

Identification and Discovery of Novel microRNAs in the Human Genome

Sadat Dokanehiifard¹, Bahram Mohammad Soltani^{2*}

1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: soltanib@modares.ac.ir

Received: 21/Jun/2014, Accepted: 05/Nov/2014

Abstract

Although more than 98% of the human genome is transcribed, most of these transcripts are not translated into proteins. Rather, they are considered as non-coding RNAs. MicroRNAs (miRNAs) are very short non-coding RNAs approximately 22 nucleotides in length which regulate many key processes of cells such as growth, proliferation, differentiation, cell cycle, apoptosis (programmed cell death) and metabolism. On the other hand, it is known that these small regulatory molecules are involved in many human diseases such as different cancers and cardiovascular disorders. Therefore, discovery and functional characterization of novel miRNAs is a prominent achievement. Low abundance and spatiotemporal expression of these mediator molecules make their discovery difficult by conventional methods. Therefore, bioinformatics software have been designed for the prediction of stem-loop structures capable of producing miRNA precursors in the human genome. On the other hand, there are several bioinformatics tools for prediction of miRNA target genes. Prediction of miRNA target genes helps to characterize the function of a miRNA. In this paper, we have reviewed some of the common efficient bioinformatics tools and experimental approaches used for prediction and identification of the miRNA genes and their target genes.

Keywords: miRNA, miRNA target genes, Bioinformatics

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol. 18 (2015-2016), No. 1, Pages: 1-21

شناسایی و کشف microRNAهای جدید در ژنوم انسان

سادات دوکانه‌ای فرد^۱، بهرام محمد سلطانی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک

Email: soltanib@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۱۱/۰۱

دریافت مقاله: ۹۳/۰۸/۱۳

چکیده

گرچه بیش از ۹۸ درصد ژنوم مهره‌داران رونوشت‌برداری می‌شود، ولی اغلب آن به پروتئین ترجمه نشده و RNA غیر کد کننده محسوب می‌شود. miRNAها دسته‌ای از RNAهای غیر کد کننده است که طولی در حدود ۲۲ نوکلئوتید دارد و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله رشد، تکثیر، تمایز، چرخه سلولی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و متابولیسم نقش دارد. همچنین نقش این مولکول‌ها در ایجاد بسیاری از بیماری‌های انسانی از جمله انواع مختلفی از سرطان‌ها و اختلالات قلبی عروقی به اثبات رسیده است. کشف و تعیین عملکرد miRNAهای جدید دستاورد بسیار مهمی محسوب می‌شود. miRNAهایی که بیان کمی دارد یا در زمان یا بافت خاصی بیان می‌شود با روش‌های آزمایشگاهی رایج به راحتی شناسایی نمی‌شود. بنابراین نرم‌افزارهای بیوانفورماتیکی زیادی برای پیش‌بینی وجود ساختارهای شبه پیش‌سازهای miRNA در ژنوم انسان طراحی شده است. همچنین نرم‌افزارهایی طراحی شده‌است که با پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA راه را برای درک عملکرد این عوامل در سلول هموار می‌سازد. در مقاله حاضر تلاش می‌شود که روش‌های کارآمد بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی که برای پیش‌بینی و کشف miRNAهای جدید و اهداف ژنی آن‌ها در ژنوم انسان استفاده می‌شود، معرفی شود.

کلیدواژگان: miRNA، ژن‌های هدف miRNA، بیوانفورماتیک

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۸، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴، صفحات: ۲۱-۱

مقدمه

مجموعه RNAهای عملکردی و غیر کد کننده (non coding RNA: ncRNA) به حساب می‌آیند [۲، ۳] و نیز با نام‌های دیگری مانند npcRNA (non-protein-coding RNA)، nmRNA (non-messenger-RNA) و fRNA (functional RNA) عنوان می‌شوند. مولکول‌های miRNA RNAهای کوچک غیر کد کننده، با اندازه حدود ۲۲ نوکلئوتید است که قادر به تنظیم بیان صدها ژن به‌طور همزمان است [۴]. مولکول‌های miRNA، در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی

با این‌که حدود ۹۸ درصد ژنوم مهره‌داران رونوشت‌برداری می‌شود اما فقط دو درصد آن‌ها ژن‌های کد کننده پروتئین است و بقیه نوعی RNA عملکردی را کد می‌کند که عموماً قابلیت ترجمه به پروتئین را ندارد [۱]. از جمله این RNAها می‌توان به tRNA (Transfer RNA)، rRNA (Ribosomal RNA)، snoRNA (small nucleolar RNA)، siRNA (small interfering RNA)، piRNA (PIWI-interacting RNA)، lncRNA (long non coding RNA) و miRNAها اشاره کرد که جز

کشف microRNA های انسانی

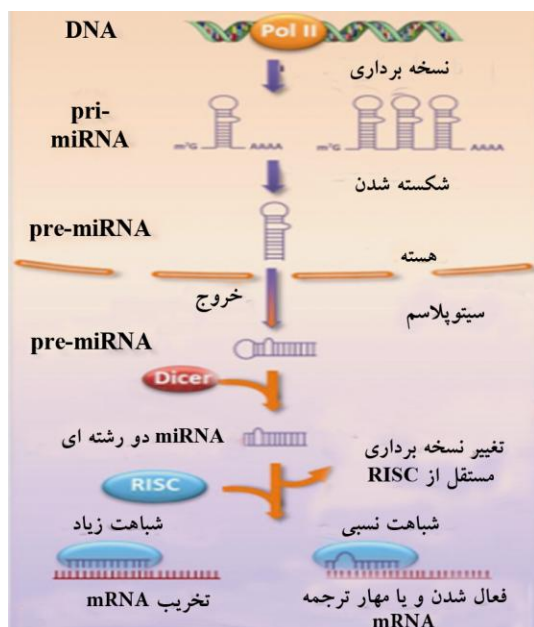
عنوان شد که miRNA ها به هر نقطه‌ای از توالی ژن هدف می‌تواند متصل شود [۱۶]. امروزه پذیرفته شده که عملکرد اصلی miRNA ها جلوگیری از تولید پروتئین از طریق ناپایدار کردن mRNA ژن هدف یا مهار ترجمه آن است [۱۷-۱۹] علاوه بر این نقش مهاری، miRNA ها قادر به فعال کردن mRNA هدف نیز هست. از این رو یک miRNA بسته به شرایط می‌تواند به عنوان فعال کننده یا مهار کننده پروتئین سازی عمل کند [۲۰، ۲۱]. بسیاری از اطلاعات مربوط به miRNA های شناسایی شده، در پایگاه داده‌ای miRBase به ثبت رسیده است (www.mirbase.org).

بیان اغلب miRNA ها در بسیاری از بیماری‌ها از جمله سرطان تغییر می‌کند که بیانگر نقش آن‌ها در ایجاد بیماری است [۲۲-۲۴]. در سال ۲۰۰۲ اولین گزارش مبنی بر نقش miRNA ها در سرطان ارایه شد [۲۵] و در سال ۲۰۰۴ miRNA به عنوان یک نشانگر زیستی در تشخیص و پیشرفت این بیماری مدنظر قرار گرفت [۲۶]. میانکشی بین miRNA و ژن‌های هدف آن در سرطان [۲۷-۲۹] و تغییرات بیان آن طی رشد و شکل‌گیری تومور [۳۰] تأثیر تغییر بیان آن‌ها در ایجاد بیماری‌های قلبی عروقی [۱۰] و نقش این عوامل در ایجاد متاستاز (Metastasis) و خودایمنی [۳۱]، در گزارش‌های متعددی آمده است. امروزه مشخص شده که بیش بیان تنها یک miRNA می‌تواند سبب ایجاد سرطان شود [۳۲]. چنانچه ژنی از نظر تکاملی حفاظت شده باشد، ارتباط بیشتری با ژن‌های دیگر دارد و زمانی که آسیب ببیند اثر کشندگی آن بیشتر است. چنین ژن‌هایی با احتمال بالاتری در بیماری‌ها دخیلند. این ارتباطات در مورد بیماری‌ها و miRNA ها نیز بررسی شده است و وجود برخی از SNP ها در miRNA های مرتبط با بیماری گزارش شده است [۲۱]. همچنین کشف miRNA ها در سرم و پلاسمای خون بیماران راه را برای مطالعه دسته‌ای از miRNA ها به نام miRNA های در گردش (Circulating miRNA) که می‌تواند به عنوان نشانگرهای زیستی (Biomarker) به کار رود باز کرده است. این مولکول‌ها که در

از جمله تمایز، مرگ برنامه ریزی شده، تکثیر، نمو و میانکشی‌های میزبان - بیماری‌زا دخیل است [۵-۸].

ژن Lin-4 اولین miRNA ای بود که در سال ۱۹۹۳ کشف شد و در یک ناحیه ۷۰۰ جفت بازی ژنوم کرم نماتد (*Caenorhabditis elegans*) واقع شده است. گرچه جهش در ژن Lin-4 سبب نقص در نمو نماتد می‌شد ولی بی تأثیر بودن جهش در بسیاری از جایگاه‌های این ژن پیشنهاد می‌کرد که Lin-4 کد کننده پروتئین نیست تا این‌که در سال ۱۹۹۳ رونوشت‌های ۶۱ و ۲۲ نوکلئوتیدی از این ژن شناسایی شد [۹]. پس از آن مشخص شد که توالی رونوشت Lin-4 مکمل یک توالی تکراری در ناحیه 3'-UTR ژن Lin-14 است و از این طریق بیان این ژن را کنترل می‌کند [۹]. امروزه می‌دانیم که تمامی بازهای سازنده یک miRNA از اهمیت یکسانی برخوردار نیست. مهم‌ترین نوکلئوتیدهای یک miRNA که توالی ناحیه سید (Seed) نامیده می‌شود دارای بیشترین حفاظت شدگی تکاملی است و به صورت کامل با توالی هدف جفت می‌شود. معمولاً ناحیه سید را بازهای دوم تا هشتم یک miRNA می‌سازد [۱۰]. Let7 دومین miRNA ای بود که ابتدا در نماتد *C. elegans* گزارش شد. این miRNA مکمل دو محل نزدیک به هم در ناحیه 3'-UTR در ژن Lin-41 است و در مراحل نهایی نمو نماتد نقش دارد [۱۱، ۱۲]. توالی Let7 در انسان و چند موجود دیگر حفظ شده است و در بافت‌های مختلفی از جمله مغز، کلیه، قلب، کبد، ریه، کولون، روده کوچک، طحال، معده و تیموس انسان نیز بیان دارد [۱۳]. در سال ۲۰۰۰ مشخص شد که RNAi (RNA interference) قطعات RNA دو رشته‌ای با طول تقریبی ۲۱-۲۳ باز است که سبب تخریب mRNA هدف می‌شود [۱۴]. بنابراین واحد عملکردی RNAi طولی برابر یک miRNA دارد. در سال ۲۰۰۱ گزارش‌هایی مبنی بر درگیر بودن ترکیبات مسئول فرآیند RNAi در تولید miRNA ارایه شد [۱۵]. در سال ۲۰۰۴ مشخص شد که پروتئین exportin-5 در انتقال پیش‌ساز miRNA از هسته به سیتوپلاسم نقش دارد و در سال ۲۰۰۷

۲۲ نوکلئوتیدی تولید می‌کند. دو رشته‌ای حاصل شامل miRNA بالغ و مکمل آن بنام $miRNA^*$ است. مرحله نهایی شامل بارگیری زوج $miRNA-miRNA^*$ داخل مجموعه RISC (RNA Induced Silencing Complex) است. ساختار زوج $miRNA-miRNA^*$ طوری است که انتهای 3' آن نسبت به انتهای 5' دارای دو نوکلئوتید پیش آمده (Overhang) است. رشته‌ای که جفت شدگی بازها در انتهای 5' آن پایداری کمتری دارد به عنوان miRNA واقعی متصل به این کمپلکس باقی می‌ماند در حالی که $miRNA^*$ یا تخریب یا از کمپلکس جدا می‌شود (شکل ۱) [۳۱].



شکل ۱ تصویر شماتیک تولید miRNA: miRNAهای بالغ طی چندین مرحله تولید می‌شود. ابتدا یک رونوشت اولیه pri-miRNA با استفاده از الگوی DNA ساخته می‌شود و پس از پردازش و برش خوردن به فرم پیش‌ساز miRNA تبدیل و به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. در سیتوپلاسم آنزیم دیگری به نام دایسر آن را به فرم miRNA دو رشته‌ای برش می‌دهد. دو رشته‌ای حاصل به کمپلکس RISC متصل می‌شود و miRNA بالغ را تولید می‌کند. میزان مکمل بودن توالی miRNA بالغ با توالی mRNA هدف، تعیین کننده سرنوشت miRNA خواهد بود [۷۰].

اغلب miRNAها در نواحی بین ژنی واقع شده‌است ولی تعداد زیادی نیز در نواحی ایترونی ژن‌های کد کننده یا ژن‌های

سیالات مختلف بدن وجود دارد، از سلولی به سلول دیگر منتقل می‌شود و در پیام‌رسانی بین سلولی و اندامک‌ها نقش دارد [۳۳-۳۵].

بخشی از اطلاعات مربوط به ارتباط miRNAها و بیماری‌ها در چندین پایگاه داده از جمله PhenomiR (<http://mips.helmholtz-muenchen.de/phenomir/>) و HMDD (Human miRNA and Disease Database) (<http://202.38.126.151/hmdd/mima/md/>) گُردآوری شده است.

ساز و کار سلولی و مولکولی تولید miRNAها

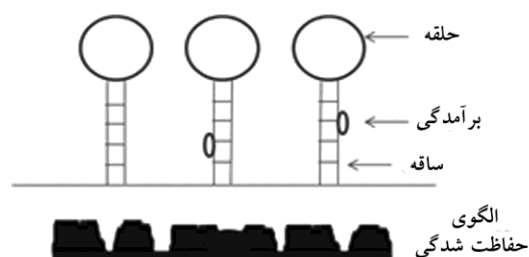
اگر چه برخی از miRNAها توسط RNA پلیمراز III نسخه‌برداری می‌شود [۳۶]، بیشتر آن‌ها ابتدا توسط RNA پلیمراز II نسخه‌برداری و یک رونوشت بلند به نام pri-miRNA ساخته می‌شود که اندازه آن‌ها می‌تواند به چندین کیلو باز برسد. pri-miRNA شامل یک یا چند ساختار ثانویه سنجاق سری است که دارای ساختار Cap در انتهای 5' و دم پلی A در انتهای 3' خود است. سپس در هسته، این مولکول توسط آنزیمی از نوع اندونوکلاز III به نام دروشا (Drosha) به همراه پروتئین پاشا (Pasha) به یک ساختار ۶۰-۱۱۰ نوکلئوتیدی به نام پیش‌ساز miRNA (pre-miRNA) تبدیل می‌شود. در مورد miRNAهایی که توسط ایترون‌ها کد می‌شود، پردازش توسط مجموعه دروشا و پاشا همزمان با نسخه‌برداری و پردازش mRNA صورت می‌گیرد [۳۷]. در میرترون‌ها (Mirtronها) که نوع خاصی از miRNAهاست، پردازش توسط دروشا ضروری نیست زیرا ایترون پردازش شده خود معادل یک پیش‌ساز miRNA عمل می‌کند [۳۸]. سپس پیش‌ساز miRNA با یک مکانیسم وابسته به exportin-5 به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. در سیتوپلاسم یک آنزیم اندونوکلاز شبه RNase-III دیگر به نام دایسر (Dicer) ساختار سنجاق سری پیش‌ساز را شناسایی و آن را از محل لوپ انتهایی آن برش می‌دهد و یک RNA دو رشته‌ای تقریباً

رشته‌ای تقریباً ۳۳ جفت بازی، یک لوپ انتهایی و دو قطعه تک رشته‌ای بدون ساختار در انتهای 3' و 5' تشکیل شده است [۳۶].

روش‌های شناسایی آزمایشگاهی miRNA

در روش سنتی کشف ژن‌ها در ژنتیک، ابتدا با جهش‌زایی مصنوعی یا طبیعی نوعی تنوع فنوتیپی مندلی ایجاد می‌شود که در مراحل بعد موقعیت ژن ایجاد کننده فنوتیپ جدید توسط روش همانندسازی موقعیتی (Positional Cloning) تعیین و توالی‌یابی می‌شود. در این روش هر چه اندازه ژن مورد مطالعه کوچک‌تر باشد شانس ایجاد جهش در آن کم‌تر و کشف ژن مشکل‌تر خواهد بود. همچنین برخی از ژن‌ها نسبت به تغییرات نوکلئوتیدی تحمل بالاتری دارد و جهش موجب ایجاد فنوتیپ متمایز نمی‌شود. به عبارت دیگر؛ چند شکلی توالی نوکلئوتیدی در عملکرد نهایی آن‌ها مؤثر نیست. با وجود این‌که اولین miRNA به روش ژنتیک مستقیم و جهش‌زایی کشف شد [۹]، اندازه کوچک miRNA ها و تحمل بالقوه آن‌ها نسبت به جهش‌هایی که در آن‌ها صورت می‌گیرد کشف آن‌ها را با روش‌های سنتی مشکل ساخته است. همچنین به دلیل حشو (Redandancy) یا حضور نسخه‌های مشابه miRNA در سایر نقاط ژنوم، مطالعه اثر جهش در miRNA بر فنوتیپ چندان مؤثر نیست [۴۲]. علاوه بر این؛ برخی miRNA ها سطوح بیانی پایینی دارد یا در مراحل یا در انواع سلول‌های خاصی بیان می‌شود که یک محدودیت عمده در کشف miRNA های جدید به‌شمار می‌آید. یکی از روش‌های کارآمد در کشف miRNA های جدید روش توالی‌یابی گسترده (Deep Sequencing) است که طی آن ابتدا RNA های کوچک سلول استخراج و از بقیه انواع بزرگ‌تر جدا و تبدیل به cDNA های کوچک متناظر می‌شود. سپس این قطعات به یکدیگر متصل و قطعات بزرگ‌تری ساخته و تعیین توالی می‌شود [۲۴]. اگرچه تعداد زیادی از miRNA های جدید با این روش کشف شده ولی برخی از miRNA ها ممکن است به خاطر ویژگی‌های فیزیکی خاصی که دارد کلون و تعیین توالی نشود [۴۲، ۴۳].

غیر کد کننده مستقر است. برخی از miRNA ها به صورت خوشه‌ای دسته بندی شده است (شکل ۲) و معمولاً در هر خوشه حدود ۲ تا ۳ ژن miRNA قرار دارد. البته خوشه‌های بزرگ‌تری مثل خوشه حفاظت شده hsa-miR-17 در انسان نیز شناخته شده است که ۶ عضو دارد [۳۹-۴۱]. شواهد نشان می‌دهد خوشه‌ها به صورت پلی سیسترونی نسخه‌برداری می‌شود و الگوی بیان مشابهی دارد. یعنی miRNA های خوشه‌ای به صورت همزمان بیان می‌شود و در یک فرآیند سلولی مشترک ایفای نقش می‌کند [۶، ۳۹].



شکل ۲ یک خوشه سه تایی از ساختار سنجاق سری؛ محل ساقه (Stem) و لوپ (Loop) و نیز برآمدگی‌ها (Bulge) در هر ساختار سنجاق سری نشان داده شده است. توالی miRNA بالغ معمولاً در محل ساقه قرار دارد و توالی ساقه حفظ شدگی بیشتری نسبت به ناحیه لوپ انتهایی دارد. این الگوی حفظ شدگی سبب ترسیم یک الگوی حفظ شدگی زمین اسبی توسط نرم‌افزار می‌شود.

مقایسه ژن‌های miRNA انسانی و همولوگ‌های آن‌ها در ژنوم موش، رت، جوجه و شپانزه نشان داده است که الگوی حفظ شدگی خاصی بین این ژن‌ها وجود دارد. این الگوی حفظ شدگی بین خوشه‌ها به گونه‌ای است که در محل miRNA ها و پیش‌سازهای آن‌ها بیشترین حفظ شدگی دیده می‌شود. در برخی موارد در وسط بخش حفظ شده یک ناحیه حفظ نشده وجود دارد که شکل زمین اسبی ایجاد می‌کند (شکل ۲) که مربوط به بخش لوپ در ساختار ثانویه پیش‌ساز miRNA است [۳۹]. الگوی نسخه‌برداری miRNA های ایترونی مشابه الگوی بیان ژنی است که داخل آن مستقر است. یک pri-miRNA نمونه تک سیسترونی از یک ساقه دو

مثلاً miRNA هایی که سطح بیان نسبتاً کمی دارد یا بیان آن‌ها محدود به بافت یا سلول خاصی است به سختی با روش فوق شناسایی می‌شود.

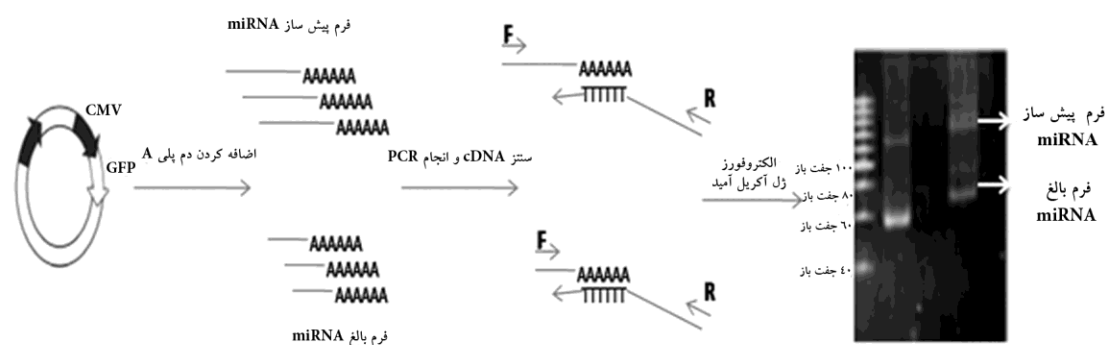
روش‌های شناسایی ژن‌های miRNA

ضروری است که miRNA پیش‌بینی شده به روش‌های آزمایشگاهی تأیید شود. چندین روش تجربی برای تأیید هویت miRNA های پیش‌بینی شده وجود دارد:

- روش کلون‌سازی مستقیم بر مبنای PCR

از آن‌جا که miRNA فاقد توالی Ploya در انتهای 3' خود

و دارای طول کوتاهی است نمی‌توان به راحتی آن‌ها را تبدیل به cDNA نمود. برای حل این مشکل، ابتدا با استفاده از ATP و آنزیم باکتریایی PolyA Polymerase یک دم PolyA به انتهای 3' تمامی RNA های استخراج شده اضافه می‌شود. سپس با استفاده از یک آغازگر (Primer) OligodT مخصوص دنباله‌دار (Anchored) ساخت cDNA صورت می‌گیرد. پس از آن با استفاده از یک آغازگر مخصوص دنباله OligodT که آغازگر عمومی نامیده می‌شود و یک آغازگر دیگر که مکمل miRNA است واکنش PCR انجام می‌شود. تعیین توالی محصولات PCR تأیید کننده هویت miRNA مورد نظر است [۴۴]. مراحل انجام این روش در (شکل ۳) نشان داده شده است.



شکل ۳ نحوه شناسایی فرم پیش‌ساز و بالغ miRNA با استفاده از روش کلون‌سازی مستقیم miRNA بر مبنای PCR. ابتدا با استفاده از آنزیم پلی A پلیمراز دم پلی A به انتهای پیش‌ساز و بالغ miRNA افزوده می‌شود. سپس ساخت cDNA با آغازگر الیگو dT دنباله‌دار صورت می‌پذیرد. آن‌گاه واکنش PCR با استفاده از آغازگرهای ویژه دنباله (در اینجا آغازگر R) و آغازگر مخصوص miRNA (در اینجا آغازگر F) انجام می‌شود و محصول PCR روی ژل آکریل آمید بارگذاری و سپس کلون و تعیین توالی می‌شود تا هویت قطعات تکثیر شده مشخص شود [۴۴].

- روش دوره‌سازی نوردن (Northern Blot)

با استفاده از این روش می‌توان علاوه بر بیان miRNA، اندازه آن را نیز تعیین کرد. این روش به دفعات برای تأیید بیان miRNA های کلون شده استفاده شده است [۴۲، ۴۵]. زمانی که توالی ژنومی یک ژن به‌عنوان پروب (Probe) استفاده شود، علاوه بر mRNA های نسخه‌برداری شده از آن

ژن، می‌توان تولید miRNA های منتج از آن ژن را نیز مشخص نمود.

- روش تداوم آغازگر (Primer Extension) برای

تعیین انتهای 5' یک miRNA

معمولاً برای ساختن cDNA از Oligo-dt یا آغازگر

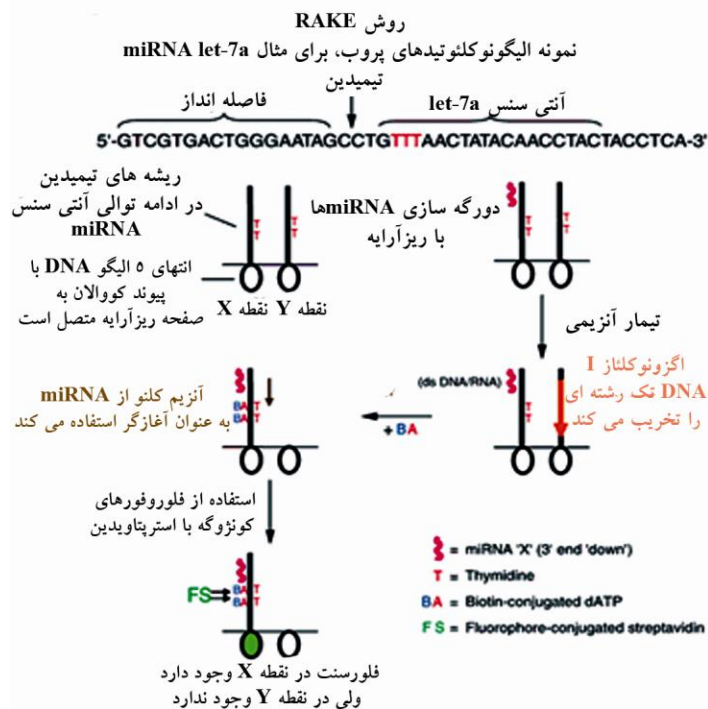
کشف microRNA های انسانی

ترمینال ترانسفراز، توالی شناخته شده از یک باز خاص را اضافه نمود و از آن برای دو رشته‌ای نمودن cDNA و سپس تعیین توالی آن استفاده نمود [۴۶]. تصویر شماتیک این روش در شکل ۴ نشان داده شده است.

تصادفی استفاده می‌شود. ولی در این روش ساخت cDNA ویژه miRNA مورد نظر با استفاده از یک آغازگر مکمل توالی انتهای 3' آن miRNA صورت می‌گیرد. سپس می‌توان به انتهای 3' رشته تازه ساخته شده cDNA و با استفاده از آنزیم



شکل ۴ تصویر شماتیک روش تداوم آغازگر [۷۱]: در این روش ابتدا با استفاده از آغازگری که بخشی از آن ویژه انتهای miRNA 3' است (Gene Specific Primer: GSP) ساخت cDNA انجام می‌شود.



شکل ۵ تصویر شماتیک روش RAKE؛ پروب‌های مورد نظر که در بالای شکل نشان داده شده‌است، توالی‌های الیگونوکلوئیدی DNA است که برای ریزآرایه استفاده می‌شود. در انتهای 5' این نوکلئوتیدها یک توالی فاصله‌انداز (Spacer) قرار دارد که در تمامی پروب‌های استفاده شده یکسان است و در ادامه آن سه نوکلئوتید تیمیدین تعبیه می‌شود. ناحیه متغیر در هر یک از پروب‌ها که توالی آنتی‌سنس miRNA است در انتهای 3' آن قرار گرفته است. نمونه RNAی که حاوی miRNAهاست با اسلاید ریزآرایه ای که بر آن پروب‌ها لکه‌گذاری شده‌است دو رگه می‌شود. پس از آن اسلایدها شسته شده و با به‌کارگیری آنزیم اگزونوکلاز I تمام پروب‌های تک رشته‌ای دو رگه نشده تخریب می‌شود. شستشوی مجدد اسلاید انجام شده و قطعه کلو (Klenow Fragment) آنزیم DNA پلیمراز I از پروب به‌عنوان الگو استفاده می‌کند و افزودن dATP متصل به بیوتین را به انتهای miRNA 3' به‌عنوان آغازگر انجام می‌دهد. در پایان کار، بیوتین‌ها با استفاده از استرپتوآویدین متصل به رنگ فلوروفور (Fluorophore) نشان‌دار می‌شود و لکه‌هایی که در آن‌جا دو رگه شدن miRNA صورت گرفته است (در این شکل لکه X) مشخص می‌شود [۴۷].

روش RAKE (RNA-primed, Array-based Klenow Enzyme)

در این روش در مرحله اول miRNAها به پروب‌های موجود روی ریز آرایه افزوده می‌شود تا با آن‌ها دورگه شود سپس واکنش پلیمرازی در جهت 5' به 3' در حضور آنزیم کلنو (Klenow) و نوکلئوتیدهای بیوتینه (Biotin-conjugated) انجام می‌شود. آنگاه استرپتیدین (Streptavidin) متصل به رنگ فلورسنت افزوده می‌شود تا نشانه حاصل از اتصال نوکلئوتید بیوتینه شناسایی شود. این روش در ابتدا برای بررسی نمایه بیانی miRNAهای شناخته شده استفاده می‌شد ولی برای تعیین انتهای 3' در miRNAهای پیش‌بینی شده نیز قابل استفاده است. این روش برعکس روش تداوم آغازگر عمل می‌کند. اگرچه روش قدیمی ریز آرایه نیز برای شناسایی miRNAهای پیش‌بینی شده قابل استفاده است ولی مزیت روش RAKE به روش قدیمی ریز آرایه این است که با این روش می‌توان توالی انتهای 3' در miRNA پیش‌بینی شده را مشخص کرد [47]. جزئیات بیشتر این روش در شکل 5 نشان داده شده است.

روش‌های دورگه سازی در محل (In Situ)

این روش برای تعیین الگوی بیانی زمانی-مکانی miRNAهای پیش‌بینی شده به کار می‌رود. این روش نمی‌تواند اطلاعاتی در مورد اندازه و توالی انتهای miRNA در اختیار کاربر قرار دهد و تنها مشخص می‌سازد که کدام miRNA در بافت مورد بررسی بیان می‌شود [48].

روش‌های شناسایی اهداف miRNAها

گفته شد که جفت شدگی کامل بین miRNAها و mRNA پستان‌داران پدیده‌ای نادر است اما جفت شدگی در حد شش جفت باز برای مهار ژن‌ها کافی است. تنظیم بیان ژن‌های هدف توسط این miRNAها به وسیله ترکیبی از تجزیه mRNA و مهار ترجمه آن صورت می‌گیرد که به وسیله

روش‌های آزمایشگاهی نظیر RT-PCR، اندازه‌گیری لوسیفراز و وسترن بلات مشخص می‌شود. روش اندازه‌گیری لوسیفراز به منظور نشان دادن اهداف مستقیم یک miRNA استفاده می‌شود. در شکل ساده این روش، توالی مورد هدف miRNA (مثلاً UTR 3' مورد نظر که MREها در آن قرار دارد) پایین دست ژن لوسیفراز کلون می‌شود و میانکنش مستقیم miRNA با mRNA کایمری (مركب از توالی لوسیفراز و UTR 3' هدف) به اثبات می‌رسد. همچنین به عنوان تأیید و تعیین اختصاصیت میانکنش ذکر شده، توالی UTR 3' هدف در محل MREها جهش می‌یابد و سپس به ژن لوسیفراز متصل می‌شود [49، 19]. سایر روش‌های آزمایشگاهی که برای شناسایی mRNAهای هدف miRNA استفاده می‌شود بر پایه بیان متمایز miRNA و ژن‌های هدف آن است. مثلاً پس از بیش بیان یا کاهش بیان یک miRNA، تجزیه و تحلیل ریزآرایه برای شناسایی ژن‌هایی صورت می‌گیرد که بیانشان کاهش یا افزایش یافته است. با این حال، در این روش میانکنش مستقیم miRNA با ژن هدف به اثبات نمی‌رسد.

افزایش بیان miRNA از طریق انتقال موقت یا پایدار (با استفاده از ناقل لتی ویروسی) پیش‌ساز بیان کننده miRNA به سلول صورت می‌گیرد. مهار بیان آن نیز توسط اولیگونوکلوئوتیدهای آنتی‌سنس به دست می‌آید که می‌تواند به miRNA بالغ متصل شود. استفاده از anti-miRs، antagomiRs، miRNA sponges و TuD (Tough Decoy) روش‌های متعدد خاموش کردن بیان miRNAها است. از آنجا که بیش بیان miRNAها ممکن است مجموعه‌های RISC را اشباع کرده و دیگر miRNAهای درون‌زاد را نیز تحت تأثیر قرار دهد، ممکن است فنوتیپ‌های مشاهده شده در اثر بیش بیان یک miRNA در واقع مربوط به بروز مشکل در تولید سایر miRNAها باشد و نوعی فنوتیپ کاذب به miRNA مورد مطالعه نسبت داده شود. همچنین در حالی که تنها یک رشته از پیش‌ساز کلون شده سازنده miRNA مورد مطالعه است، کلون شدن پیش‌ساز دو رشته‌ای ممکن است در ایجاد فنوتیپ اثرگذار باشد. از آنجا که تنها یک رشته سازه

miRNA mimic بیان می‌شود، استفاده از آن مشکل کلون‌سازی پیش‌ساز را ندارد ولی همواره تأثیر بیش بیان غیرعادی miRNA روی مجموعه‌های RISC و دیگر miRNA های درون‌زاد وجود خواهد داشت. یک محدودیت خاموش‌سازی اینست که اختصاصیت لازم را نداشته باشد و قادر به تمایز میان اعضای یک خانواده miRNA نباشد؛ همچنین اگر این اولیگونوکلوئیدها miRNA های درون‌زاد را بدون این که تخریب شود، مصادره کند، نمی‌توان با روش RT-PCR کاهش بیان این miRNA ها را مشاهده کرد [۵۰، ۵۱].

اهداف مستقیم miRNA ها را از طریق روش‌های بیوشیمیایی نیز می‌توان مشخص کرد. رسوب‌دهی ترکیبات مجموعه RISC با استفاده از آنتی‌بادی، HITS-CLIP (high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking photoactivatable-) PAR-CLIP (immunoprecipitation ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) و Biotin tagged miRNA از جمله این روش‌ها است [۵۲]. روش RLM-RACE 5' برای پیدا کردن هدف یک miRNA که در شرایط محیطی خاص ناپایدار است مناسب است. در این روش که بر پایه PCR استوار است، یک سازوارگر از جنس RNA به انتهای 5'-فسفات mRNA هدف اضافه می‌شود. سپس محصول حاصل رونوشت‌برداری معکوس و به وسیله PCR تکثیر داده می‌شود؛ آنگاه این محصول را کلون و تعیین توالی می‌کنند [۱۹، ۴۹]. روی هم رفته استفاده هم‌زمان از روش‌های تجربی و بیوانفورماتیکی کارآیی بهتری در شناسایی ژن‌های هدف miRNA دارد و برای یافتن شبکه‌های زیستی که miRNA ها در آن دخیل است تحقیقات گسترده‌تری لازم است.

miRNA mimic بیان می‌شود، استفاده از آن مشکل کلون‌سازی پیش‌ساز را ندارد ولی همواره تأثیر بیش بیان غیرعادی miRNA روی مجموعه‌های RISC و دیگر miRNA های درون‌زاد وجود خواهد داشت. یک محدودیت خاموش‌سازی اینست که اختصاصیت لازم را نداشته باشد و قادر به تمایز میان اعضای یک خانواده miRNA نباشد؛ همچنین اگر این اولیگونوکلوئیدها miRNA های درون‌زاد را بدون این که تخریب شود، مصادره کند، نمی‌توان با روش RT-PCR کاهش بیان این miRNA ها را مشاهده کرد [۵۰، ۵۱].

اهداف مستقیم miRNA ها را از طریق روش‌های بیوشیمیایی نیز می‌توان مشخص کرد. رسوب‌دهی ترکیبات مجموعه RISC با استفاده از آنتی‌بادی، HITS-CLIP (high-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking photoactivatable-) PAR-CLIP (immunoprecipitation ribonucleoside-enhanced crosslinking and immunoprecipitation) و Biotin tagged miRNA از جمله این روش‌ها است [۵۲]. روش RLM-RACE 5' برای پیدا کردن هدف یک miRNA که در شرایط محیطی خاص ناپایدار است مناسب است. در این روش که بر پایه PCR استوار است، یک سازوارگر از جنس RNA به انتهای 5'-فسفات mRNA هدف اضافه می‌شود. سپس محصول حاصل رونوشت‌برداری معکوس و به وسیله PCR تکثیر داده می‌شود؛ آنگاه این محصول را کلون و تعیین توالی می‌کنند [۱۹، ۴۹]. روی هم رفته استفاده هم‌زمان از روش‌های تجربی و بیوانفورماتیکی کارآیی بهتری در شناسایی ژن‌های هدف miRNA دارد و برای یافتن شبکه‌های زیستی که miRNA ها در آن دخیل است تحقیقات گسترده‌تری لازم است.

روش‌های شناسایی ژن‌های miRNA

اگر یک توالی کاندیدای کد کنندگی miRNA توسط چندین نرم‌افزار مورد تأیید قرار گیرد و ساختارهای سنجاق سری مشابه و مشترکی توسط این نرم‌افزارها پیشنهاد شود، شانس واقعی بودن miRNA پیش‌بینی شده بیشتر است. زیرا در عین حال که این نرم‌افزارها ویژگی‌های مشترکی برای

روش‌های شناسایی محاسباتی (بیوانفورماتیکی) miRNA ها

تاکنون حدود ۲۰۰۰ ژن miRNA در ژنوم انسان شناسایی شده است، برآورد شده است که بیش از ۵۵۰۰۰ ژن کد کننده

روش‌های شناسایی محاسباتی (بیوانفورماتیکی)

miRNA ها

تاکنون حدود ۲۰۰۰ ژن miRNA در ژنوم انسان شناسایی شده است، برآورد شده است که بیش از ۵۵۰۰۰ ژن کد کننده

پیش‌بینی یک ساختار سازنده miRNA در نظر می‌گیرند معیارهای منحصر به فردی نیز دارند. همچنین این احتمال وجود دارد که این نرم افزارها قادر به شناسایی یک miRNA واقعی نباشند [۵۳]. الگوریتم‌های زیادی که برای پیش‌بینی وجود ژن‌های miRNA طراحی شده است [۵۹] به صورت خلاصه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ ویژگی نرم افزارهای پیش‌بینی کننده ژن‌های miRNA

ردیف	نام نرم افزار	حساسیت (درصد)	اختصاصیت (درصد)	الگوریتم	معیار بررسی	زمان ارایه	URL
1	SSC profiler	۸۸/۹۵	۸۴/۱۵	Hidden Markov Models (HMM)	توالی، ساختار و میزان حفظ شدگی توالی	۲۰۰۷	http://mima.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html
2	MirEval 2.0	۸۹	۹۲	triplet-SVM support vector machines (SVM)	ساختار سنجاق سری، حفاظت شدگی توالی، خوشه‌ای بودن سنجاق سرها و شباهت با پیش سازهای ثبت شده در پایگاه miRBase	2013	http://tagc.univ-mrs.fr/mireval/
3	MiPred	۹۵	۹۸/۹۲	random forest (RF)	تعداد لوپ‌ها زیاد نباشد و انرژی آزاد ساختار مناسب باشد	2007	http://www.bionf.seu.edu.cn/miRNA/
۴	Microprocessor	۹۸	۹۹	support vector machine (SVM)	طول و اندازه لوپ موجود در پیش ساز و وجود نوکلئوتیدهای خاص در نواحی کناری پیش ساز	۲۰۰۷	http://demo1.int-eragon.com/miRNA/cgi-bin/MicroprocessorSVM.cgi
۵	CID-miRNA	۹۸	۹۹	stochastic context free grammar	ساختار سنجاق سری و وجود جایگاه برش دروشا	۲۰۰۸	http://mima.jnu.ac.in/cidmirna/

– نرم افزار SSC profiler

برای تولید یک miRNA لازم است که پیش ساز آن ساختار سنجاق سری به خود بگیرد. بنابراین نرم افزارهای کشف miRNAها توالی‌های کاندید را برای امکان تشکیل ساختار سنجاق سری می‌آزماید. اما بخش اعظمی از توالی ژنوم انسان قادر است به صورت ساختارهای شبه پیش ساز دچار تاخوردگی شود در حالی که اساساً مولد miRNA نیست. از این رو تشخیص ساختارهای واقعی پیش ساز از دیگر ساختارهای سنجاق سری اهمیت دارد. به همین منظور الگوریتم‌های متعدد طراحی شده است. نرم افزار SSC profiler (<http://mima.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html>) به وفور

برای پیش‌بینی ساختارهای سنجاق سری استفاده می‌شود. این برنامه براساس ویژگی‌هایی نظیر توالی، ساختار و میزان حفظ شدگی توالی، یک ساختار سنجاق سری و حتی توالی miRNA بالغ را پیشنهاد می‌دهد. در این نرم افزار سطح بیان ساختار پیش‌بینی شده در سلول‌های HeLa و HepG2 نیز ارایه می‌شود و محدوده عددی آن بین ۱ تا ۲۰۰۰ در نظر گرفته می‌شود [۵۳]. از دیدگاه این نرم افزار در یک ساختار سنجاق سری سازنده miRNA باید تعداد برآمدگی‌ها (Bulge) کم‌تر از ۱۶ و تعداد لوپ‌ها کم‌تر از ۳۲ باشد، میانگین تعداد لوپ‌ها به اضافه برآمدگی‌ها کم‌تر از ۳۷ عدد و بیش از ۲۵ درصد از نوکلئوتیدهای آن حفاظت شده باشد.

کشف microRNAهای انسانی

نمونه‌ای از نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل توالی مورد مطالعه با نرم‌افزار SSC profiler در (شکل ۶) نشان داده شده است. این ساختار مربوط به پیش‌ساز miRNA است که در سال ۲۰۱۲ توسط پارسی و همکاران کشف شد [۴۴]. این ساختار سنجاق سری در واقع ساختار پیش‌ساز miRNA پیش‌بینی شده است. ناحیه‌ای از این ساختار که با رنگ قرمز مشخص شده است بخشی است که به عنوان miRNA بالغ پیش‌بینی شده است [۵۳].



شکل ۶ ساختار پیش‌بینی شده پیش‌ساز miRNA-6165 توسط نرم‌افزار SSC profiler؛ ناحیه قرمز رنگ موقعیت احتمالی فرم بالغ miRNA پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار را نشان می‌دهد [۴۴].

از غیر واقعی استفاده می‌شود، لازم است طول توالی مورد بررسی بین ۵۱ تا ۱۳۷ نوکلئوتید باشد، حداقل ۱۸ جفت باز در ناحیه ساقه در ساختار سنجاق سری جفت باز تشکیل دهد و جفت باز لرزان G:U نیز قابل قبول است، بیشینه MFE (Minimum Free Energy) برای ساختار مورد بررسی ۱۵- کیلوکالری/مول باشد و تعداد لوپ‌ها زیاد نباشد [۴۰].

– نرم‌افزار Microprocessor

pri-miRNA یا همان نسخه‌ای که از روی ژن کد کننده miRNA ساخته شده است، توسط مجموعه میکروپروسسور (Microprocessor Complex) (شامل آنزیم‌های دروشا و DGCR8) پردازش و به پیش‌ساز تبدیل می‌شود که در انتهای 3' ساقه ساختار سنجاق سری ۲ نوکلئوتید بیرون‌زدگی دارد. سپس با فاصله مشخصی از این دو نوکلئوتید، آنزیم دایسر (Dicer) عمل می‌کند و miRNA بالغ در سیتوپلاسم ایجاد می‌شود. بنابراین اولین مرحله در تعیین محل miRNA

پیش‌ساز miRNAها بر خلاف tRNAها و rRNAها انرژی آزاد تاخوردگی کم‌تری نسبت به توالی‌های تصادفی دارد. برای این‌که نرم‌افزار SSC profiler یک ساختار سنجاق سری واقعی را پیش‌بینی کند، لازم است حداقل انرژی آزاد تعریف شده توسط نرم‌افزار RNAfold برای آن ساختار کم‌تر از ۲۵/۴۴- کیلوکالری/مول باشد. در نرم‌افزار SSC profiler آستانه امتیازدهی عدد ۳ است و هر چه این امتیاز بیشتر باشد احتمال صحیح بودن پیش‌بینی بیشتر است [۵۳].

– نرم‌افزار MirEval

این نرم‌افزار (<http://tagc.univ-mrs.fr/mireval>) مثل SSC profiler توالی‌های شبه پیش‌ساز را پیش‌بینی می‌کند و قادر است به طور همزمان تا ۱۰۰۰۰ نوکلئوتید را تجزیه و تحلیل کند. البته این نرم‌افزار توالی miRNA بالغ را نظیر آنچه SSC profiler پیشنهاد می‌کند، ارایه نمی‌دهد ولی با اشاراتی ناحیه مربوط به فرم بالغ miRNA را نشان می‌دهد. بررسی‌های این نرم‌افزار براساس چهار ویژگی اصلی پیش‌ساز یعنی ساختار سنجاق سری، حفاظت شدگی توالی، خوشه‌ای بودن سنجاق سرها و شباهت با پیش‌سازهای ثبت شده در پایگاه miRBase انجام می‌شود. کاربر می‌تواند تجزیه و تحلیل توالی موردنظر را با استفاده از یک یا هر چهار ویژگی انجام دهد [۶۰].

– نرم‌افزار MiPred

در این نرم‌افزار (<http://www.bioinf.seu.edu.cn/>) (miRNA/ که به منظور تشخیص ساختارهای پیش‌ساز واقعی

بالغ توسط میکروپروسسور انجام می‌شود. نرم‌افزار میکروپروسسور ([http://demo1.interagon.com/miRNA/cgi-bin/Microprocessor SVM.cgi](http://demo1.interagon.com/miRNA/cgi-bin/Microprocessor_SVM.cgi)) برای پیش‌بینی جایگاه برش مجموعه میکروپروسسور طراحی شده است و این کار را با یک توالی حداقل ۱۸۰ نوکلئوتیدی انجام می‌دهد [۶۱]؛ این نرم‌افزار برای تعیین دقیق جایگاه برش، از توالی و ساختار نواحی بالادست و پایین دست محل برش استفاده می‌کند. وجود یا عدم وجود بازهای خاصی در موقعیت‌های ویژه، موقعیت لوپ‌ها و حباب‌های داخل ساختار برای این نرم‌افزار مهم است. این نرم‌افزار هم ناحیه ۵' و هم ناحیه 3' جایگاه برش دروشا را روی ساختار پیش‌ساز، پیش‌بینی می‌کند و عملاً miRNAهای 3p را نیز می‌تواند پیش‌بینی کند. برای

این نرم‌افزار طول و اندازه لوپ موجود در پیش‌ساز مهم‌ترین پارامترهاست و سپس وجود نوکلئوتیدهای خاص در نواحی کناری پیش‌ساز در درجه بعدی اهمیت قرار دارد. نرم‌افزار میکروپروسسور نسبت به سایر نرم‌افزارها توانایی بیشتری برای پیش‌بینی و یافتن miRNAهایی دارد که حفظ شده نیست [۶۱]. نتیجه بررسی توالی پیش‌بینی شده پیش‌ساز miRNA-6165 با استفاده از این نرم‌افزار در (شکل ۷) نشان داده شده است [۴۴] در این شکل دو عدد داخل پرانتز شماره موقعیت نوکلئوتیدی پیش‌بینی شده است که توسط میکروپروسسور برش می‌خورد. یکی از این موقعیت‌ها مربوط به جایگاه انتهایی 5' و دیگری مربوط به جایگاه انتهایی 3' پیش‌ساز است.

جایگاه های پیش بینی شده برش دروشا

جایگاه ۵ (موقعیت باز ۷۱)

```
GGTGACGACAG GTCAGCAGGA GGTGAGGGGA GAGGATCCAC CTGTCTGTG CTGTCTCTC
CTGCCCTGTC CTGGCTCCAG CCCCTCCAC TCCCATGCCG CACCACTCCC TGACTCCCA
```

جایگاه ۳ (موقعیت باز ۱۲۱)

شکل ۷ موقعیت احتمالی نوکلئوتیدهای جایگاه‌های پیش‌بینی شده انتهایی 5' و 3' قابل برش توسط مجموعه آنزیمی میکروپروسسور برای پیش‌ساز miRNA-6165 با استفاده از نرم‌افزار Microprocessor [۴۴].

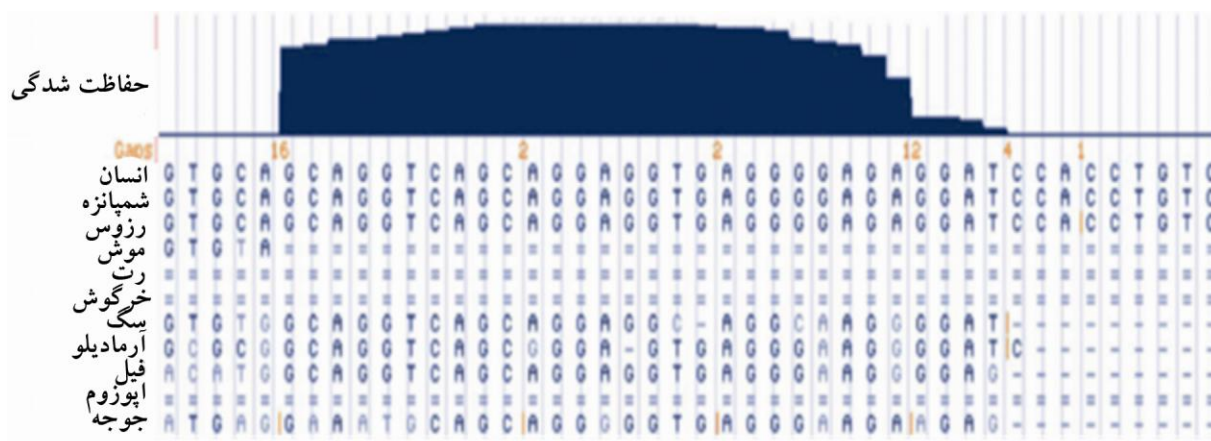
– نرم‌افزار CID-miRNA

این نرم‌افزار (<http://mima.jnu.ac.in/cidmima/>) نیز برای پیش‌بینی ساختار سنجاق سری و وجود جایگاه برش دروشا استفاده می‌شود. در این وب‌گاه امکان تجزیه و تحلیل توالی با طول بین ۶۰ تا ۱۰۰۰ نوکلئوتید مقدور است، گرچه امکان بارگذاری یک فایل تا ۲۰۰ کیلوبایت نیز فراهم است. تجزیه و تحلیل انجام شده در این نرم‌افزار بر اساس همولوژی انجام نمی‌شود [۶۲].

– نرم‌افزار UCSC

میزان حفظ شدگی توالی miRNA پیش‌بینی شده با مراجعه به سایت (<http://genome.ucsc.edu/>) و قابل بررسی است.

در این سایت پیش‌نویس سال‌های ۲۰۰۳، ۲۰۰۴، ۲۰۰۶ و ۲۰۰۹ ژنوم انسان در دسترس است و با وارد کردن توالی مورد نظر به سایت UCSC می‌توان میزان حفاظت شدگی آن را تعیین کرد. لازم به ذکر است که نرم‌افزار SSC Profiler از توالی ژنومی پیش‌نویس سال ۲۰۰۴ به‌عنوان داده ورودی استفاده می‌کند [۵۳] که با مراجعه به سایت UCSC به راحتی قابل دسترس است. نمونه‌ای از انجام این بررسی در (شکل ۸) نشان داده شده است. این شکل الگوی حفاظت شدگی مربوط به پیش‌ساز miR-6165 را نشان می‌دهد که ساختار آن در شکل ۶ آورده شده است. همان گونه که از شکل ۸ بر می‌آید توالی ساختار pre-miR-6165 در انسان، شیمپانزه و رسوس (*Rhesus macaque*) کاملاً حفاظت شده است ولی در موش و موش صحرایی حفاظت شده نیست [۴۴].



شکل ۸ الگوی حفظ شدگی پیش ساز miRNA-6165 توسط نرم افزار UCSC؛ ناحیه آبی رنگ بالای شکل بیانگر شدت حفظ شدگی این منطقه نوکلئوتیدی در میان موجوداتی است که توالی ژنومی آن‌ها در سایت UCSC وجود دارد [۴۴].

روش‌های شناسایی اهداف miRNA

جفت شدگی ظاهری بین miRNA و هدف آن، برای تجزیه و تحلیل‌های کامپیوتری یک مزیت محسوب می‌شود اما از آن‌جا که miRNA ها حدود ۲۰-۲۳ نوکلئوتید اندازه دارد و روش‌های آماری احتیاج به توالی‌های بلندتری دارد، الگوریتم‌های مرسوم بررسی جفت شدگی، قادر به امتیازبندی و رده‌بندی این جفت شدگی‌های محتمل نیست. همچنین در محل جایگاه‌های شناسایی ذکر شده که MRE (Recognition Element) نامیده می‌شود، علاوه بر جفت شدگی‌ها و انطباق کامل توالی‌های miRNA و mRNA هدف، برخی بازها جفت شده نیست و این موضوع روش‌های تجزیه و تحلیل استاندارد بررسی جفت شدگی را سخت می‌کند [۴۸]. این موضوع که حدود ۶ نوکلئوتید ناحیه سید در انطباق کامل با توالی mRNA هدف است به‌عنوان کلید اصلی تعیین جایگاه‌های اتصال در نظر گرفته می‌شود [۶۳].

اغلب miRNA ها در تنظیم بیان ژن‌های هدف نقش دارد. گاهی نیز مثل عامل‌های رونویسی به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی (Master Regulator)، بیان شبکه‌ای از ژن‌های مرتبط با هم را تنظیم می‌کند. هویت رونوشت‌های هدف miRNA به

روش‌های تجربی تعیین می‌شود. به این منظور، ابتدا نرم‌افزار توالی‌های مکمل توالی miRNA در نواحی مختلف mRNA ژن هدف به‌ویژه در انتهای 3'-UTR جستجو می‌کند. سپس از طریق جهش‌زایی در این نواحی بالقوه، میانکشی miRNA-mRNA تأیید می‌شود.

دو رشته‌ای حاصل از جفت شدن miRNA و توالی هدفشان سه نوع عمده است: در نوع اول، جفت شدگی کاملی در هر دو انتهای 3' و miRNA 5' مشاهده می‌شود با این خصوصیت که یک برآمدگی در وسط آن وجود دارد. در نوع دوم، جفت شدگی خوبی در ناحیه سید در miRNA 5' وجود دارد و جفت شدگی ضعیفی در ناحیه 3' آن وجود دارد. در نوع سوم، یک عدم انطباق یا حباب در ناحیه سید 5' وجود دارد اما جفت شدگی خوبی در انتهای 3' آن وجود دارد. نرم‌افزارهای پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA ها از ویژگی‌هایی شامل ترمودینامیک، ساختار جایگاه اتصال و حفظ شدگی MRE استفاده می‌کند. الگوریتم‌های زیادی برای پیش‌بینی ژن‌های هدف miRNA طراحی شده است [۶۴]. ویژگی برخی از نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده ژن‌های هدف miRNA در جدول ۲ آمده است. برخی از نرم‌افزارهای پیش‌بینی ژن‌های هدف عبارتند از:

جدول ۲ ویژگی نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده ژن‌های هدف miRNA

ردیف	نام نرم‌افزار	الگوریتم	معیار بررسی	زمان ارایه	URL
۱	Miranda	rule-based	جفت شدگی بین miRNA و MRE، کم‌ترین انرژی آزاد حاصل از دو رگه شدن دو RNA	۲۰۰۳	نرم‌افزار
۲	target scan/target scans	rule-based	حفاظت شدگی ناحیه سید miRNA و MRE، فراوانی MREها	۲۰۰۵	http://www.targetscan.org
۳	Pictar	HMM	همردیفی miRNA با ناحیه 3' UTR ژن‌های هدف	۲۰۰۷	http://www.pictar.org
۴	Diana-microt	-	حفاظت شدگی، تعداد MRE، کم‌ترین انرژی آزاد حاصل از دو رگه شدن دو RNA، شناسایی شدن با سایر نرم‌فزارها	۲۰۰۹	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT
۵	RNA hybrid	-	کم‌ترین انرژی آزاد حاصل از دو رگه شدن دو RNA	۲۰۰۴	http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid
۶	miRWalk	miRWalk	میزان جفت شدگی بین miRNA و MRE، میزان شناسایی شدن MREها توسط سایر سرورها	۲۰۱۱	http://mirwalk.uni-hd.de/

Miranda –

در این روش که ابتدا برای پیش‌بینی اهداف miRNA هادر ژنوم مگس سرکه استفاده شد، وجود MREهایی با جفت شدگی قوی در 3'UTR ژن‌ها مورد نظر بود. از نظر این نرم‌افزار، چون توالی سید در قسمت 5' miRNA قرار دارد جفت شدگی بازها در این ناحیه امتیاز بیشتری نسبت به جفت شدگی بازها در سایر نقاط miRNA دارد. سپس این جفت شدگی‌ها از لحاظ ترمودینامیکی بررسی می‌شود. میزان موارد مثبت کاذب پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار حدوداً بین ۲۴ تا ۳۹ درصد تقریب زده شده است ولی اگر چندین جایگاه شناسایی در یک ژن مشاهده شود این میزان کاهش پیدا می‌کند [۶۵-۶۷]. در این نرم‌افزار از دو فایل مجزا به‌عنوان داده ورودی استفاده می‌شود که یکی برای توالی miRNAها و دیگری برای توالی ژن‌های هدف با فرمت FASTA است. این سرور پیش‌بینی ژن‌های هدف را در انسان، موش و رت انجام می‌دهد [۶۸].

Target Scan/Target Scans –

در سایر روش‌های پیش‌بینی MREها در ژن‌های هدف، ابتدا جفت شدگی احتمالی تمام قسمت‌های miRNA استفاده می‌شود و سپس با استفاده از معیارهای دیگر، مثبت‌های کاذب فیلتر می‌شود ولی در روش Target Scan ابتدا جفت شدگی کامل برای ناحیه سید جستجو و سپس به نواحی اطراف بسط داده می‌شود. به این ترتیب بسیاری از پاسخ‌های مثبت کاذب از همان ابتدا فیلتر می‌شود. Target Scan اولین نرم‌افزاری بود که برای پیش‌بینی اهداف miRNAهای انسانی به‌کار گرفته شد. در این نرم‌افزار از ژنوم موش، موش صحرایی و ماهی برای بررسی حفظ شدگی استفاده می‌شود. میزان مثبت کاذب در این نرم‌افزار حدود ۲۲ تا ۳۱ درصد در نظر گرفته شده است. جفت شدگی miRNA در اینجا محدود به ۶ نوکلئوتید ناحیه سید و سپس انطباق ناحیه 3' و اولین نوکلئوتید آدنین است. البته به‌خاطر جفت شدگی قوی مورد نیاز در ناحیه سید، هدف‌هایی که دارای حفاظت شدگی ضعیف است یا دارای یک حباب در ناحیه جفت شدگی باشد از دست می‌رود [۱۹، ۴۹].

کشف microRNAهای انسانی

انجام شده توسط این سرور به صورت یک ارتباط اینترنتی به ایمیل کاربر ارسال می شود که حاوی اطلاعات جامعی در رابطه با میانکشی بین miRNA مورد نظر و ژن های هدف پیش بینی شده آن است. این سرور پیش بینی ژن های هدف را در انسان انجام می دهد.

RNA hybrid

این نرم افزار نیز نواحی از 3'UTR که قابلیت ایجاد دو رشته های ترمودینامیکی مساعد را دارد، مشخص می کند [۱۹]، [۶۷]. و برای پیش بینی جایگاه های اتصال بهتر، ترمودینامیک را به عنوان شاخص اولیه در نظر می گیرد. با استفاده از این سرور امکان پیش بینی ژن های هدف miRNA برای همه موجودات وجود دارد.

Mirwalk -

این نرم افزار طولی ترین جفت شدگی های ممکن را بین توالی ژن و miRNA کاندیدا مشخص می کند. ابتدا جفت شدگی بین ناحیه سید miRNA را با کل توالی ژنوم و توالی میتوکندریایی بررسی و نواحی اتصال ممکن را براساس بلندترین جفت شدگی انتخاب می کند. سپس نواحی پیدا شده را براساس این که پروموتور 5'UTR یا CDS یا 3'UTR باشد بررسی بیشتر می کند. این نرم افزار همچنین نتایج به دست آمده را با هشت نرم افزار دیگر شامل PITA، Pictar، miRDB، Miranda، Diana-microt، RNAHybrid و Targetscan مقایسه می کند و نتایج به صورت یک جدول به نمایش گذاشته می شود [۱۹]، [۶۹] به طور کلی می توان گفت روش هایی که مبنای عمل آنها ترکیبی از الگوریتم های مختلف است، دید دقیق تری را در مورد احتمال هدف بودن ناحیه مورد مطالعه در اختیار ما قرار می دهد. این سرور پیش بینی ژن های هدف را در انسان، موش و رت انجام می دهد.

این سرور پیش بینی ژن های هدف را در پستانداران، حشرات و نماتد انجام می دهد.

Pictar -

این الگوریتم یک گروه از اورتولوگ های 3'UTR از گونه های مختلف را به عنوان داده ورودی استفاده و آن هایی را انتخاب می کند که جفت شدگی ناحیه سید با miRNA را نشان دهند. سپس نتایج را از لحاظ ترمودینامیکی فیلتر و بر اساس روش HMM (High Marcov Model)، امتیازبندی می کند. Pictar اولین نرم افزاری بود که از ویژگی هم بیانی زمانی و مکانی miRNA و هدف آن استفاده نمود [۱۹]، [۶۶]، [۶۷]. این سرور به سایر سرور هایی که پیش بینی هدف miRNA را برای موجودات دیگر [مثلاً دروزوفیلا (Drosophila)] انجام می دهند ارتباط دارد. این سرور پیش بینی ژن های هدف را در مهره داران، حشرات و نماتد انجام می دهد.

Diana-microt -

این سرور که در سال ۲۰۰۴ با ترکیب رویکردهای تجربی و بیوانفورماتیکی طراحی شده است، از ترمودینامیک به عنوان شاخص اولیه پیش بینی جایگاه های اتصال استفاده می کند. در این سرور از پنجره های ۳۸ نوکلئوتیدی در توالی 3'UTR استفاده می شود و با مقایسه انرژی آزاد نواحی کاندیدای جفت شدگی، ژن های هدف احتمالی را پیش بینی می کند [۱۹]، [۶۶]، [۶۷]. مزیت این سرور به سایر سرورها و نرم افزار های پیش بینی کننده ژن های هدف این است که امکان پیش بینی ژن های هدف حتی برای miRNA هایی که در پایگاه داده های miRBase ثبت نشده است نیز وجود دارد در صورتی که سایر نرم افزارها و سرورها به طور اتوماتیک فقط از داده های موجود در پایگاه های اطلاعاتی استفاده می کنند. نتیجه بررسی

منابع

- [1] Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL. Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* 2009; 23(13): 1494-504.
- [2] ENCODE Project Consortium, Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Kamani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetric D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermüller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korb J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammana H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Caminci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaöz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Löytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Sereinghaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA; NISC Comparative Sequencing Program; Baylor College of Medicine Human Genome Sequencing Center; Washington University Genome Sequencing Center; Broad Institute; Children's Hospital Oakland Research Institute, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameer A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Shahab A, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley MJ, Inman D,

- Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Zhang X, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Ruan Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyraas E, Hallgrímsdóttir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007; 447(7146): 799-816.
- [3] Washietl S, Pedersen JS, Korbelt JO, Stocsits C, Gruber AR, Hackermüller J, Hertel J, Lindemeyer M, Reiche K, Tanzer A, Ucla C, Wyss C, Antonarakis SE, Denoeud F, Lagarde J, Drenkow J, Kapranov P, Gingeras TR, Guigó R, Snyder M, Gerstein MB, Reymond A, Hofacker IL, Stadler PF. Structured RNAs in the ENCODE selected regions of the human genome. *Genome Res* 2007; 17: 852-64.
- [4] Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14(10A): 1902-10.
- [5] Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 2009; 136(4): 642-55.
- [6] Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16(6): 861-5.
- [7] Ekhteraei-Tousi S, Mohammad-Soltani B, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Parsi S, Soleimani M. Inhibitory effect of hsa-miR-590-5p on cardiosphere-derived stem cells differentiation through downregulation of TGFB signaling. *J Cell Biochem* 2015; 116(1): 179-91.
- [8] Azinzadeh Jamalkandi S, Masoudi-Nejad A. RNAi pathway integration in *Caenorhabditis elegans* development. *Funct Integr Genomics* 2011; 11(3): 389-405.
- [9] Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- [10] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, Richardson JA, Olson EN. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(48): 18255-60.
- [11] Slack FJ, Basson M, Liu Z, Ambros V, Horvitz

- HR, Ruvkun G. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*. 2000 Apr;5(4):659-69.
- [12] Vella MC, Slack FJ. *C. elegans* microRNAs. WormBook, ed. The *C. elegans* Research Community, WormBook, 2005; Available at: <http://www.wormbook.org>.
- [13] Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, Hayward DC, Ball EE, Degnan B, Müller P, Spring J, Srinivasan A, Fishman M, Finnerty J, Corbo J, Levine M, Leahy P, Davidson E, Ruvkun G. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408(6808): 86-9.
- [14] Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell* 2000; 101(1): 25-33.
- [15] Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, Parrish S, Ha I, Baillie DL, Fire A, Ruvkun G, Mello CC. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* 2001; 106(1): 23-34.
- [16] Lund E, Güttinger S, Calado A, Dahlberg JE, Kutay U. Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 2004; 303(5654): 95-8.
- [17] Ekhteraei Tousi S, Mohammad Soltani B, Sadeghizadeh M, Hoseini S, Soleimani M. Hsa-miR-133b expression profile during cardiac progenitor cell differentiation and its inhibitory effect on *srf* expression. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology* 2013; 16(1): 1-9.
- [18] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; 466(7308): 835-40.
- [19] Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(16): 6845-53.
- [20] Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 2010; 79: 351-79.
- [21] Lu M, Zhang Q, Deng M, Miao J, Guo Y, Gao W, Cui Q. An analysis of human microRNA and disease associations. *PLoS One* 2008; 3(10): e3420.
- [22] Creighton CJ, Reid JG, Gunaratne PH. Expression profiling of microRNAs by deep sequencing. *Brief Bioinform* 2009; 10(5): 490-7.
- [23] Dokanehiifard S, Soltani BM, Parsi S, Hosseini F, Javan M, Mowla SJ. Experimental verification of a conserved intronic microRNA located in the human *TrKC* gene with a cell type-dependent apoptotic function. *Cellular and Molecular life Science* 2015.
- [24] Lu C, Meyers BC, Green PJ. Construction of small RNA cDNA libraries for deep sequencing. *Methods* 2007; 43(2): 110-7.
- [25] Eiring AM, Harb JG, Neviani P, Garton C, Oaks JJ, Spizzo R, Liu S, Schwind S, Santhanam R, Hickey CJ, Becker H, Chandler JC, Andino R, Cortes J, Hokland P, Huettner CS, Bhatia R, Roy DC, Liebhaber SA, Caligiuri MA, Marcucci G, Garzon R, Croce

- CM, Calin GA, Perrotti D. miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell* 2010; 140(5): 652-65.
- [26] Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 2004; 64(11): 3753-6.
- [27] Ghanbari R, Mosakhani N, Asadi J, Nouraei N, Mowla SJ, Poustchi H, Malekzadeh R, Knuutila S. Decreased expression of fecal miR-4478 and miR-1295b-3p in early-stage colorectal cancer. *Cancer Biomark* 2015; 15(2): 195-201.
- [28] Johnson SM, Grosshans H, Shingara J, Byrom M, Jarvis R, Cheng A, Labourier E, Reinert KL, Brown D, Slack FJ. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* 2005; 120(5): 635-47.
- [29] Khalili M, Sadeghizadeh M, Ghorbanian K, Malekzadeh R, Vasei M, Mowla SJ. Down-regulation of miR-302b, an ESC-specific microRNA, in Gastric Adenocarcinoma. *Cell J* 2012; 13(4): 251-8.
- [30] He L, Thomson JM, Hemann MT, Hemando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435(7043): 828-33.
- [31] Almeida MI, Reis RM, Calin GA. MicroRNA history: discovery, recent applications, and next frontiers. *Mutat Res* 2011; 717(1-2): 1-8.
- [32] O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435(7043): 839-43.
- [33] Ma R, Jiang T, Kang X. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res* 2012; 31: 38.
- [34] Turchinovich A, Samatov TR, Tonevitsky AG, Burwinkel B. Circulating miRNAs: cell-cell communication function?. *Front Genet* 2013; 4: 119.
- [35] Turchinovich A, Weiz L, Burwinkel B. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem Sci* 2012; 37(11): 460-5.
- [36] Liu X, Fortin K, Mourelatos Z. MicroRNAs: biogenesis and molecular functions. *Brain Pathol* 2008; 18(1): 113-21.
- [37] Olena AF, Patton JG. Genomic organization of microRNAs. *J Cell Physiol* 2010; 222(3): 540-5.
- [38] Okamura K, Hagen JW, Duan H, Tyler DM, Lai EC. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* 2007; 130(1): 89-100.
- [39] Altuvia Y, Landgraf P, Lithwick G, Elefant N, Pfeffer S, Aravin A, Brownstein MJ, Tuschl T, Margalit H. Clustering and conservation patterns of human microRNAs. *Nucleic Acids Res* 2005; 33(8): 2697-706.
- [40] Jiang P, Wu H, Wang W, Ma W, Sun X, Lu Z. MiPred: classification of real and pseudo microRNA precursors using random forest prediction model with combined features. *Nucleic Acids Res* 2007; 35(Web Server issue): W339-44.
- [41] Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A,

- Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev* 2002; 16(6): 720-8.
- [42] Berezikov E, Cuppen E, Plasterk RH. Approaches to microRNA discovery. *Nat Genet* 2006; 38 Suppl: S2-7.
- [43] Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8): 2419-33.
- [44] 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.
- [45] Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294(5543): 853-8.
- [46] Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaillé J. A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res* 2004; 14(9): 1741-8.
- [47] Nelson PT, Baldwin DA, Searce LM, Oberholtzer JC, Tobias JW, Mourelatos Z. Microarray-based, high-throughput gene expression profiling of microRNAs. *Nat Methods* 2004; 1(2): 155-61.
- [48] Brennecke J, Stark A, Russell RB, Cohen SM. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol* 2005; 3(3): e85.
- [49] Kuhn DE, Martin MM, Feldman DS, Terry Jr AV, Nuovo GJ, Elton TS. Experimental validation of miRNA targets. *Methods* 2008; 44(1): 47-54.
- [50] Khan AA, Betel D, Miller ML, Sander C, Leslie CS, Marks DS. Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat Biotechnol* 2009; 27(6): 549-55.
- [51] Le Brigand K, Robbe-Sermesant K, Mari B, Barbry P. MiRonTop: mining microRNAs targets across large scale gene expression studies. *Bioinformatics* 2010; 26(24): 3131-2.
- [52] Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P, Rothballer A, Ascano M Jr, Jungkamp AC, Munschauer M, Ulrich A, Wardle GS, Dewell S, Zavolan M, Tuschl T. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell* 2010; 141(1): 129-41.
- [53] 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 Res* 2009; 37(10): 3276-87.
- [54] 54-. Lim LP, Glasner ME, Yekta S, Burge CB, Bartel DP. Vertebrate microRNA genes. *Science* 2003; 299(5612): 1540.
- [55] Lai EC, Tomancak P, Williams RW, Rubin GM. Computational identification of Drosophila microRNA genes. *Genome Biol* 2003; 4(7): R42.
- [56] Jones-Rhoades MW, Bartel DP. Computational identification of plant microRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Mol Cell* 2004; 14(6): 787-99.
- [57] Bonnet E, Wuyts J, Rouzé P, Van de Peer Y.

- Detection of 91 potential conserved plant microRNAs in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* identifies important target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101(31): 11511-6.
- [58] Bentwich I. Prediction and validation of microRNAs and their targets. *FEBS Lett* 2005; 579(26): 5904-10.
- [59] Sadeghi B, Ahmadi H, Azimzadeh-Jamalkandi S, Nassiri MR, Masoudi-Nejad A. BosFinder: a novel pre-microRNA gene prediction algorithm in *Bos taurus*. *Anim Genet* 2014; 45(4): 479-84.
- [60] Ritchie W, Théodule FX, Gautheret D. Mireval: a web tool for simple microRNA prediction in genome sequences. *Bioinformatics* 2008; 24(11): 1394-6.
- [61] Helvik SA, Snøve O Jr, Saetrom P. Reliable prediction of Drosha processing sites improves microRNA gene prediction. *Bioinformatics* 2007; 23(2): 142-9.
- [62] Tyagi S, Vaz C, Gupta V, Bhatia R, Maheshwari S, Srinivasan A, Bhattacharya A. CID-miRNA: a web server for prediction of novel miRNA precursors in human genome. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 372(4): 831-4.
- [63] 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.
- [64] Ahmadi H, Ahmadi A, Azimzadeh-Jamalkandi S, Shoorehdeli MA, Salehzadeh-Yazdi A, Bidkhor G, Masoudi-Nejad A. HomoTarget: a new algorithm for prediction of microRNA targets in *Homo sapiens*. *Genomics* 2013; 101(2): 94-100.
- [65] Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA* 2004; 10(12): 1957-66.
- [66] Grimson A, Farh KK, Johnston WK, Garrett-Engele P, Lim LP, Bartel DP. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell* 2007; 27(1): 91-105.
- [67] Mazière P, Enright AJ. Prediction of microRNA targets. *Drug Discov Today* 2007; 12(11-12): 452-8.
- [68] Enright AJ, John B, Gaul U, Tuschl T, Sander C, Marks DS. MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol* 2003; 5(1): R1.
- [69] Dweep H, Sticht C, Pandey P, Gretz N. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. *J Biomed Inform* 2011; 44(5): 839-47.
- [70] Thirion M, Ochiya T. Roles of microRNAs in the hepatitis B virus infection and related diseases. *Viruses* 2013; 5(11): 2690-703.
- [71] Raymond CK, Roberts BS, Garrett-Engele P, Lim LP, Johnson JM. Simple, quantitative primer-extension PCR assay for direct monitoring of microRNAs and short-interfering RNAs. *RNA* 2005; 11(11): 1737-44.