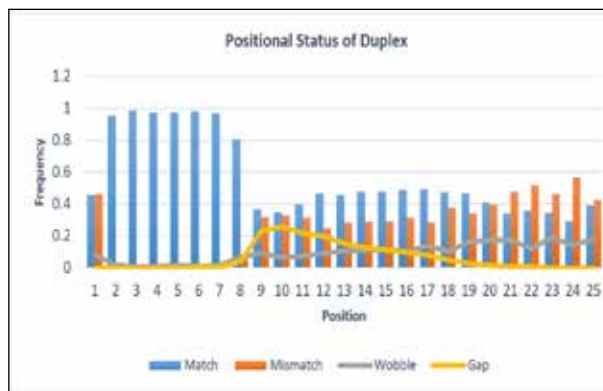
ویژگی های موقعیتی داپلکس miRNA-mRNA

علاوه بر موقعیت ۲ تا ۷ داپلکس، موقعیت ۸ نیز در ۸۰ درصد نمونه ها در وضعیت جور قرار داشت (شکل ۱). در جایگاه تا

باشد و احتمالاً ساز و کار ویژه ای در شکل گیری آنها دخالت دارد. ثابت شده که نواحی غنی از آدنین- اوراسیل (AREs) روی پایداری ترانسکرپت و یا میزان ترجمه آن موثر است (۲۷,۲۸). همچنین وجود تعاملاتی بین miRNA و این عناصر ثابت شده است (۲۹). می توان نتیجه گرفت که احتمالاً این عناصر در عملکرد شناسایی و یا اثرگذاری جایگاه هدف نقش دارند خصوصاً که اکثر عناصر شناسایی شده در این مطالعه از نوع ۲ بوده اند که اثر آنها در ناپایدار سازی ترانسکرپت ها بیشتر است (۳۰).

عدم تفاوت معنی دار ترکیب ۲۵ نوکلئوتید اطراف جایگاه نشان می دهد که احتمالاً عواملی در توالی های جانبی دور در شناسایی و فعال بودن جایگاه های هدف نقش دارد. گریمسون و همکاران (۹) نشان دادند این نواحی غنی از AU بلافاصله در اطراف جایگاه ها قرار گرفته اند و با فاصله گرفتن از جایگاه ها به سرعت محو می شوند. اما به این نکته توجه نکرده بودند که این نواحی در فاصله خاصی از جایگاه افزایش و در فواصل دورتر و نزدیکتر از آن کاهش می یابد. اهمیت وجود یک باز آدنوزین در نقطه ۱ و یا یک باز آدنوزین و یا اوراسیل در موقعیت ۹ جایگاه هدف قبلاً تایید شده است (۷,۳۱) ولی وجود برآمدگی در موقعیت ۹ تا ۱۲ داپلکس می تواند به عنوان یک مکانیسم ویژه در شناسایی یا میزان تاثیر گذاری جایگاه عمل کند.

ساختار مشابهی قبلاً در موقعیت ۵ تا ۶ شناسایی شده است (۳۲). همچنین جفت بازهای جور در جایگاه ۱۲ تا ۱۹ نقش ناحیه تکمیلی (۲) را در انتهای 3' miRNA ایفا می کند و باعث افزایش پایداری داپلکس خواهند شد. پایین بودن میزان جور بودن بازها در موقعیت ۱ به علت ساختاری بنام GU Wobble یا وابل، در این موقعیت می باشد. در این ساختار دو نوکلئوتید اوراسیل و گوانین با هم جفت می شوند. در ۸ درصد موارد وضعیت جایگاه ۱ از همین نوع می باشد. وجود این ساختار در این موقعیت می تواند یک سازوکار دیگر برای شناسایی جایگاه و یا میزان تأثیر گذاری آن باشد. باز گوانین مورد نیاز برای تشکیل وابل غالباً از طریق رشته هدف تامین می گردد. به همین دلیل در موقعیت یک رشته هدف حدود دو برابر رشته miRNA باز گوانین دیده می شود. پیوندهای حاصل از گوانین- اوراسیل نسبت به جفتهای واتسن- کریک، سست تر می باشند (۳۳,۳۴) اما با این وجود انعطاف پذیری بیشتری دارند (۳۵) و در شکل گیری ساختارهای



شکل ۱: وضعیت نوکلئوتیدهای داپلکس mRNA: miRNA در موقعیت های مختلف نسبت به انتهای 5' miRNA

۱۲ افزایش شدید و ناگهانی در تعداد نمونه هایی که داری برآمدگی می باشند مشاهده می گردد و با فاصله گرفتن از آن به سرعت کاهش می یابد. تعداد بازهای جور بعد از نوکلئوتید ۸ کاهش می یابد ولی بین نوکلئوتیدهای ۱۲ تا ۱۹ تا بیش از ۴۰ درصد افزایش نشان می دهد. در جایگاه شماره ۲ نیز باز اوراسیل در رشته هدف غالب است (۴۰ درصد). همچنین در جایگاه شماره ۹ در رشته miRNA در ۴۲ درصد موارد باز اوراسیل و در رشته هدف در ۳۵ درصد موارد باز آدنین دیده می شود. یک همبستگی منفی قوی بین تعداد برآمدگی و موقعیت جایگاه در خارج از سید نیز مشاهده شد (ضریب همبستگی پیرسون برابر ۰/۹۶-). باز اوراسیل در ۶۳ درصد نمونه ها جایگاه شماره ۱ را در رشته miRNA تشکیل می دهد. در رشته هدف نیز باز آدنوزین در ۵۵ درصد نمونه ها باز شماره ۱ را تشکیل می دهد. این در حالی است که تنها در ۴۵ درصد موارد نوکلئوتیدهای این جایگاه با همدیگر جور می باشند.

بحث

تصور می شود که طول 3'UTR به عنوان مهمترین جایگاه هدف miRNA ها، فاکتور اصلی در تکامل همزمان miRNA - Target باشد (۲۴) و 3'UTR ژنهای تخصص یافته تر مانند ژنهای اختصاصی بافت مغز، طول بیشتری نسبت به دیگر ژنها دارند (۲۵). همین مسئله، بلندتر بودن توالی های مذکور که حاوی جایگاه هدف miRNA ها می باشند را توجیح می کند. تراکم جایگاه های هدف در یک پنجم ابتدایی این توالی ها نیز قبلاً گزارش شده است (۹,۲۶). بیش نمایش جایگاه ها نشان می دهد که ساختار آنها متفاوت از ساختار دیگر بخش های 3'UTR می

مرتبه بالاتر RNA می تواند حائز اهمیت باشد.

نتیجه گیری

با وجود پیچیدگی های زیادی که در زمینه شناخت مکانیسم انتخاب هدف miRNA ها وجود دارد، الگوها و قواعدی مشخصی نیز قابل شناسایی هستند که در فهم نحوه عمل آنها می توانند مفید واقع شوند. بسیاری از این ویژگی ها توسط محققین مورد

آزمون قرار گرفته و تأیید شده اند و بسیاری دیگر همچون برخی مواردی که در این مطالعه گزارش شد قابل آزمون و بررسی می باشند. این ویژگی ها می تواند به عنوان معیارهایی در زمینه پیش بین جایگاه ها هدف miRNA ها نیز به کار برده شود و دیدگاه مناسبی برای چگونگی انتخاب ویژگی های محاسباتی فراهم می آورند.

References / منابع

- Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116(2): 281-97.
- Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 2009; 136(2): 215-33.
- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- Somel M, Guo S, Fu N, et al. MicroRNA, mRNA, and protein expression link development and aging in human and macaque brain. *Genome Research* 2010; 20(9): 1207-18.
- Kloosterman WP, Wienholds E, Ketting RF, Plasterk RH. Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo. *Nucleic Acids Research* 2004; 32(21): 6284-91.
- Somel M, Liu X, Tang L, et al. MicroRNA-driven developmental remodeling in the brain distinguishes humans from other primates. *Public Library of Science Biology* 2011; 9(12): e1001214.
- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005; 120(1): 15-20.
- Didiano D, Hobert O. Perfect seed pairing is not a generally reliable predictor for miRNA-target interactions. *Nature Structural & Molecular Biology* 2006; 13(9): 849-51.
- Grimson A, Farh KK-H, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Molecular Cell* 2007; 27(1): 91-105.
- Baek D, Villén J, Shin C, Camargo FD, Gygi SP, Bartel DP. The impact of microRNAs on protein output. *Nature* 2008; 455(7209): 64-71.
- Hsu SD, Tseng YT, Shrestha S, et al. miRTarBase update 2014: an information resource for experimentally validated miRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research* 2014; 42(D1): D78-D85.
- Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic Acids Research* 2009; 37(suppl 1): D105-D110.
- Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, et al. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic Acids Research* 2012; 40(D1): D222-D9.
- Birney E, Andrews TD, Bevan P, et al. An overview of Ensembl. *Genome Research* 2004; 14(5): 925-8.
- Flicek P, Ahmed I, Amode MR, et al. Ensembl 2013. *Nucleic Acids Research* 2012; (Database issue): 48-55.
- Nuel G. Significance score of motifs in biological sequences. *Bioinformatics: Trends and Methodologies Intech* 2011; 978-53.
- Gruber AR, Fallmann J, Kratochvill F, Kovarik P, Hofacker IL. AREsite: a database for the comprehensive investigation of AU-rich elements. *Nucleic Acids Research* 2011; 39 (Database issue): D66-D9.
- Bakheet T, Williams BR, Khabar KS. ARED 3.0: the large and diverse AU-rich transcriptome. *Nucleic Acids Re-*

- search 2006; 34(suppl 1): D111-D4.
19. Schoonjans F, Zalata A, Depuydt C, Comhaire F. MedCalc: a new computer program for medical statistics. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 1995; 48(3): 257-62.
 20. R Core Team. A language and environment for statistical computing. 2013.
 21. Lewis BP, Shih I-h, Jones-Rhoades MW, Bartel DP, Burge CB. Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell* 2003; 115(7): 787-98.
 22. Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *Public Library of Science Biology* 2005; 3(3): e85.
 23. Krek A, Grün D, Poy MN, et al. Combinatorial microRNA target predictions. *Nature Genetics* 2005; 37(5): 495-500.
 24. Berezikov E. Evolution of microRNA diversity and regulation in animals. *Nature Reviews Genetics* 2011; 12(12): 846-60.
 25. Meunier J, Lemoine F, Soumillon M, et al. Birth and expression evolution of mammalian microRNA genes. *Genome Research* 2013; 23(1): 34-45.
 26. Schmidt T, Mewes H-W, Stümpflen V. A novel putative miRNA target enhancer signal. *Public Library of Science One* 2009; 4(7): e6473.
 27. Keene JD. Why is Hu where? Shuttling of early-response-gene messenger RNA subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1999; 96(1): 5-7.
 28. Blackshear P. Tristetraprolin and other CCCH tandem zinc-finger proteins in the regulation of mRNA turnover. *Biochemical Society Transactions* 2002; 30(Pt 6): 945-52.
 29. Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 2007; 318(5858): 1931-4.
 30. Frevel MA, Bakheet T, Silva AM, Hissong JG, Khabar KS, Williams BR. p38 Mitogen-activated protein kinase-dependent and-independent signaling of mRNA stability of AU-rich element-containing transcripts. *Molecular And Cellular Biology* 2003; 23(2): 425-36.
 31. Wang X, El Naqa IM. Prediction of both conserved and nonconserved microRNA targets in animals. *Bioinformatics* 2008; 24(3): 325-32.
 32. Chi SW, Hannon GJ, Darnell RB. An alternative mode of microRNA target recognition. *Nature Structural & Molecular Biology* 2012; 19(3): 321-7.
 33. Jaeger JA, Turner DH, Zuker M. Improved predictions of secondary structures for RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 1989; 86(20): 7706-10.
 34. Mathews DH, Sabina J, Zuker M, Turner DH. Expanded sequence dependence of thermodynamic parameters improves prediction of RNA secondary structure. *Journal Of Molecular Biology* 1999; 288(5): 911-40.
 35. Ramos A, Varani G. Structure of the acceptor stem of Escherichia coli tRNA Ala: role of the G3• U70 base pair in synthetase recognition. *Nucleic Acids Research* 1997; 25(11): 2083-90.