Arshive of SID

*Medical Journal*
*of*
*Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*

## 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.

© 2018 The Author(s). This is an Open Access article published by Tabriz University of Medical Sciences under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

www.SID.ir

Arshive of SID



مقاله پژوهشی

# مطالعه بیوانفورماتیکی ساختار ساقه‌حلقه و کلون نمودن سازه لازم جهت بیش بیان آن

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

گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم‌زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
*نویسنده مسؤول؛ ایمیل: soltanib@modares.ac.ir

دریافت: ۱۳۹۵/۱/۲۳  پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۹  انتشار برخط: ۱۳۹۷/۲/۹
مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ 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 تنظیم‌کننده های بیان ژن در سطح پس از رونویسی عمل می‌کنند. miRNA ها فرآیندهای 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.

**روش‌کار:** 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 ساقه‌حلقه و کلون نمودن سازه لازم جهت بیش بیان آن. مجله پزشکی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی ـ 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 ـ درمانی تبریز تحت مجوز کریتیو 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.

www.SID.ir

Arshive of SID



## 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 اپیتلیال 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 تقریبا 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 (۶-۴). سلول‌های دارای بیان بالای ERBB2 با گذر سریع از مرحله G1/S، تقسیم سلولی را در زمان کوتاه‌تری انجام می‌دهند (۷). علاوه بر این فعال‌شدن گیرنده ERBB2 موجب فعال‌شدن سرین پروتئاز الاستاز، می‌گردد. فرم بالغ و فعال cyclinE با شکسته‌شدن توسط الاستاز ایجاد می‌گردد. در نتیجه فعال‌شدن cyclin E 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 معمولا توسط RNA polymeseII رونویسی شده و سپس کلاهک‌گذاری و اضافه‌شدن 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 UTR'۳ 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). Let-7 و Lin-4 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.

## روش‌کار

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 (/http://genome.ucsc.edu) UCSC Genome Browser، درفت سال ۲۰۰۴ انجام گردید. با استفاده از نرم‌افزارهای Mature (Bayes(http://mirna.imbb.forth.gr/MatureBayes.html، miR-FIND (http://140.120.14.132:8080/MicroRNAProject-Web/ ) و Mature Pred (/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

www.SID.ir

Arshive of SID



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 miRNA های 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 گرادیانت 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 طویل‌سازی 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 c°۱۶ به مدت ۱ ساعت انجام و با روش شوک حرارتی در باکتری مستعد DH5α ترانسفورم گردید. کلونی‌های نوترکیب با استفاده از پرایمرهای وکتور (M13) و قطعه، بررسی و در نهایت کلونی حاوی پلاسمید مطلوب انتخاب و در LB (Luria-Bertani) مایع همراه با آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین به غلظت نهایی µl/ml۱۰۰ در دمای c ۳۷ به مدت ۱۶ ساعت کشت داده شد. استخراج پلاسمید با استفاده از کیت (Gene All, South Korea) انجام گرفت. کیفیت پلاسمید استخراج شده بر روی ژل آگارز ۱٪ تایید گردید. برش دوگانه با آنزیم‌های EcoR1 و BamH1 در دمای c°۳۷ روی وکتور استخراج شده pTZ57R/T و وکتور خالی pEGFPC1 انجام گردید. محصول Digestion روی ژل آگارز برده شد و قطعات بریده با استفاده از کیت از ژل استخراج گردید. پس از ligation با آنزیم T4 DNA Ligase قطعات بریده شده و انجام ترنسفورماسیون در باکتری، انتخاب باکتری نوترکیب با پرایمرهای وکتور pEGFPC1 و پرایمرهای قطعه انجام گردید. در نهایت کلنی مورد نظر در LB مایع همراه با آنتی‌بیوتیک کانامایسین به غلظت نهایی µl/ml۱۰۰ کشت داده و پس از استخراج پلاسمید برای تایید نهایی کلون شدن قطعه صحیح، تعیین توالی صورت گرفت.

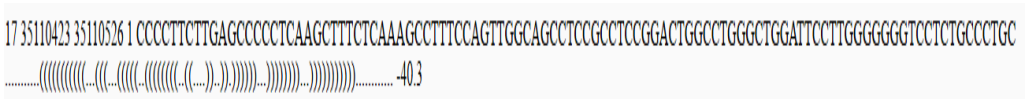
## یافته‌ها

جستجوی اولیه برای یافتن miRNA های احتمالی در ژن ERBB2 با استفاده از نرم‌افزار SCC profiler نشان می‌داد ناحیه‌ای اینترونی از ژن ERBB2 (Hg17,chr17: 35110423 - 35110526) توانایی ایجاد ساختار ساقه دارد (شکل ۱). نرم‌افزار MirEval نیز ساختار ثانویه این توالی را ساقه–حلقه و شبه پیش‌ساز miRNA پیش‌بینی نمود. نتایج به دست آمده با نرم‌افزار miPRED اطلاعاتی در مورد توالی و ساختار ثانویه پیشنهاد و با درصد اطمینان ۶۰.۳٪ آن را یک پیش‌ساز miRNA واقعی شناسایی نمود (جدول ۱). بررسی میزان حفاظت شدگی توالی مورد نظر با استفاده از نرم‌افزار UCSC Genome Browser و Blat کردن توالی مورد نظر قابل انجام است. شکل ۲ الگوی حفاظت شدگی مربوط به این توالی را نشان می‌دهد. همان‌گونه که از شکل بر می‌آید این توالی در انسان، موش و موش صحرایی حفاظت شده است.

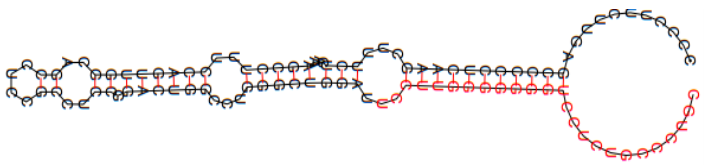
الف

| chr | nucStart | nucEnd | strand | Max_Expression | Max_Exp_location | HMMScore | Cell_Line | 2ry Structure |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 17 | 35110423 | 35110526 | top_strand | 18.5 | 35110503 | 16.0 | HeLa | 2ry Structure |

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 رده‌سلولی Hela بیان می‌شوند.

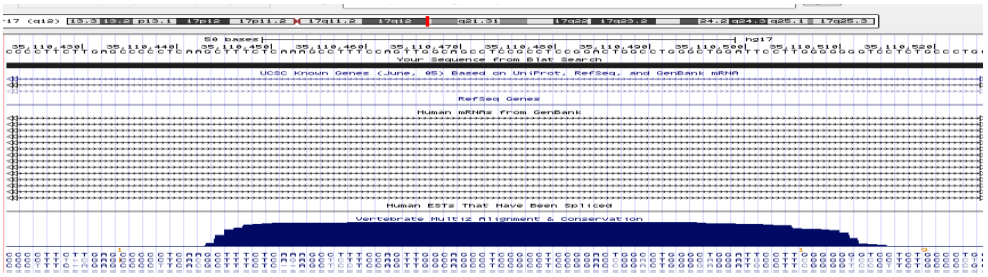
www.SID.ir

Arshive of SID



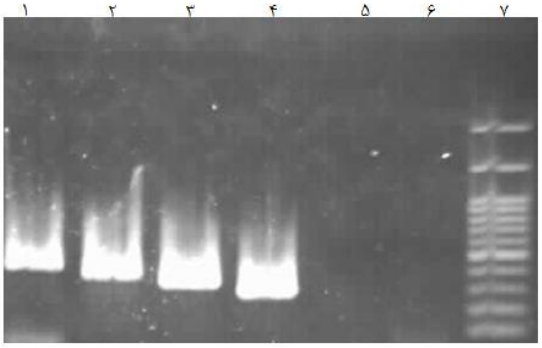
جدول ۱: نتایج به دست آمده از آنالیز توالی با نرم افزار miPRED

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%



شکل۲: بررسی میزان حفاظت شدگی توالی مورد نظرآنالیز با نرم‌افزار UCSC Genome Browser نشان می‌دهد توالی در طول تکامل به خوبی حفاظت شده‌است.

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 تقریبا یکسان پیش بینی نموده‌اند. در نرم افزار 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 بر روی ژل آگارز ۱.۵٪ همراه 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. کلونی-های 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 pEGFPC1 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.




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

www.SID.ir

Arshive of SID



## بحث

در سال ۲۰۱۵ Dokanehiifard و همکاران با انجام مطالعات بیوانفورماتیکی و بیش بیلن 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 می-شود. 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 می-باشد. استفاده از نرم‌افزار miPred برای تشخیص ساختارهای واقعی پیش‌ساز miRNA از دیگر ساختارهای غیرواقعی شبه ساختارهای ساقه–حلقه‌ای بسیار مفید است. برای این نرم افزار 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 هملوگهای آنها در ژنوم موش، رت، جوجه و شمپانزه نشان می-دهد که الگوی حفظ شدگی خاصی بین این ژنها وجود دارد. بنابراین حفاظت شدگی توالی به‌ویژه در نواحی اینترونی می‌تواند دلیلی بر پردازش miRNA از ساختار ساقه_حلقه باشد. بررسی الگوی حفاظت‌شدگی 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 پیش بینی و miRNA های بالغ ساقه‌های ′۳ و ′۵ را معرفی می‌کنند. علاوه بر این نرم‌افزار miR-FIND براساس نرم-افزار 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 تقریبا 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 براین به دلیل اندازه مناسب (۴/۷ کیلو جفت باز) نرخ ترانسفکت آن به رده‌های سلولی نسبتا 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 محدودالاثر 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 therapies. *Journal of Clinical Investigation* 2007; **117**(8): 2051-2058. doi: 10.1172/JCI32278

www.SID.ir

Arshive of SID




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, Procten 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.


www.SID.ir