

پیش بینی بیوانفورماتیکی microRNAهای جدید کد شده توسط ژن N-Ras

مائه سلمانی^۱، مریم حسنلو^{۲*}

۱-دانشجو، رشته زیست شناسی سلولی و مولکولی، گروه زیست شناسی، پردیس فرزنانگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران
۲- استادیار رشته ژنتیک، گروه زیست شناسی، پردیس فرزنانگان، دانشگاه سمنان، سمنان، ایران

*صندوق پستی ۳۴۸۵۱-۳۷۱۹۵، سمنان، ایران
m.hassanlou@semnan.ac.ir*

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۱۰

دریافت: ۱۴۰۰/۰۷/۰۶

چکیده

مسیر پیامدهی Ras یک مسیر سیگنالدهی درون سلولی مهم است که تنظیم کننده اصلی جنبه های مختلف رشد طبیعی سلول و تبدیل به بدخیمی می باشد. خانواده ژن RAS از سه پروتئین G تشکیل شده است: H-Ras، N-Ras و K-Ras که نقش مهمی در پیامدهی سلولی جهت رشد، تکثیر و مهاجرت دارند. جهش در انکوژن Ras باعث ایجاد خواص بدخیمی می شود که برای رشد و گسترش سرطان مورد نیاز است. MicroRNAهایی (miRNA) که در ژنهای Ras کدگذاری می شوند نیز ممکن است در ایجاد سرطان نقش داشته باشند. در این پژوهش، microRNAهای جدید واقع در ژن N-Ras از نظر بیوانفورماتیکی پیش بینی شدند. از برنامه SSCProfiler برای پیش بینی ساختارهای حلقه-ساقه در ناحیه ژنومی مورد نظر استفاده شد. پایگاه داده ای UCSC برای بررسی وضعیت حفاظت شدگی miRNA فرضی و توالی پیش ساز آن استفاده شد. علاوه بر این، پیش بینی N-Ras-miRs با استفاده از ابزار آنالین MatureBayes نیز انجام شد. علاوه بر این، نرم افزار آنالین RNAFOLD که از الگوریتم پیش بینی ساختار حداقل انرژی آزاد (MFE) برای RNA استفاده می کند، برای پیش بینی تقریبی ساختار حلقه ساقه استفاده شد. نتایج نشان داد که N-Ras با طول حدود ۵ کیلوباز دارای ساختارهای شبیه حلقه ساقه miRNAیی است که توالی نسبتاً حفاظت شده ای دارد. به طور کلی، شواهد کلی حاکی از وجود miRNAهای جدیدی است که در انکوژن N-Ras کدگذاری می شوند.

کلید واژگان: مسیر پیامدهی Ras، microRNA، N-Ras

۱- مقدمه

Ras، خانواده‌ای از پروتئین‌های مرتبط است که متعلق به یک کلاس پروتئینی به نام GTPase کوچک می‌باشند و در انتقال سیگنال‌ها در داخل سلول نقش دارند [۱، ۲]. هنگامی که Ras توسط سیگنال‌های دریافتی فعال می‌شود، متعاقباً پروتئین‌های دیگر را فعال می‌کند، که در نهایت ژن‌های دخیل در رشد، تمایز و بقای سلول را فعال می‌کند. جهش در ژن‌های Ras می‌تواند منجر به تولید پروتئین‌های فعال شده دائمی Ras شود که حتی در غیاب سیگنال‌های دریافتی، باعث ایجاد سیگنالینگ ناخواسته و فعالیت بیش از حد در داخل سلول شود. از آنجا که این سیگنال‌ها منجر به رشد و تقسیم سلولی می‌شود، سیگنال دهی بیش از حد Ras می‌تواند در نهایت منجر به سرطان شود [۳]. سه ژن Ras در انسان (H-Ras، K-Ras و N-Ras) شایع‌ترین انکوژن‌ها در سرطان‌های انسانی هستند. جهش‌هایی که به‌طور دائم Ras را فعال می‌کنند، در ۲۰ تا ۲۵ درصد از تومورهای انسانی و تا ۹۰ درصد در انواع خاصی از سرطان‌ها از جمله سرطان روده یافت می‌شود [۴، ۵]. پروتئین N-Ras یکی از اعضای خانواده Ras می‌باشد که دارای فعالیت GTPase بوده و توسط یک فاکتور تبادل نوکلئوتیدی گوانین فعال می‌شود و توسط یک پروتئین فعال کننده GTPase غیر فعال می‌شود. جهش‌های این ژن با سرطان‌های مختلفی از جمله سرطان روده، سرطان فولیکولار تیروئید، سندرم نونان و لوسمی میلومونوسیتیک نوجوانان مرتبط می‌باشد [۶، ۷]. این ژن روی کروموزوم 1p13.2 قرار دارد و از 4978bp تشکیل شده است [۲].

MicroRNA (miRNA) ها مولکول‌های RNA غیر کد کننده‌ای هستند که به mRNA هدف متصل می‌شوند و با سرکوب فرایند ترجمه پروتئین یا تجزیه mRNA، بیان ژن را تنظیم می‌کنند. با استفاده از این مسیر، miRNA نقش مهمی در فرایندهای سلولی نظیر تکثیر سلول، تمایز یا مرگ سلولی ایفا می‌کنند [۸]. از miRNAها به‌عنوان

تنظیم کننده‌های اصلی (master) سلول یاد می‌شود [۹-۱۱].

از آنجایی که ژن N-Ras یکی از ژن‌های مهم در تنظیم تکثیر، تمایز و مرگ سلولی است، احتمالاً بخشی از فعالیت‌های این ژن، مربوط به miRNAهایی باشد که در درون آن قرار دارد. به همین دلیل در این پژوهش به پیش بینی وجود miRNAهای موجود در ژن N-Ras پرداخته شده است.

۲- روش‌ها

۲-۱ پیش‌بینی بیوانفورماتیکی وجود miRNA در ژن

N-Ras

برای پیش‌بینی وجود ساختارهای ساقه حلقه مشابه miRNA از سایت SSCprofler، به آدرس (<http://miRNA.imbb.forth.gr/SSCprofler.html>)

استفاده شد. این وب سایت احتمال وجود miRNAها را نشان می‌دهد. این برنامه بر اساس ویژگی‌هایی نظیر توالی، ساختار و میزان حفاظت شدگی توالی، یک ساختار سنجاق سری و حتی توالی miRNAی بالغ را پیشنهاد می‌دهد. جایگاه ژنومی ژن به‌صورت یک عدد از طریق سایت UCSC به دست می‌آید. هر بار توالی به طول ۱۰۰۰ جفت باز در دو رشته مثبت و منفی اسکن می‌شود و برای پوشش دادن به نواحی مرزی یکبار هم توالی‌ها از ابتدای عدد جایگاه ژن به اضافه عدد ۵۰۰ اسکن می‌شوند تا ساختارهای ثانویه نواحی مرزی هم مشخص شوند. مکان توالی پیش‌ساز miRNAی به دست آمده در نواحی اگزونی و اینترونی ژن به کمک سایت ensemble (<https://asia.ensembl.org/index.html>) به دست آمد.

۲-۲ پیش‌بینی ساختار ساقه حلقه miRNA

برای دستیابی به بهترین شکل فولد شده miRNAهای پیش‌بینی شده از لحاظ انرژی آزاد از سایت RNAfold استفاده شد (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). اگر حداقل انرژی

۳- نتایج

۳-۱ پیش‌بینی بیوانفورماتیکی وجود miRNA در ژن

N-Ras

با بررسی‌های انجام شده در سایت SSCprofler تعداد ۲ miRNA به ترتیب در ایترون ۲ و مرز بین اگزون ۲ و ایترون ۲ شناسایی شد (شکل ۱ الف) که توالی پیش‌ساز آن در جدول ۱ آمده است. از دیدگاه این نرم افزار در یک ساختار سنجاق سری سازنده miRNA باید تعداد برآمدگی‌ها کمتر از ۱۶ و تعداد لوپ‌ها کمتر از ۳۲ باشد و میانگین تعداد لوپ‌ها و برآمدگی‌ها کمتر از ۳۷ عدد باشد. همچنین، به کمک سایت maturebayes توالی miRNA می‌بالغ این miRNA ها پیش‌بینی شد (جدول ۱).

۳-۲ پیش‌بینی ساختار ساقه حلقه miRNA و بررسی

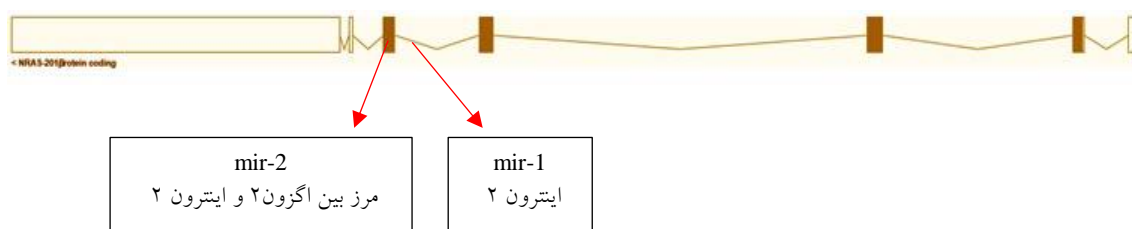
میزان حفاظت شدگی آن

به کمک وب سایت آنالیز RNAfold ساختار ساقه-حلقه (Stem-loop) های miRNA شناسایی شده پیش‌بینی شد (شکل ۱ ب). آنالیز توالی pre-miRNA به کمک وب سایت UCSC نشان داد که این توالی‌ها حفاظت شدگی را در میان ۱۷ گونه مختلف نشان می‌دهند (شکل ۱ ج).

جدول ۱ توالی miRNA بالغ و Pre-miRNA های به دست آمده

	توالی Pre-miRNA به دست آمده از سایت Sscprofler	توالی miRNA بالغ به دست آمده از سایت MatureByase
mir-1	TAGCCTCTGGCTGCAGTAGAGTTGTCATTTGAGTTACT GTGTTTTCTTAATCTTTTCCAGGAACACAGTGACCATATT TCTTTCTGCAGGCATATAGAATTT	miR-1-5P: GUAGAGUUGUCAUUUGAGUUAC miR-1-۳P: ACAGUGACCAUAAUUUCUUUUCU
mir-2	CAGAACCACCTTTGTAGATGAATATGATCCCACCATAGAG GTGAGGCCAGTGGTAGCCCGCTGACCTGATCCTGTCTC TCACTGTGCGGATCATCTTTACCCAT	miR-2-5P: UGAAUAUGAUCCACCAUAGAG miR-2-3P: CUGUCUCACUUGUCGGAUCA

(الف)



آزاد ساختار سنجاق سری کمتر از ۲۵/۴۴- کیلوکالری در مول باشد، ساختار از پایداری مناسبی برخوردار است.

۳-۲ بررسی میزان حفاظت شدگی miRNA

برای مشاهده میزان حفاظت شدگی miRNA، از سایت UCSC BLAT به آدرس (<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) استفاده شد. در این سایت نسخه‌های سال های ۲۰۰۳، ۲۰۰۴، ۲۰۰۶ و ۲۰۰۹ ژنوم انسان در دسترس است که برای تطابق با سایت SSCprofler از نسخه ۲۰۰۴ به عنوان داده ورودی استفاده شد.

۳-۲ پیش‌بینی توالی بالغ miRNA

برای به دست آوردن توالی بالغ miRNA ها از سایت maturebayes

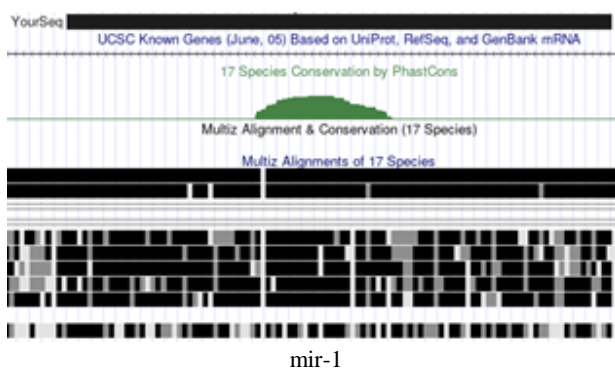
آدرس (<http://miRNA.imbb.forth.gr/MatureBayes.htm>)

۱ استفاده شد. در این سایت، با استفاده از یک طبقه‌بندی‌کننده آماری ساده و با در نظر گرفتن توالی و همچنین اطلاعات ساختاری پیش‌سازهای miRNA، می‌توان موقعیت شروع miRNA بالغ و/یا دابلکس miRNA:miRNA* را پیش‌بینی کرد.

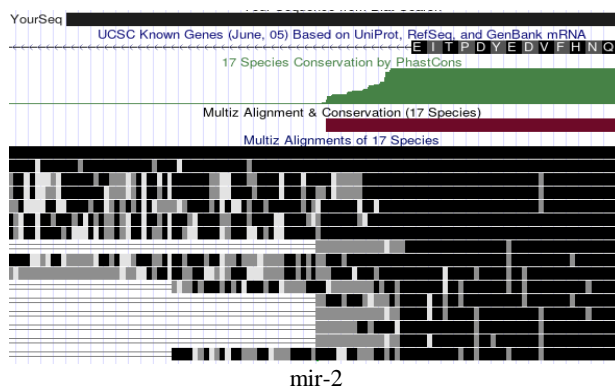
(ب)



(ج)



(ج)



شکل ۱ الف) mir-1 در اینترون ۲ قرار دارد در حالی که توالی mir-2 در مرز بین اگزون ۲ و اینترون ۲ قرار دارد. (ب) ساختار ساقه-حلقه miRNA شناسایی شده به کمک سایت RNAfold را نشان می‌دهد. (ج) میزان حفاظت شدگی pre-miRNAهای پیش‌بینی شده در ژن N-Ras به کمک سایت UCSC را نشان می‌دهد. همانطور که در شکل مشخص است بخش زیادی از توالی mir-2 miRNA pre- دارای حفاظت شدگی در میان ۱۷ گونه مختلف می‌باشد.

۴- بحث

در این پژوهش مشخص شد که دو توالی با ساختاری مشابه ساختار سنجاک سر miRNA در ژن N-Ras وجود دارد. تا کنون miRNAیی در ژن N-Ras گزارش نشده است [۱۲]. miRNAهای پیش‌بینی شده در ژن N-Ras حفاظت شده هستند که نشان دهنده اهمیت توالی آنها بوده و احتمال اینکه این توالی miRNA واقعی باشد به شدت افزایش می‌یابد. برای اثبات نهایی واقعی بودن این ساختارهای ساقه حلقه‌ی مشابه miRNA پیش‌بینی شده توسط روش‌های بیوانفورماتیکی، نیاز به انجام ارزیابی‌های تاییدی آزمایشگاهی می‌باشد.

تا کنون در مطالعات متعددی از روش‌های بیوانفورماتیکی به کار رفته در این مطالعه برای شناسایی وجود miRNAهای جدید استفاده شده است. از روش استفاده شده در این مطالعه برای شناسایی بیوانفورماتیکی miRNAهای نظیر *hsa-miR-6165* [۱۳]، *PIK3CA-miR1* [۱۴]، *TrkC-miR1* (۱۵) [۱۵] و غیره استفاده شده است که وجود آنها پس از پیش‌بینی به کمک روش‌های آزمایشگاهی تایید شده است. بنابراین، به نظر می‌رسد که روش‌های بیوانفورماتیکی به شناسایی miRNAهای جدید در ژنوم کمک شایانی کند.

مشخص شده است که miRNAهایی وجود دارند که بیان ژن N-Ras را کنترل می‌کنند. یکی از miRNAهایی که باعث فعال شدن انکوژن‌های خانواده ژن Ras می‌شود، *Let-7* می‌باشد [۱۶]. اعضای خانواده *let-7* در طول تمایز سلولی تنظیم می‌شوند [۱۷]. *Let-7* در سرکوب تومورزایی دخیل می‌باشد و می‌تواند به‌عنوان یک تنظیم‌کننده‌ی منفی ژن N-Ras عمل کند [۱۸]. *Let-7* تنها miRNA دخیل در تنظیم بیان N-Ras نیست [۱۹]. *hsa-miR-20a-5p* و *hsa-miR-98-5p* تعداد دیگری miRNA نیز بیان ژن N-Ras را تنظیم می‌کنند [۲۰].

منابع

- [1] Goodsell DS. The molecular perspective: the ras oncogene. *Oncologist*. 1999;4(3):263-4.
- [2] Broach JR. RAS genes in *Saccharomyces cerevisiae*: signal transduction in search of a pathway. *Trends Genet*. 1991;7(1):28-33.
- [3] Fernández-Medarde A, Santos E. Ras in cancer and developmental diseases. *Genes Cancer*. 2011;2(3):344-58.
- [4] Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nature reviews Cancer*. 2003;3(1):11-22.
- [5] Serebriiskii IG, Connelly C, Frampton G, Newberg J, Cooke M, Miller V, et al. Comprehensive characterization of RAS mutations in colon and rectal cancers in old and young patients. *Nat Commun*. 2019;10(1):3722.-
- [6] Chen K, Zhang Y, Qian L, Wang P. Emerging strategies to target RAS signaling in human cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*. 2021;14(1):116.
- [7] Bos JL, Toksoz D, Marshall CJ, Verlaan-de Vries M, Veeneman GH, van der Eb AJ, et al. Amino-acid substitutions at codon 13 of the N-ras oncogene in human acute myeloid leukaemia. *Nature*. 1985;315(6022):726-30.
- [8] López P, Girardi E, Pfeffer S. [Importance of cellular microRNAs in the regulation of viral infections]. *Med Sci (Paris)*. 2019;35(8-9):667-73.
- [9] Trionfini P, Benigni A. MicroRNAs as Master Regulators of Glomerular Function in Health and Disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. 2017;28(6):1686.
- [10] Mancikova V, Castelblanco E, Pineiro-Yanez E, Perales-Paton J, de Cubas AA, Inglada-Perez L, et al. MicroRNA deep-sequencing reveals master regulators of follicular and papillary thyroid tumors. *Modern Pathology*. 2015;28(6):748-57.
- [11] Sun W, Julie Li Y-S, Huang H-D, Shyy JYJ, Chien S. microRNA: A Master Regulator of Cellular Processes for Bioengineering Systems. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2010;12(1):1-27.
- [12] UCSC Genome Browser 200] • Available from:
- [13] Parsi S, Soltani BM, Hosseini E, Tousi SE, Mowla SJ. Experimental verification of a predicted intronic microRNA in human NGFR gene with a potential pro-apoptotic function. *PloS one*. 2012;7(4):e35561.
- [14] Saleh AJ, Soltani BM, Dokanehiifard S, Medlej A, Tavalaei M, Mowla SJ. Experimental verification of a predicted novel microRNA located in human PIK3CA gene with a potential oncogenic function in colorectal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2016;37(10):14089-101.
- [15] Dokanehiifard S, Soltani BM, Parsi S, Hosseini F, Javan M, Mowla SJ. Experimental verification of

for microRNAs in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2010;10(2):111-22.

[19] Masliah-Planchon J, Garinet S, Pasmant E. RAS-MAPK pathway epigenetic activation in cancer: miRNAs in action. *Oncotarget.* 2016;7(25):38892-907.

[20] Roncarati R, Lupini L, Shankaraiah RC, Negrini M. The Importance of microRNAs in RAS Oncogenic Activation in Human Cancer. 2019;9(988).

a conserved intronic microRNA located in the human TrkC gene with a cell type-dependent apoptotic function. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2015;72(13):2613-25.

[16] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, et al. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell.* 2005;120(5):635-47.

[17] Boyerinas B, Park SM, Hau A, Murmann AE, Peter ME. The role of let-7 in cell differentiation and cancer. *Endocr Relat Cancer.* 2010;17(1):F19-36.

[18] O'Connell RM, Rao DS, Chaudhuri AA, Baltimore D. Physiological and pathological roles

Bioinformatics prediction of new microRNAs encoded by the N-Ras gene

Maedeh Salmani¹ and Maryam Hassanlou^{2*}

1. Student of Cell and Molecular Biology, Biology group, Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran.
2. Assistant Professor of Genetics, Biology group, Farzanegan Campus, Semnan University, Semnan, Iran.

m.hassanlou@semnan.ac.ir

Receipt: 2021/09/28

Accepted: 2022/04/30

Abstract

Ras signaling is an important intracellular signaling pathway that is a key regulator of several aspects of normal cell growth and malignant transformation. The RAS gene family consists of three small G proteins; H-Ras, N-Ras, and K-Ras that play a central role in cell signaling for growth, proliferation, and migration. Mutation of the Ras oncogenes creates the malignant properties that are needed for cancer to grow and spread. MicroRNAs (miRNAs) that are encoded within the Ras genes might also have roles in cancer development. Here, novel microRNAs located in the human N-Ras gene were bioinformatically predicted. SSC profiler program was utilized to predict the stem-loop structures within the genomic area of interest. UCSC genome browser database was used to analyze the conservation status of the putative miRNA and its precursor sequence. Furthermore, the N-Ras-miRs prediction was also performed by using MatureBayes online tool. In addition, RNAFOLD online software, which applies the minimum-free energy (MFE) RNA structure prediction algorithm, was used for approximate prediction of the stem-loop structure. Our results demonstrate that N-Ras with about 5Kb length has some predicted miRNA stem-loop-like structures that have relatively conserved sequences. Overall, accumulative pieces of evidence indicated the presence of novel miRNAs encoded within the N-Ras oncogene.

Keywords: Ras signaling pathway, microRNA, N-Ras.