مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی
مرکز تحقیقات انفورماتیک پزشکی
دوره دوم شماره چهارم. ص ۲۱۸-۲۱۱، ۱۳۹٤

مقاله پژوهشی

توانایی اولیگونوکلئوتیدهای ضد ژن RpoD در باکتری استافیلوکوک اورئوس در مهار ژن‌های انسانی: یک مطالعه بیوانفورماتیک

سیمین شریعت احمدی[۱]، سید مهدی کلانتر[۲]، سیدحسین حکمتی مقدم[۳]، هنگامه زندی[٤]، علی جبالی[۵]*

• دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۶ • پذیرش مقاله: ۹۴/۱۲/۱

مقدمه: یکی از روش‌های جدید کنترل عفونت‌های میکروبی استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس (مکمل) برای مهار ژن‌های ضروری است. هدف این مطالعه بررسی ۴ توالی مکمل علیه ژن rpoD استافیلوکوکوس اورئوس و پی بردن به تطابق احتمالی در ژن‌های انسانی بود.
روش: نخست به بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (NCBI) مراجعه و ژن rpoD در استافیلوکوکوک اورئوس از آن استخراج و سپس توالی mRNA آن تولید گردید. سپس با توجه به ساختار ثانویه توالی mRNA و بر طبق معیارهای ترمودینامیک ۴ توالی مکمل mRNA انتخاب گردید. در نهایت تطابق توالی‌های مکمل انتخابی به صورت تک‌تک با تمامی ژن‌های انسانی با الگوریتم BlastN مورد بررسی قرار گرفت.
نتایج: این تحقیق نشان داد که از نظر ساختار ثانویه و پارامترهای ترمودینامیک توالی مکمل شماره یک، GAAGAAGTTGGTA، بهترین آنتی‌سنس بود و پایین‌ترین Overall ΔG را داشت. تطابق توالی‌های مکمل نشان داد که آنتی‌سنس شماره‌های ۱ و ۲ و ۴ اهداف زیادی در سطح mRNAهای انسانی داشته، اما آنتی‌سنس شماره ۳ با توالی GAAGCAATTAATT بسیار ایده‌آل بوده و تنها می تواند ژن rpoD را هدف قرار دهد.
نتیجه‌گیری: با در نظر گرفتن ساختار ثانویه و پارامترهای ترمودینامیک می‌توان توالی‌های آنتی سنس مناسب برای ژن هدف انتخاب کرد، ولی اکثر این آنتی سنس‌ها می‌توانند اهداف دیگری نیز در سطح سلول‌های انسانی داشته باشند.

کلیدواژه‌ها: اولیگونوکلئوتید، استافیلوکوک اورئوس، ژن، ساختار ثانویه، ژن انسانی

• **ارجاع:** شریعت احمدی سیمین، کلانتر سیدمهدی، حکمتی مقدم سید حسین، زندی هنگامه، جبالی علی. توانایی اولیگونوکلئوتیدهای ضد ژن RpoD در باکتری استافیلوکوک اورئوس در مهار ژن‌های انسانی. مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۴؛ ۲(۴): ۲۱۸-۲۱۱.

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی، گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۲. دکتری تخصصی ژنتیک پزشکی، استاد گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۳. دکتری حرفه‌ای پاتولوژی، دانشیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۴. دکتری تخصصی میکروبیولوژی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
۵. دکتری تخصصی نانو فناوری پزشکی، استادیار گروه علوم و فناوری‌های نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی، یزد، ایران.
* **نویسنده مسؤول:** یزد، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، دانشکده پیراپزشکی، گروه علوم و فناوری‌های نوین پزشکی.
• **شماره تماس:** ۰۳۵۳۳۷۲۵۶۴۵۸ • **Email:** alijebal2011@gmail.com

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

مقدمه

استافیلوکوکوس اورئوس (Staphylococcus Aureus) یک پاتوژن فرصت طلب و یکی از عوامل ایجاد کننده عفونت‌های بیمارستانی است. این پاتوژن بسیار مهاجم بوده و طیف وسیعی از بیماری‌ها مانند: عفونت‌های سیستم عصبی، اندوکاردیتیس، استئومیلیت، پنومونیا، عفونت های مسیر ادراری و عفونت‌های مزمن ریوی را باعث می‌شود [۱]. در گذشته این عفونت‌ها به طور گسترده در بیمارستان‌ها و افرادی که دارای عوامل خطر ساز بودند ایجاد می‌شد، در حالی که اخیراً هشدارهایی در رابطه با همه‌گیری، به وسیله انواع گونه‌ها ایجاد گردیده است که می‌تواند باعث عفونت‌های شدید، و یا حتی مرگ شود [۲]. مقاومت اکتسابی و متداول استافیلوکوک اورئوس به بیشتر آنتی‌بیوتیک‌ها مانند پنی‌سیلین، ماکرولیدها، آمینوگلوکوزیدها و تتراسایکلین باعث شده که درمان و کنترل این باکتری بسیار دشوار باشد. این در حالی است که استفاده گسترده از متی‌سیلین و دیگر پنی‌سیلین ها منجر به پیدایش سویه‌های مقاوم شده است [۳]. در چند سال گذشته شیوع عفونت‌های (Methicillin-resistant Staphylococcus aureus) MRSA در ایران و جهان افزایش یافته و این پدیده، نگرانی عمومی برای سلامت جامعه جهانی را به دنبال داشته است، که در نهایت منجر به ایجاد روش‌های جدید برای کنترل و درمان بیماری‌ها گردیده است [۴]. امروزه روشی که بتواند درمان مؤثر و به موقع علیه عفونت‌های MRSA ایجاد کند، یک نیاز ضروری است. یکی از این روش ها، استفاده از اولیگونوکلئوتیدهای آنتی سنس جهت مهار بیان ژن های حیاتی در سطح ژنتیکی است. آنتی سنس ها توالی‌های اولیگونوکلئوتیدی کوتاه تک رشته‌ای ، با طول ۲۵-۱۳ باز هستند که به مکمل خود بر روی مولکول mRNA متصل شده و از ترجمه آن جلوگیری می‌کنند [۵]. نخستین بار در سال ۱۹۹۱ این آنتی‌سنس‌ها برای مهار ترجمه RNA باکتریایی به کار برده شدند و با حصول نتایج مؤثر اولیه، تلاش‌ها برای بهبودی این روش تا به دست آوردن اعتبار و کارایی لازم ادامه یافته است [۶]. نکته اساسی در طراحی آنتی سنس آنتی باکتریالی، مشخص کردن ژن‌های اصلی دخیل در تنظیم و کنترل رشد و تکثیر، سنتز مواد ضروری حیات و بیماری‌زای باکتری است. مبنای سنجش کیفیت ژن کاندید، اهمیت آن و دسترس بودنش برای اولیگونوکلئوتیدهای آنتی‌سنس است [۷]. یکی از ژن‌های ضروری در باکتری استافیلوکوک اورئوس، ژن rpoD است. این ژن δ^{70} (زیر واحد تنظیمی عملکرد آنزیم RNA پلیمراز) را کد می‌کند [۸]. روش آنتی سنس در مقایسه با روش ناک اوت برای ارزیابی عملکرد ژن‌های باکتریایی مؤثرتر است [۷]. به این صورت که کاربرد روش آنتی سنس می تواند تا حد زیادی خصوصیات و رفتارهای بیولوژیکی گونه های بیماری زا را تغییر بدهد. با این حال برای عملکرد مؤثرتر آنتی‌سنس، بهینه سازی غلظت آنتی سنس، توانایی تشکیل داپلکس RNA/ODN و داشتن ثبات بیولوژیکی کافی نیاز است. آنتی‌سنس به ناحیه مکمل و خاصی از mRNA هدف متصل می‌شود و یک هترو داپلکس پایدار تشکیل می‌دهد [۹]. به منظور به دست آوردن توالی آنتی سنس با اثر بخشی بالا می توان با کمک نرم افزارهای بیوانفورماتیک ساختار ثانویه mRNA را به دست آورد و مناطقی که فاقد ساختارهای دو رشته‌ای هستند، انتخاب می شوند، سپس با بررسی ویژگی های ترمودینامیکی، مناسب‌ترین و مؤثرترین توالی آنتی سنس تعیین می‌گردد [۱۰]. نکته مهم آن که توالی آنتی سنس انتخابی شاید برای ژن مورد نظر ایده‌آل باشد، ولی احتمالاً بتواند در ابعاد مولکولی اهداف دیگری به غیر از ژن اصلی را نیز بشناسد و این نکته بسیار خطرناک است [۱۲، ۱۱]. هدف از این مطالعه طراحی چند توالی مکمل علیه mRNA ژن rpoD استافیلوکوکوس اورئوس بود. همچنین هدف دیگر این مطالعه بررسی تطابق توالی‌های مکمل انتخابی با ژن‌های انسانی بود.

روش

این پژوهش یک مطالعه بیوانفورماتیک است که مراحل جستجوی آن به صورت زیر می‌باشد:

۱-۱- جستجوی ژن rpoD در بانک‌های اطلاعاتی و تبدیل آن به mRNA

نخست به بانک اطلاعاتی مرکز ملی اطلاعات بیوتکنولوژی (National Center for Biotechnology Information) NCBI رجوع و توالی mRNA و ژن rpoD در استافیلوکوکوک اورئوس از آن استخراج گردید. همچنین توالی ژن مورد نظر به صورت FASTA گرفته شد و در نرم‌افزار آنلاین DNA reverse and complementary generator www.bugaco.com/calculators/dna_reverse_complement.php توالی mRNA آن تولید گردید.

۱-۲- تعیین ساختار ثانویه mRNA rpoD و انتخاب آنتی سنس

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

توالی mRNA که در مرحله قبل ایجاد گردیده بود، به سه نرم افزارهای آنلاین جهت پیشگویی ساختار ثانویه داده شد. این نرم افزارها شامل RNA Structure، RNA fold و mfold بودند. در پایان ۴ توالی مکمل برای هدف گیری این ژن انتخاب گردید. معیار انتخاب توالی‌های مکمل نواحی عاری از پیوند هیدروژنی و انطباق آن‌ها با پارامترهای ترمودینامیکی چون ΔGهای Overall، Duplex، oligo-self، oligo-oligo بود. لازم به ذکر است طول توالی‌های مکمل، نوع آن، غلظت و طول توالی مورد بررسی قابل تغییر می‌باشد [۱۳].

۱-۳- بلاست آنتی سنس‌های انتخابی با ژن‌های انسانی در نهایت تطابق توالی‌های مکمل انتخابی به صورت تک‌تک با تمامی ژن‌های انسانی با الگوریتم BlastN مورد بررسی قرار گرفت و میزان انطباق توالی مکمل با ژن‌های انسانی تعیین گردید. پارامترهای مورد بررسی میزان تشابه، هم پوشانی، E value، نمره کل و نمره حداکثر بودند. این بررسی به منظور یافتن اهدافی به غیر از ژن rpoD استافیلوکوکوک اورئوس توسط آنتی سنس‌های انتخابی بود.

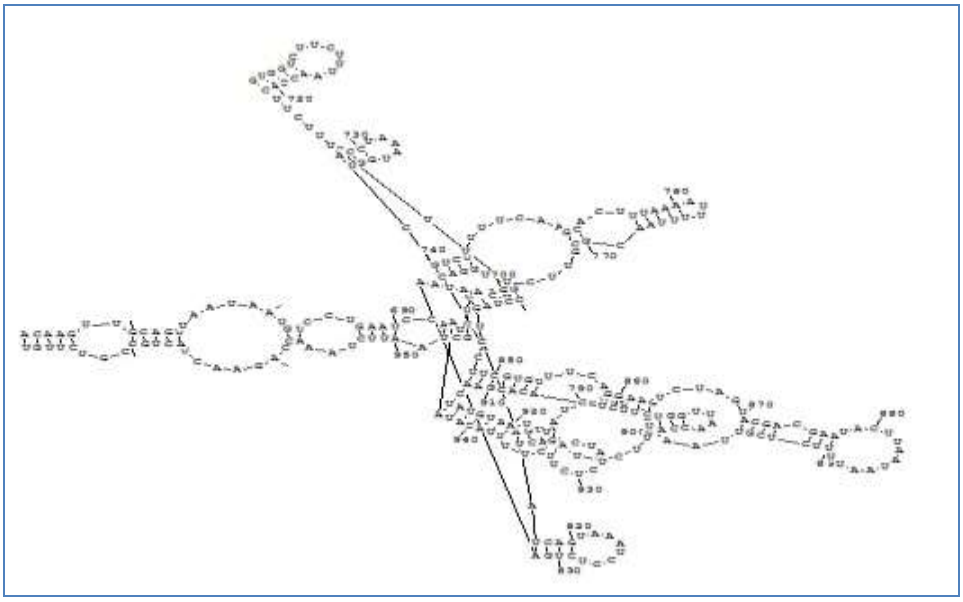
نتایج

۲-۱- تعیین توالی‌های مکمل

شکل ۱ ساختار ثانویه mRNA ژن rpoD را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد این ساختار دارای تعدادی نواحی فاقد پیوند هیدروژنی می‌باشد. شماره نوکلئوتیدهای موجود در هر ناحیه نیز بر روی شکل قابل مشاهده می‌باشد. جدول ۱ توالی های مکمل انتخابی و ویژگی‌های ترمودینامیکی آن‌ها را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌گردد توالی مکمل شماره یک با توالی GAAGAAGTTGGTA دارای بالاترین نمره نهایی بوده و همچنین پایین‌ترین Overall ΔG را به خود اختصاص داده است. این بدین معنی است که این توالی مکمل بهتر از بقیه می‌تواند نواحی عاری از پیوند هیدروژنی را شناسایی و mRNA ژن rpoD را سرکوب کند.

۲-۲- تعیین اهداف احتمالی توالی‌های مکمل

ممکن است توالی‌های مکمل انتخابی بتوانند اهدافی به غیر از ژن rpoD استافیلوکوکوک اورئوس را شناسایی کنند، لذا تطابق تک‌تک آن ها با ژن‌های انسانی مورد تحلیل قرار گرفت. جدول ۲ و ۳ و ۴ و ۵ به ترتیب نتایج بلاست آنتی سنس شماره ۱ و ۲ و ۳ و ۴ را نشان می‌دهد. نتایج بلاست نشان می‌دهد آنتی سنس شماره‌های ۱ و ۲ و ۴ دارای اهدافی زیادی در سطح mRNAهای انسانی بوده و از این نظر این آنتی سنس‌ها می توانند تعداد زیادی از ژن‌های انسانی را مهار کنند. اما آنتی سنس شماره ۳ بسیار ایده‌آل بوده و تنها توانست ژن rpoD استافیلوکوکوک اورئوس را هدف قرار دهد (جدول ۴). هیچ هدف ژنی به غیر از ژن rpoD بعد از بلاست به دست نیامد.



شکل۱: ساختار ثانویه توالی mRNA ژن rpoD

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

جدول ۱: نتایج حاصل از بررسی ویژگی‌های ترمودینامیکی توالی‌های انتخابی

توالی آنتی سنس	جایگاه هدف	نمره نهایی	پارامترها				
			Overall ΔG	Duplex ΔG	Oligo-self ΔG	Oligo-oligo ΔG	Tm
GAAGAAGTTGGTA	۹۸۸-۱۰۰۱	۹۹	-۱۷/۵	-۱۷/۹	۰	۰	۶۴/۴
GGTAATATGGGTC	۴۹۰-۵۰۳	۸۰	-۱۵/۲	-۲۰	۰	-۲/۴	۶۹/۷
GAAGCAATTAATT	۶۹-۸۲	۷۰	-۱۲/۳	-۱۲/۷	۰	-۳/۲	۵۱/۴
GTGCATATGGTAG	۶۲۸-۶۴۱	۶۵	-۱۵/۱	-۱۹/۶	-۰/۳	-۷/۴	۶۸

جدول ۲: نتایج حاصل از بلاست توالی آنتی سنس شماره یک

اهداف یافت شده	نمره حداکثر	نمره کلی	همپوشانی	E value	تشابه
RNA polymerase sigma factor RpoD [Staphylococcus aureus subsp. aureus, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens PDZ domain containing 7 (PDZD7), transcript variant X2, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens PDZ domain containing 7 (PDZD7), transcript variant X1, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog, transcript variant X4, misc_RNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog, transcript variant X3, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog, transcript variant X2, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens UPF2 regulator of nonsense transcripts homolog, transcript variant X1, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC105375774 (LOC105375774), ncRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X7, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X6, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X5, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X4, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X3, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
PREDICTED: Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X2, misc_RNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
PREDICTED: Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant X1, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
PREDICTED: Homo sapiens uncharacterized LOC105375774 (LOC105375774), ncRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens iduronidase, alpha-L- (IDUA), transcript variant 2, non-coding RNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰

جدول ۳: نتایج حاصل از بلاست توالی آنتی سنس شماره ۲

اهداف یافت شده	نمره حداکثر	نمره کلی	همپوشانی	E value	تشابه
RNA polymerase sigma factor RpoD [Staphylococcus aureus subsp. aureus, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens myotubularin related protein 4 (MTMR4), transcript variant X5, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens myotubularin related protein 4 (MTMR4), transcript variant X4, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens myotubularin related protein 4 (MTMR4), transcript variant X3, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens myotubularin related protein 4 (MTMR4), transcript variant X2, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens myotubularin related protein 4 (MTMR4), transcript variant X1, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC102724328, transcript variant X2, ncRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC102724328, transcript variant X1, ncRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC105370610, transcript variant X3, ncRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC105370610, transcript variant X2, ncRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant X16, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant X15, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant X14, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant X13, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens numb homolog (Drosophila) (NUMB), transcript variant X12, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰

جدول ۴: نتایج حاصل از بلاست توالی آنتی سنس شماره ۳

اهداف یافت شده	نمره حداکثر	نمره کلی	همپوشانی	E value	تشابه
RNA polymerase sigma factor RpoD [Staphylococcus aureus subsp. aureus, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

جدول ۵: نتایج حاصل از بلاست توالی آنتی سنس شماره ۴

اهداف یافت شده	نمره حداکثر	نمره کلی	همپوشانی	E value	تشابه
RNA polymerase sigma factor RpoD [Staphylococcus aureus subsp. aureus, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens collagen alpha-2(IV) chain-like (LOC105379575), mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (DDR2), transcript variant X3, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (DDR2), transcript variant X2, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens discoidin domain receptor tyrosine kinase 2 (DDR2), transcript variant X1, mRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens uncharacterized LOC105373357 (LOC105373357), ncRNA	۲۶/۳	۲۶/۳	٪۱۰۰	۱۶۷	٪۱۰۰
Homo sapiens nucleoporin 98kDa (NUP98), transcript variant X11, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens nucleoporin 98kDa (NUP98), transcript variant X10, misc_RNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens nucleoporin 98kDa (NUP98), transcript variant X9, misc_RNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens nucleoporin 98kDa (NUP98), transcript variant X6, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰
Homo sapiens nucleoporin 98kDa (NUP98), transcript variant X4, mRNA	۲۴/۳	۲۴/۳	٪۹۲	۶۶۰	٪۱۰۰

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به گسترش میکرو ارگانیسم‌های مقاوم به انواع آنتی بیوتیک‌ها، از جمله استافیلوکوک اورئوس مقاوم به ونکومایسین، استافیلوکوک اورئوس مقاوم به متی‌سیلین، آنتروباکتریاسیه مقاوم به کارباپنم، مایکوباکتریوم مقاوم به چند دارو، بیماری‌های عفونی به عنوان یکی از علل اساسی مرگ و میر در سراسر جهان باقی مانده است. آنتی سنس تراپی به عنوان یک رویکرد جدید می‌تواند برای درمان مؤثر مورد استفاده قرار گیرد. آنتی سنس ها توالی های اولیگونوکلئوتیدی کوتاه تک رشته‌ای، با طول ۲۵-۱۳ باز هستند که به مکمل خود بر روی مولکول mRNA متصل شده و از ترجمه آن جلوگیری می‌کنند [۱۴]. آن‌ها با تشکیل هترو داپلکس-ASO mRNA از بیان ژن‌های خاص به وسیله مکانیسم‌هایی مانند شروع فعالیت آنزیم RNase H، اختلال در عملکرد ریبوزوم و توقف ترجمه و دخالت در مراحل پیرایش mRNA و ناپایداری PremRNA، جلوگیری می‌کنند [۱۵]. مولکول‌های RNA در فرآیندهای بیولوژیکال بسیاری از جمله کاتالیز ، پیرایش ، تنظیم ترجمه و رونویسی ، تعاملات بین RNA/DNA ، RNA/RNA، RNA/Protein نقش اساسی دارند [۱۰]. ساختار ثانویه مولکول‌های RNA به جزء tRNA در سیر تکامل، حفاظت شده‌ترین ساختار است. عملکرد مولکول‌های RNAبه وسیله ساختار آن‌ها تعیین می‌گردد، بنابراین تا خوردگی‌های ساختار ثانویه RNA نقش اساسی در شکل‌گیری ساختار سوم مولکول و فعل و انفعالات آن با سایر عناصر دارد [۱۶]. روش‌های مختلفی برای طراحی آنتی‌سنس‌ها وجود دارد از جملهOligonucleotide ،mRNA walking array،RNase mapping که این روش‌ها بسیار گران بوده و نیاز به تجهیزات آزمایشگاهی بسیاری دارد [۱۷]. به طوری که در بیشتر مطالعات انجام شده به منظور دستیابی به مؤثرترین توالی‌های آنتی‌سنس، از نرم‌افزارهای طراحی ساختار ثانویه استفاده می‌گردد. هسته الگوریتم پیش‌بینی این ساختارهای ثانویه براساس حداقل انرژی آزاد به دست آمده صورت می‌گیرد. شدت و ثبات واکنش بین ASO وmRNA هدف، به پارامترهایی مانند: ساختار ثانویه mRNA هدف، تخمین صحیح جایگاه هیبریداسیون، محاسبه میزان CG، Binding energyΔG وابسته است [۱۸]. یک ASO مؤثر باید برای مناطقی از mRNA طراحی شود که برای هیبریداسیون قابل دسترسی باشد. این ساختارها معمولاً در پایانه انتهایی، لوپ‌های داخلی، توالی‌های اتصالی، برآمدگی‌ها، ساختارهای سنجاق سری، واقع شده‌اند [۱۹]. همچنین میزان CG موجود در توالی آنتی‌سنس با ثبات ترمو دینامیکی هترودوپلکس ASO-mRNA در ارتباط است. به طوری که هر چه این میزان بیشتر باشد پایداری اتصال بیشتر خواهد بود. . برای اتصال مؤثر mRNA -ASO باید میزان $\Delta G_{37} \geq -8$ kcal/mol باشد، در حالی جهت جلوگیری از اتصال مؤثر میان دو توالی آنتی سنس باید $G37 \geq -1.1$ kcal/molΔ باشد. مطالعات انجام شده نشان داده است که این دو پارامتر سرعت برخورد را به میزان۳ تا ۶ برابر افزایش خواهد داد [۲۰]. در این مطالعه نخست ژن rpoD استافیلوکوکوس اورئوس از پایگاه NCBI استخراج و سپس بر اساس نرم‌افزارهای آنلاین تعدادی توالی مکمل مناسب انتخاب و در مرحله بعد برای پی بردن مهار احتمالی ژن‌های انسانی توسط این توالی‌ها هر یک به طور جداگانه بلاست گردید. در نرم افزار RNA Structure پیش‌بینی ساختارهای تک رشته‌ای RNA

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

یا DNA بر اساس الگوریتم Zuker برای به حداقل رساندن انرژی آزاد، صورت می‌گیرد. این برنامه توانایی پیش‌بینی ساختارهای مولکولی و بررسی میزان افینیتی اتصال توالی الیگونوکلئوتیدی به یک هدف، با ساختار RNA یا DNA را دارا می‌باشد. با رسم ساختار ثانویه mRNA ژن rpoD، نواحی تک رشته‌ای، فاقد پیوند هیدروژنی، به عنوان نواحی مطلوب انتخاب گردید. ΔG Overall بیان کننده ΔG خالص اتصال اولیگونوکلئوتید به هدف، همراه با در نظر گرفتن همه عوامل از جمله شکستن ساختار هدف و ساختار خود اولیگونوکلئوتید می‌باشد به نحوی که هر چه میزان OverallΔG منفی‌تر باشد نشان دهنده برقراری اتصال محکم بین توالی اولیگونوکلئوتید با هدف خواهد بود. Duplex ΔG نشان دهنده انرژی آزاد اتصال اولیگونوکلئوتید به نواحی غیر ساختاری است. پارامتر دیگر، محاسبه میزان Δ ΔΔΔΔΔΔ ΔΔΔG Oligo–self است که هر چه به صفر نزدیک‌تر باشد مطلوب‌ترخواهد بود به نحوی که در این حالت هیچ ساختار درون مولکولی پایداری تشکیل نخواهد شد. و مقادیر منفی آن جهت اتصال اولیگونوکلئوتید به هدف نامطلوب خواهد بود. پارامتر دیگر محاسبه مقدار Oligo-oligo ΔG می‌باشد که اگر مقدار آن منفی باشد نشان دهنده برقراری اتصال بین توالی‌های اولیگونوکلئوتید با یکدیگر و ایجاد یک داپلکس پایدار است که یک ویژگی نامطلوب است. Tm بیان کننده دمایی است که در آن نیمی از توالی‌های اولیگو به هدف متصل می‌شوند. در این مطالعه چهار توالی مکمل بر اساس ساختار ثانویه و پارامترهای ترمودینامیک مولکول mRNA ژن rpoD انتخاب گردید. این توالی‌ها در نواحی فاقد ساختار ثانویه مولکول mRNA واقع شده بودند. این مطالعه نشان داد که هر چند توالی مکمل شماره ۱ (GAAGAAGTTGGTA) بهترین آنتی سنس بود ولی نتایج بلاست هویدا ساخت که مکمل‌های شماره‌های ۱ و ۲ و ۴ دارای اهدافی زیادی در سطح mRNAهای انسانی بوده و از این نظر این مکمل‌ها می‌توانند تعداد زیادی از ژن‌های انسانی را مهار کنند. اما آنتی سنس شماره ۳ تنها توانست ژن rpoD استافیلوکوکوک اورئوس را هدف قرار دهد. در مطالعه Fei و همکاران، از نرم‌افزار RNA Structure 3.7 برای پیش بینی جایگاه‌های در دسترس VEGE mRNA استفاده گردید. این مطالعه با استفاده از اطلاعات ترمودینامیکی اولیگونوکلئوتیدی مؤثر گردید که پس از بررسی‌های اثرات نرم‌افزار، منجر به طراحی و سنتز آنتی سنس‌های آزمایشگاهی، باز دارندگی رشد و کاهش بیان پروتئینVEGF را به میزان قابل توجهی نشان داد. در این مطالعه ارتباط مستقیمی بین درصد بازدارندگی با میزانOverallΔG37یافت شد [۲۱]. در مطالعه جبالی و انوری از هیبریداسیون توالی‌های آنتی سنس بر روی سطح نانو ذرات طلا جهت خاموش سازی ژن GP63 در لیشمانیاز استفاده گردید . این توالی‌ها از نواحی کد کننده و غیر کد کننده ژن GP63 به دست آمد و یافته‌ها نشان دهنده این بود که علاوه بر توالی آنتی سنس‌ها، اندازه آن‌ها نیز در انتقال و خاموش سازی ژن نقش مؤثری دارد [۲۲]. Reuter و Mathews برنامه RNA structure را یکی از بهترین نرم‌افزارها برای پیشگویی ساختار ثانویه mRNA می‌داند.

همچنین ایشان اظهار می‌دارند که پارامترهای ترمودینامیک حاصل از این نرم افزار می‌تواند ما را در طراحی توالی‌های مکمل برای خاموش سازی اختصاصی یک ژن کمک کنند [۲۳]. Chan و همکاران نیز در مقاله خود اذعان می‌دارند که پارامترهای ترمودینامیک می‌تواند ما را در طراحی توالی‌های مکمل یاری رساند. همچنین آن‌ها اظهار می‌نماید که بررسی تطابق ژنی نیز یکی از راهکارهای اصلی برای جلوگیری از اتصال به ژن‌های دیگر است [۲۴]. Aartsma-Rus و همکاران نیز مطابق با مقاله حاضر به چگونگی طراحی توالی های مکمل پرداختند [۲۵]. از این تحقیق می‌توان نتیجه گرفت که با استفاده از پارامترهای ترمودینامیک و ساختار ثانویه مولکول mRNA می‌توان توالی‌های مکمل برای هدف قرار دادن ژن‌هایی خاص استفاده نمود. اما از آنجایی که اکثر این توالی‌های آنتی سنس‌ها می‌توانند اهداف دیگری نیز در سطح سلول‌های انسانی داشته باشند، بایستی حتماً قبل از اجرا و سنتز تطابق ژنی آن‌ها مورد ارزیابی قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این مقاله بخشی از پایان‌نامه خانم سیمین شریعت احمدی دانشجوی کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی پزشکی می‌باشد، لذا بدین وسیله از اساتید محترم دانشکده پیراپزشکی و پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد تقدیر و تشکر می‌گردد.

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

References

1. Gill SR, Fouts DE, Archer GL, Mongodin EF, Deboy RT, Ravel J, et al. Insights on evolution of virulence and resistance from the complete genome analysis of an early methicillin-resistant Staphylococcus aureus strain and a biofilm-producing methicillin-resistant Staphylococcus epidermidis strain. J Bacteriol. 2005;187(7):2426-38.

2. Wang R, Braughton KR, Kretschmer D, Bach TH, Queck SY, Li M, et al. Identification of novel cytolytic peptides as key virulence determinants for community-associated MRSA. Nat Med. 2007;13(12):1510-4.

3. Begun J, Sifri CD, Goldman S, Calderwood SB, Ausubel FM. Staphylococcus aureus virulence factors identified by using a high-throughput Caenorhabditis elegans-killing model. Infect Immun. 2005;73(2):872-7.

4. Diep BA, Gill SR, Chang RF, Phan TH, Chen JH, Davidson MG, et al. Complete genome sequence of USA 300, an epidemic clone of community-acquired meticillin-resistant Staphylococcus aureus. Lancet. 2006 4;367(9512):731-9.

5. Bai H, Sang G, You Y, Xue X, Zhou Y, Hou Z, Meng J, et al. Targeting RNA polymerase primary σ70 as a therapeutic strategy against methicillin-resistant Staphylococcus aureus by antisense peptide nucleic acid. PLoS One. 2012;7(1): 29886.

6. Rahman MA, Summerton J, Foster E, Cunningham K, Stirchak E, Weller D, Schaup HW, et al. Antibacterial activity and inhibition of protein synthesis in Escherichia coli by antisense DNA analogs. Antisense Res Dev. 1991;1(4):319-27.

7. Wright GD. Making sense of antisense in antibiotic drug discovery. Cell Host Microbe. 2009;6(3):197-8.

8. Borukhov S, Nudler E. RNA polymerase: the vehicle of transcription. Trends Microbiol. 2008;16(3):126-34.

9. Bai H, Luo X. Antisense Antibacterials: From Proof-Of-Concept to Therapeutic Perspectives. UK: INTECH Open Access Publisher; 2012.

10. Ding Y, Lawrence CE. A statistical sampling algorithm for RNA secondary structure prediction. Nucleic Acids Res. 2003 15;31(24):7280-301.

11. Dutkiewicz M, Ojdowska A, Kuczynski J, Lindig V, Zeichhardt H, Kurreck J, Ciesiołka J, et al. Targeting Highly Structured RNA by Cooperative Action of siRNAs and Helper Antisense Oligomers in Living Cells. PLoS One. 2015;10(8):e0136395.

12. Kwong SM, Firth N. Structural and sequence requirements for the antisense RNA regulating replication of staphylococcal multiresistance plasmid pSK41. Plasmid. 2015;78:17-25.

13. Liu Y, Zhao Q, Zhang H, Xu R, Li Y, Wei L. A New Method to Predict RNA Secondary Structure Based on RNA Folding Simulation. IEEE/ACM Trans Comput Biol Bioinform. 2015.

14. Crooke ST. Progress in antisense technology, in Drug Delivery Systems in Cancer Therapy. NewYork: Springer; 2004.

5. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modifications. 2003;270(8):1628-44.

16. Sprinzl M, Horn C, Brown M, Ioudovitch A, Steinberg S, Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. Nucleic Acids Res. 1998;26(1):148-53.

17. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33(5-6):533-40.

18. Andronescu M, Zhang ZC, Condon A. Secondary structure prediction of interacting RNA molecules J Mol Biol. 2005;345(5):987-1001.

19. Far RK, Nedbal W, Sczakiel G. Concepts to automate the theoretical design of effective antisense oligonucleotides. Bioinformatics. 2001; 17(11):1058-61.

20. Matveeva OV, Tsodikov AD, Giddings M, Freier SM, Wyatt JR, Spiridonov AN, Shabalina SA, et al. Identification of sequence motifs in oligonucleotides whose presence is correlated with antisense activity. Nucleic Acids Res. 2000;28(15):2862-5.

21. Fei J, Zhang Y. Prediction of VEGF mRNA antisense oligodeoxynucleotides by RNA structure software and their effects on HL60 and K562 cells. Cell Biol Int. 2005;29(9):737-41.

22. Jebali A, Anvari-Tafti MH. Hybridization of different antisense oligonucleotides on the surface of gold nanoparticles to silence zinc metalloproteinase gene after uptake by Leishmania major. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015;129:107-13.

23. Reuter JS, Mathews DH. RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. BMC Bioinformatics. 2010;11:129.

24. Chan JH, Lim S, Wong WS. Antisense oligonucleotides: from design to therapeutic application. Clin Exp Pharmacol Physiol. 2006;33(5-6):533-40.

25. Aartsma-Rus A, van Vliet L, Hirschi M, Janson AA, Heemskerk H, de Winter CL, et al. Guidelines for Antisense Oligonucleotide Design and Insight Into Splice-modulating Mechanisms. Mol Ther. 2009; 17(3): 548–53.

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

Original Article

Journal of Health and Biomedical Informatics
Medical Informatics Research Center
2016; 2(4): 211-218

The Capability of Anti-RpoD Oligonucleotides in Staphylococcus Aurous to Human Genes Targeting: A Bioinformatics Study

Simin Shariat Ahmadi[1], Seyedmehdi Kalantar[2], Seyed Hossein Hekmatimoghadam[3], Hengameh Zandi[4], Ali Jebali[5]*

• **Received:** 17 Dec, 2015 • **Accepted:** 20 Feb, 2015

Introduction: Using antisense oligonucleotides for targeting essential genes is one of the new methods to control microbial infections. The aim of this study was to investigate four antisense oligonucleotides against rpoD gene of staphylococcus aurous, and to find the probable match in human genes.

Method: First, rpoD gene of staphylococcus aurous was extracted from NCBI (National Center for Biotechnology Information) database. Then, its mRNA sequence was generated and four antisense were selected according to secondary structure of mRNA and thermodynamic parameters. Finally, matching of each selected antisense and all human genome with Nblast algorithm, was evaluated.

Results: This study showed that according to secondary structure and thermodynamic parameters, antisense 1, GAAGAAGTTGGTA, was the best antisense, and had the least Overall ΔG. Matching antisense sequences showed that antisense 1, 2, and 4 had different targets at human mRNA level. But, antisense 3, GAAGCAATTAATT, was ideal and could target only rpoD gene.

Conclusion: Given to secondary structure and thermodynamic parameters, the adequate antisense could be selected for target gene, but most of these antisense targeting other genes in human cells.

Key words: Oligonucleotide, Staphylococcus aureus, Gene, Secondary structure, Human Gene

• **Citation:** Shariat Ahmadi S, Kalantar SM, Hekmatimoghadam SH, Zandi H, Ali Jebali A. The Capability of Anti-RpoD Oligonucleotides in Staphylococcus Aurous to Human Genes Targeting: A Bioinformatics Study. Journal of Health and Biomedical Informatics 2016; 2(4): 211-218.

1. M.S.c Student in Medical Biotechnology, Genetics Dept., School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
2. Ph.D. in Medical Genetics, Professor, Genetics Dept., School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
3. Ph.D. in Pathology, Associate Professor, Laboratory Sciences Dept., School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
4. Ph.D. in Microbiology, Assistant Professor, Microbiology Dept., School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
5. Ph.D. in Nanotechnology, Assistant Professor of Medical Nanotechnology, Advanced Medical Sciences and Technologies Dept., School of Para medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.

***Correspondence**: Advanced Medical Sciences and Technologies Dept., School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.
• **Tel/Fax:** 035337256458 • **Email:** alijebal2011@gmail.com

[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]