ایجاد جایگاه هدف miR-1 وmiR-206 در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گوسفندان نژاد دالاق به روش *in silico* در جهت سرکوب ژن میوستاتین

سعیده سلیمانی[۱]، علی جوادمنش[۲*]. محمدهادی سخاوتی[۳]

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۲. استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

۳. استادیار ژنتیک و اصلاح نژاد دام، گروه علوم دامی دانشگاه فردوسی مشهد

ایمیل نویسنده مسئول: ali_javadmanesh@yahoo.com

چکیده

ریز RNA ها گروهی از RNA های غیرکد کننده هستند که از نظر تکاملی محافظت شده هستند و بیان ژن های هدف را در سطح پس از رونویسی تنظیم می کنند. ریز RNA ها براساس توالی هدف، ژن مورد نظر خود را شناسایی می‌کنند و با اتصال به آن باعث کاهش بیان ژن مورد نظر و یا باعث تجزیه mRNA ژن هدف می‌شوند. توالی هدف برای ریز RNA ناحیه سید نامیده می‌شود که این توالی حدود ۸ نوکلئوتید، ۷ و یا ٦ نوکلئوتید می‌باشد. در این مطالعه از جهش طبیعی گوسفند تکسل (g+6723G>A) که سبب ایجاد جایگاه هدف برای miR-1 وmiR-206 و در نتیجه سبب مهار عملکرد پروتئین میوستاتین و در نهایت تولید عضله مضاعف شده است، الگوبرداری شده و همچنین به منظور اطمینان از عملکرد تنظیمی miR-1 و miR-206 جهش دیگری در جهت ایجاد توالی هدف برای این دو ریز RNA در ابتدای 3' UTR ژن میوستاتین ایجاد شد و اثرات حاصل از این دو جهش به روش بیوانفورماتیکی بررسی شد. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که جهش g+6723G>A در 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند تکسل به علت اثر بزرگی که بر روی فنوتیپ عضله مضاعف دارد و همچنین عدم ایجاد اثرات مضر شناخته شده، می‌تواند به عنوان بهترین ژن برای دستکاری ژنتیکی و ایجاد فنوتیپ عضلانی گوسفند استفاده کرد.

کلید واژه: جهش- جایگاه هدف-miR-1 و miR-206- 3' UTR- ژن میوستاتین

مقدمه

ریز RNA ها گروه بزرگی از RNA کوچک ۲۱-۲۳ نوکلئوتیدی هستند که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند این مولکول‌ها در طی تکامل حفظ شده‌اند و تنظیم بیان ژن را در مرحله بعد از رونویسی به عهده دارند (٦). تنظیم بیان ژن در اثر اتصال میکرواران ای به mRNA هدف انجام می‌شود و در نتیجه منجر به تجزیه کامل mRNA هدف (در صورتی که miRNA و mRNA هدف کاملا با هم جفت شوند ۱۰۰٪ مکمل هم باشند) که این حالت معمولا در جانوران رخ نمی‌دهد، کاهش میزان ترجمه mRNA هدف (در صورتیکه به طور ناقص با هم جفت شوند) ، توقف ترجمه mRNA هدف (در حالتی که فقط در ناحیه سید این دو با هم جفت شوند) (٤). ریز RNA های براساس توالی هدف، ژن مورد نظر خود را شناسایی می‌کنند و آن را مورد هدف قرار می‌دهند و باعث کاهش بیان ژن مورد نظر و یا باعث تجزیه آن می‌شوند. توالی هدف برای ریز RNA ناحیه سید[1] نامیده می‌شود، توالی سید از نوکلئوتید ۲ تا ۸ در انتهای 5'miRNA می باشد، جفت شدن این ناحیه با mRNAهدف از لحاظ شناسایی mRNA هدف توسط ریز RNA و همچنین عملکرد آن بسیار مهم می باشد ثابت شده-است که جایگاه هدف ریز RNA ها معمولا در ناحیه 3' UTR از mRNA قرار دارد (۷). ثابت شده‌است که ریز RNA ها انواع مختلف فرایندهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، متابولیسم، و مرگ سلولی را تنظیم می کنند (۳). برای مثال ثابت شده‌است ریز RNA های miR-1 وmiR-206 در رشد و تمایز سلولهای ماهیچه نقش دارند. در برخی از گونه های حیوانی مانند گوسفند نژاد تکسل به اثبات رسیده است که در آن جهش در 3' UTR ژن میوستاتین و جایگزین شدن A به جای G سبب ایجاد جایگاهی برای miR-1 وmiR-206 شده و لذا سبب مهار رونویسی پروتئین میوستاتین می شود و در نتیجه رشد اضافی ماهیچه را به دنبال دارد(کالوپ و همکاران، ۲۰۰٦). هدف از این تحقیق ایجاد جهش مناسب با استفاده از روش *in silico* برای ایجاد جایگاه هدف miR-1 و miR-206 در 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند دالاق جهت افزایش عضله می-باشد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ابتدا با استفاده از نرم‌افزار CLC Main Workbench 5.5 توالی 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق با 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند تکسل (Oar_v3.1:CM001583.1) مقایسه شد به منظور بررسی وجود توالی‌های هدف ریز RNA های miR-1 و miR-206 و همچنین بررسی وجود جهشی که در گوسفند تکسل(G به A) g+6723G>A اتفاق افتاده است، در 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند دالاق. سپس توالی 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق با استفاده از نرم افزار، motif finder (http://www.genome.jp/tools/motif/motif) از لحاظ وجود موتیف‌ها بررسی شد (موتیف‌ها توالی کوتاهی از DNA یا پروتئین می‌باشند که منجر به عملکرد بیولوژیکی می‌شوند و نقش تنظیمی مهمی در ژن ایفا می‌کنند). همچنین در این مرحله با استفاده از نرم‌افزار تارگت اسکن، (http://www.targetscan.org) جایگاه هدف ریز RNA های موجود در 3' UTR ژن میوستاتین بررسی شد. از آنجاییکه در تارگت اسکن[2] توالی هدف 3' UTR ژن میوستاتین گونه گاو وجود دارد، اما توالی هدف مربوط به ژن میوستاتین گونه گوسفند وجود ندارد بنابراین برای پیش بینی توالی‌های هدف ریز RNA در گونه گوسفند از این نرم‌افزار استفاده شد و توالی‌های هدف مربوط به گونه گاو و گوسفند با

1- seed
2- Target scan

هم مقایسه شد. با استفاده از نرم افزار CLC Main Workbench 5.5 در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق به منظور ایجاد توالی هدف miR-1 وmiR-206 به روش *in silico* تغییر اعمال شد. در نهایت پس از اعمال تغییر در این ناحیه، این ناحیه مجددا با نرم‌افزار motif finder و تارگت اسکن بررسی شد به منظور مشخص شدن اثر این تغییر در موتیف‌ها و توالی هدف ریز RNA ها این ناحیه.

نتایج و بحث

پس از مقایسه توالی 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند دالاق با توالی 3' UTR ژن میوستاتین نژاد تکسل مشخص شد که توالی این ناحیه در این نژادها دارای شباهت بالایی هستند و تنها تفاوت آنها در جهشی که به صورت طبیعی در گوسفند تکسل اتفاق افتاده است که باز گوانین به آدنین تبدیل شده است، در حالی که در 3' UTR ژن میوستاتین گوسفندان بومی این الل به صورت طبیعی یعنی گوانین وجود دارد. از آنجائیکه این جهش طبیعی سبب ایجاد توالی هدف برای miR-1 و miR-206 شده است، می‌توان نتیجه گرفت 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند نژاد دالاق فاقد توالی‌های هدف ریز RNA های miR-1 و miR-206 هستند که نتایج حاصل از این تحقیق با نتایج میار و همکاران (۱۳۹۰) که روی نژادهای زل، شال و زندی کار شده‌است مطابقت دارد و همچنین با نتایج روحی و همکاران (۱۳۹۱) که روی نژاد بلوچی کار کرده‌اند. نتایج حاصل از این تحقیقات نشان داد که جهش تک نوکلئوتیدی عامل کنترل ماهیچه مضاعف در جمعیت گوسفندان این نژادها رخ نداده است. بررسی موتیف‌ها نشان داد در این توالی هیچ موتیفی که در پستانداران نقش تنظیمی داشته باشد، وجود ندارد و نتایج حاصل از بررسی جایگاه هدف ریز RNA ها توسط تارگت اسکن مشخص کرد در ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گونه‌ی گاو جایگاه هدف برای شماری از ریز RNA ها است سپس براساس اسکور توالی هدف و حفظ شدگی آنها گزینش انجام گرفت مشخص شد جایگاه هدف ریز RNA های اشاره شده در جدول (۱) دارای اسکور بالاتر است و همچنین این توالی‌های هدف در صورت ۸ میر (8mer) بودن دارای اسکور و حفظ شدگی بالاتری می‌باشد. که با مقایسه‌ی ناحیه 3' UTR ژن میوستاتین گونه‌ی گوسفند مشخص شد که این جایگاه هدف ریز RNA ها در گونه‌ی گوسفند نیز وجود دارد

ریز RNA	توالی هدف ریز RNA	اسکور ارائه شده توسط نرم‌افزار(٪)
miR-27b	ACUGUGAA	۹۸
miR-29d	UGGUGCUA	۹۸
miR-23b	AAUGUGAA	۹۷

ریز RNA ها بیان ژن‌ها پس از رونویسی از طریق تجزیه mRNA هدف و یا مهار ترجمه تنظیم می‌کنند و از تولید پروتئین ممانعت به عمل می‌آورند. اتصال بین ریز RNA و mRNA هدف در جانوران در بیشتر موارد به 3' UTR مولکول mRNA هدف محدود می‌شود. پژوهش‌ها نشان می‌دهند که نوکلئوتیدهای ۲ تا ۸ از انتهای '5 مولکول ریز RNA در ناحیه سید (seed) با mRNA هدف مکمل می‌شوند باعث توقف ترجمه mRNA هدف می‌شود (٤). در گوسفند تکسل تبدیل گوانین

به آدنین باعث ایجاد جایگاه هدف miR-1 و miR-206 شده است (۵). در این تحقیق از جهش گوسفند تکسل برای بررسی ایجاد جهش در 3' UTR ژن میوستاتین جهت افزایش عضله در این نژاد بومی استفاده شد و با استفاده از نرم افزار CLC این جهش ایجاد شد و جایگاه هدف miR-1 و miR-206 در 3' UTR ژن میوستاتین جهت غیر فعال کردن این ژن در این نژاد بومی به وجود آمد و همچنین به منظور اطمینان از عملکرد این ریز RNA ها جایگاه هدف دیگری نیز ایجاد شد که در ابتدای 3' UTR ژن میوستاتین گوسفند اشاره شده است. پس از اعمال این تغییرات امکان به وجود آمدن تغییرات دیگر در اثر ایجاد این جهش با استفاده از نرم افزار motif finder مورد بررسی قرار گرفت. این نرم افزار نشان داد، ایجاد جهش مورد نظر در هیچ موتیفی که در پستانداران نقش تنظیمی داشته باشد یافت نشد. همچنین مشخص شد توالی هدف هیچ ریز RNA دیگری را تحت تاثیر قرار نداد است. در نهایت هیچ تغییری جز این جهش ایجاد نشد که مطابقت دارد با نتایج کالوپ و همکاران (۲۰۰۶) که در آن تحقیق نشان داده شده است که جهش g+6723G>A تنها باعث ایجاد جایگاه هدف برای miR-1 و miR-206 که باعث ایجاد فنوتیپ عضله مضاعف شده است و تغییر دیگری در نژاد تکسل ایجاد نشده است. لذا می توان در آینده با استفاده از روش های مهندسی ژنتیک از این جهش برای ایجاد فنوتیپ عضلانی گوسفند استفاده کرد.

نتیجه‌گیری کلی

در گوسفند تکسل جهش g+6723G>A به صورت طبیعی ایجاد شده است که باعث ایجاد جایگاه هدف miR-1 و miR-206 شده است در این مطالعه این جهش به عنوان الگوی ژنتیکی قرار گرفت و ایجاد این جهش به روش بیوانفورماتیکی بررسی شد. نتایج بررسی‌ها مشخص کرد که با ایجاد جایگاه هدف miR-1 و miR-206 در 3' UTR ژن میوستاتین این نژاد اثر دیگری در این نژاد غیر از فنوتیپ عضله مضاعف نخواهد داشت. با توجه به تنوع ژنتیکی بالای میوستاتین در نواحی غیر کد کننده می‌توان نتیجه گرفت که ژن میوستاتین به عنوان ژن کاندیدا برای کارهای اصلاح نژادی درگوسفند مفید است.

منابع

۱. میار، ی.، صالحی، ع.ر.، آل یاسین، ا. و رئوف زاده، س.، ۱۳۹۰. بررسی چندشکلی ژن میوستاتین در سه نژاد گوسفند ایرانی شال، زل و زندی. مجله تولیدات دامی. شماره۱، صفحات ۳۳-۴۰.

۲. روحی، م.، رحیمی، ق.، انصاری، ز.، ۱۳۹۱. مقاله عدم وقوع جهش تک نوکلئوتیدی g+6723G>A در بخش ناظم 3' UTR ژن میوستاتین در گوسفند بلوچی. دوازدهمین کنگره ژنتیک ایران، ساری.

3- Bartel,D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory Functions. Cell, 136: 215 233.

4- Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action . 2009. Nat Rev Mol Cell Biol. 10(2):141-8.

5- Clop, A., Marcq, F., Takeda, H., Pirottin, D., Tordoir, X., Bibe, B., Bouix, J., Caiment, F., Elsen, J. M., Eychenne, F., Larzul, C., Laville, E., Meish, F., Milenkovic, D., Tobin, J., and Charlier, C.M. 2006. A mutation creating a potential illegitimate microRNA target site in the myostatin gene affects muscularity in sheep. Nature Genetics, 38: 813-818.

6- De Souza, E. B .; S.T. Cload.; P. Shannon. Pendergrast.; and D. W. Y. Sah. 2008. Novel Therapeutic Modalities to Address Nondrugable Protein Interaction Targets. Neuropsychopharmacology , 34:142–158.

7- Rajewsky N. microRNA target predictions in animals. 2006. Nat Genet. Jun;38 Suppl:S8-13. Review.

Insertion of miR-1/miR-206 target site in the 3 'UTR region of myostatin gene in Dalagh sheep breed by *in silico* methods to suppress the myostatin expression

Abstract

MiRNAs are non-coding RNA that are conserved evolutionarily and regulate expression of target genes in of post-transcriptional level. MiRNAs are identifying genes based on their target sequence, and by connect it to cause decreased expression of the target gene or degraded target gene mRNA. MiRNA target sequence known as area seed that is nucleotide sequences with 8, 7 or 6 nucleotides. In this study, a natural mutant Texel sheep (g + 6723G> A) that cause target site for miR-1 and miR-206 and thus in result cause inhibits the function of the protein myostatin and eventually produce muscle double, modeled and in order to ensure of miR-1 and miR-206 regulate function, another mutations to create a target sequence was created for the two miRNA at the beginning of the 3 'UTR of myostatin gene, and the effects of these mutations was studied using bioinformatic. The results of this study showed that mutations g + 6723G> A in the 3 'UTR Texel sheep myostatin gene, due to large effect that has on the phenotype double muscle and also the absence of other changes, could be considered as the best marker for genetic testing double muscle. This mutations can be used to create sheep muscle phenotype in the future by using of genetic engineering techniques.

Keywords: mutations- target sequence- miR-1 و miR-206– 3' UTR- myostatin gene