مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی
مرکز تحقیقات انفورماتیک پزشکی
دوره ششم شماره چهارم. ص ۳۳۲-۳۲۰، ۱۳۹۸

مقاله پژوهشی

طراحی، مدل‌سازی و آنالیز محاسباتی crRNA برای تنظیم در سطح پسارونویسی metastamiR-10b و metastamiR-126 با استفاده از تکنیک CRISPR-C2c2 (Cas13a)

فاطمه ابراهیمی ترکی[۱]، مهسا بوربور[۱]، محبوبه ضرابی[۲*]

• دریافت مقاله: ۱۳۹۸/۱/۲۷ • پذیرش مقاله: ۱۳۹۸/۴/۲۲

مقدمه: یکی از مهم‌ترین دلایل مرگ‌ومیر در بین بیماران سرطانی متاستاز است. اخیراً نشان داده شده است که گروه خاصی از miRNAها(microRNA) که metastamir نامیده می‌شوند دارای اثر متاستاتیکی هستند. miR-126 ارتباط مشخصی با متاستاز سرطان روده به کبد دارد. همچنین در متاستاز سرطان سینه miR-10b بیان بیش از حد پیدا می‌کند؛ بنابراین کاهش سطح بیان این miRNAها می‌تواند نقش مهمی در کاهش احتمال متاستاز داشته باشد. در این تحقیق تکنیک CRISPR-C2c2(Cas13a) به منظور هدف‌گیری پیش‌سازهای miRNA جهت کاهش اثر متاستاتیکی آن‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

روش: پژوهش با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیک و بیوانفورماتیک ساختاری انجام شد. ساختار آنزیم C2c2 از پایگاه داده RCSB و توالی‌های miRNA و پیش‌سازهای آن‌ها از پایگاه‌های داده MirBase و Mirnamap تهیه شدند. با استفاده از سیستم برخط CRISPR-RT، crRNAهای هدف گیرنده توالی مورد نظر طراحی و از نظر اختصاصیت مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفتند. ساختار سه بعدی crRNAهای طراحی شده با استفاده از نرم‌افزار RNAbuider2.8.2 شبیه‌سازی و به منظور بررسی نحوه اتصال و سطح انرژی اتصالی crRNA با آنزیم C2c2(Cas13a) از سرور Hdock استفاده شد.

نتایج: crRNA طراحی شده با هدف mir-126 مشابهت ساختاری بالا با وضعیت مشاهده شده در طبیعت نشان داده و جهت‌گیری مناسب حاصل شد. در مورد crRNA طراحی شده به منظور هدف‌گیری mir-10b با وجود اختصاصیت بالا جهت‌گیری درستی ایجاد نشد.

نتیجه‌گیری: بررسی توالی محور crRNAهای طراحی شده برای ویرایش در سطح RNA کافی نیست و توصیه می‌شود در کنار بررسی‌های برپایه اختصاصیت، شبیه‌سازی و داکینگ مولکولی به منظور دقت هر چه بیشتر انجام شود.

کلید واژه‌ها: CRISPR-C2C2(Cas13a)- metastamiR-، مهار متاستاز crRNA- CRISPR-RT

•**ارجاع:** ابراهیمی ترکی فاطمه، بوربور مهسا، ضرابی محبوبه. طراحی، مدل‌سازی و آنالیز محاسباتی crRNA برای تنظیم در سطح پسارونویسی metastamiR-10b و metastamiR-126 با استفاده از تکنیک CRISPR-C2c2 (Cas13a). مجله انفورماتیک سلامت و زیست پزشکی ۱۳۹۸؛ ۶(۴): ۳۲۰-۳۲.

۱. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، دانشگاه الزهرا، دانشکده علوم زیستی، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه زیست‌شناسی محاسباتی دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

۲. دکترای بیوفیزیک، استادیار، گروه بیوتکنولوژی، آزمایشگاه زیست‌شناسی محاسباتی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه الزهرا، تهران، ایران

* **نویسنده مسئول:** تهران،دانشگاه الزهرا، خیابان ده ونک، دانشکده علوم زیستی

• **شماره تماس:** ۰۲۱۸۵۶۹۲۷۲۲ • **Email:** mzarrabi@alzahra.ac.ir

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

مقدمه

متاستاز یکی از دلایل مهم و کلیدی در ایجاد مرگ‌ومیر در بیماران سرطانی است. فرآیند متاستاز شامل چندین مرحله است که امکان دسترسی سلول‌ها را به سیستم‌های گردشی بدن، ممانعت از مرگ سلول‌ها در حین گردش در بدن و خروج از آن، دسترسی به جایگاه هدف دیگر و تکثیر در آن را فراهم می‌کند. اخیراً برخی از مطالعات انجام شده از نقش برخی microRNAها در متاستاز خبر داده‌اند. microRNA که به اختصار با miRNA نشان داده می‌شوند، مولکول RNA غیررمزگذار با طول تقریبی ۲۲ نوکلئوتید است. این نوع از RNAها در گیاهان، حیوانات و برخی از ویروس‌ها یافت می‌شوند و در خاموش‌سازی و تنظیم بعد از رونویسی بیان ژن‌ها نقش دارند [۱،۲]. اکثریت miRNAها درون سلول یافت می‌شوند؛ ولی با این حال برخی از miRNAها که با نام miRNAهای گردشی یا خارج سلولی شناخته شده‌اند در فضای خارج سلول یافت می‌شوند این فضاها شامل انواع مایعات بیولوژیکی و محیط‌های کشت سلولی است [۳].

عملکرد miRNAها بر مبنای جفت شدن بازهای مکمل با مولکول mRNA صورت می‌گیرد و در نتیجه این جفت‌شدگی، مولکول mRNA توسط یکی از فرآیندهای زیر خاموش می‌شود:

- برش رشته mRNA به دو بخش
- ناپایدارسازی mRNA با واسطه کوتاه کردن دنباله poly A آن
- ترجمه با کارایی پایین‌تر مولکول mRNA توسط ریبوزوم‌ها [۴،۵].

miRNAها از منطقه‌ای از رونوشت‌های RNA منشأ می گیرند که بر روی خود تاخوردگی پیدا کرده ساختارهای سنجاق سری کوتاهی را ایجاد می‌کنند. ژنوم انسانی بیش از ۱۰۰۰ miRNA را رمز می‌کند [۶] که در انواع بسیاری از سلول‌های پستانداران به فراوانی یافت شده و به نظر می‌رسد که در حدود ۶۰ درصد از ژن‌های انسانی و دیگر پستانداران را هدف قرار می‌دهند [۷]. miRNAها هم در گیاهان و هم در پستانداران در سطح خوبی محافظت شده هستند و به نظر می‌رسد که نقش حیاتی در تنظیم ژن‌ها دارند [۸]. تحقیقات گسترده نشان دادند که مجموعه‌های متفاوتی از miRNAها در انواع متفاوتی از سلول‌ها و بافت‌ها بیان می‌شوند [۹]. همچنین بیان ناقص و دارای اختلال miRNAها در بیماری‌های متعددی دیده شده و درمان‌های برپایه miRNAها تحت بررسی و تحقیق هستند [۱۰]. از جمله miRNAهای مؤثر در فرآیند متاستاز می‌توان به miR-21 اشاره کرد که هم در رشد تومور و هم در متاستاز آن نقش دارد [۱۱].

miR-21 این نقش را با هدف‌گیری چندین ژن مهار کننده تومور و متاستاز مانند TPM1، PDCD4 و Mapsin در فرایند متاستاز سرطان سینه انجام می‌دهد. Asangani و همکاران نشان دادند که miR-21 به بخش 3`UTR در ژن Pdcd4 متصل شده و در نهایت باعث ایجاد فرآیندهای تهاجم در سرطان روده می‌شود [۱۲].

Yin و همکاران نشان دادند که نشانه‌های بارزی از بیان بالای miRNAهای miR-126، miR-141 و miR-21 در سرم مشاهده شده است که ارتباط مشخصی با متاستاز سرطان روده‌ای کبدی دارد. miR-10b در سلول‌های متاستازی سرطان سینه بیان بیش از حد پیدا کرده و اثر مثبتی در مهاجرت سلول‌ها و تهاجم آن‌ها دارد. در واقع بیان miR-10b با اتصال فاکتور رونویسی Twist به پروموتور miR-10b القا می‌شود [۱۳]. Liu و همکاران در پژوهشی نشان دادند که در سرطان معده miR-10b در بافت‌های لنفوئیدی متاستاز مثبت، بیان بیشتری در مقایسه با بافت‌های توموری غیر متاستازی دارد. در تومورهای معده miR-10b باعث تنظیم مثبت RhoC شده و فسفریلاسیون AKT و طی هدف‌گیری HOXD10 می‌شود که در نهایت منجر به افزایش حالت تهاجمی سلول شده است [۱۴].

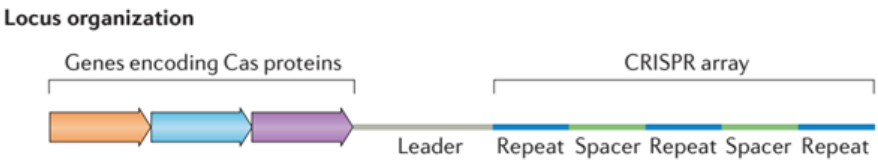
از جمله مهم‌ترین ابزارهای زیست‌شناسان توانایی دست کاری DNA است، چراکه امکان مشخص کردن رابطه بین یک ژن، mRNA آن و محصولات پروتئینی را فراهم کرده و عملکرد آن‌ها را معین می‌کند. با مهار کردن عملکرد ژن یا تغییر بیان ژن می‌توان به افق‌های وسیع‌تری در درک اساس و مبنای بیماری‌ها و حتی ارائه روش‌های جدید درمانی دست یافت [۱۵،۱۶].

CRISPR/Cas9 یک سیستم ویرایش ژنومی است که از سیستم ایمنی باکتریایی اقتباس شده است. این تکنیک کارا، سریع و آسان بوده و امکان هدف‌گیری Knock in یا Knock out هر ژنی درون ژنوم را فراهم می‌کند [۱۷].

در اواخر ۱۹۸۰ محققین تکرارهای DNAای را کشف کردند که بعدها به عنوان توالی‌های CRISPR شناخته شدند. ژن‌های Cas همواره به جایگاه CRISPR متصل بوده و محصول آن‌ها ویژگی هلیکازی و اندونوکلئازی را بروز می‌دهند.

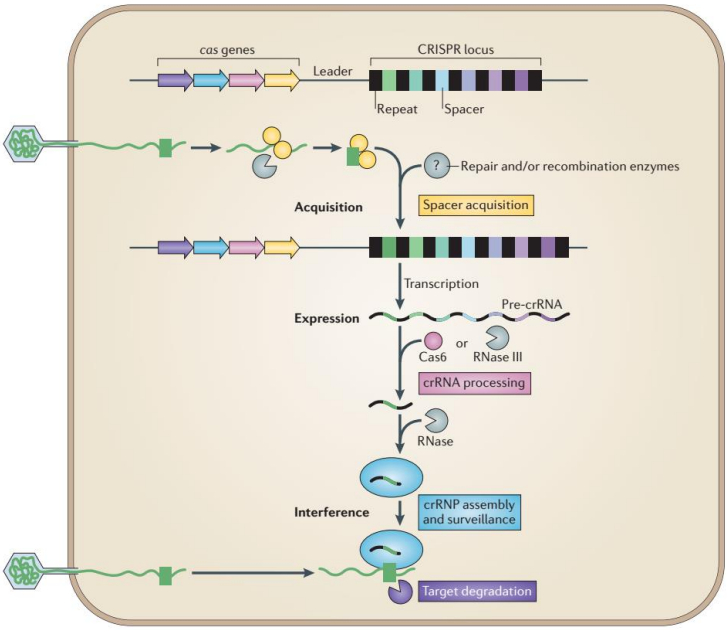
[Downloaded from jhbmi.com on 2024-10-12]

طول آرایه‌های CRISPR متفاوت است؛ ولی همه آن‌ها دارای یک ویژگی مشخص در توالی خود هستند و آن حضور توالی‌های تکرار–فاصله (repeat-spacer) است (شکل ۲) [۱۸]. در سال ۲۰۰۵، سه گروه محقق مستقل از هم اعلام کردند که Spacerهای CRISPR از منابع ویروسی و خارج کروموزومی مشتق شده‌اند. این یافته‌ها در کنار یکدیگر منجر به این شد که محققین سیستم CRISPR را به عنوان سیستم ایمنی اکتسابی باکتری‌ها بر علیه عوامل ژنتیکی خارجی بدانند. تا یک دهه گذشته، سیستم ایمنی اکتسابی ویژگی بود که فقط در یوکاریوت‌ها یافت می‌شد، در حالی که کشف CRISPR و پروتئین‌های Cas منجر به این فرضیه شد که بیشتر باکتری‌ها و آرکی‌ها نیز دارای سیستم ایمنی اکتسابی پیچیده‌ای هستند [۱۹].



شکل ۲: شماتیکی از توالی های CRISPR [۱۸]

در این سیستم‌های اکتسابی، آرایه CRISPR حافظه ایمنی را در فرم «فاصله‌ها» یا spacers که از پاتوژن‌های مهاجم به دست می‌آیند و تکرارها یا repeats ذخیره می‌کند (شکل ۳) [۱۹].



شکل ۳: طرحی از مکانیسم سیستم دفاعی باکتریایی با استفاده از CRISPR [۱۹].

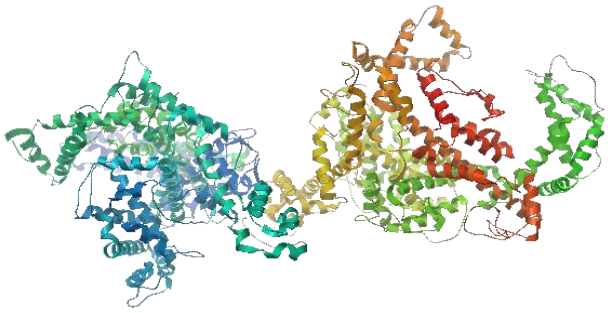
اختصاصیت CRISPR/Cas برای DNA خارجی به واسطه حضور توالی ۳ تا ۵ جفت بازی است که با نام (Protospacer Adjacent Motif) PAM شناخته می‌شود. توالی PAM در مجاورت بالادست protospacerها که توالی‌های هدف در DNA خارجی هستند، قرار دارد. این موتیف‌ها امکان تفکیک و شناسایی DNA خودی باکتریایی و غیرخودی

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

مهاجم را برای اندونوکلئاز Cas فراهم می‌آوردند. در واقع برای برش و هدف‌گیری با آنزیم Cas ضروری هستند. با وجود موفقیت‌های زیاد در زمینه ویرایش ژنوم با استفاده از تکنیک CRISPR-Cas9، سیستمی برای ویرایش RNA گزارش نشده بود. اخیراً سیستم CRISPR-C2c2(Cas13a) به عنوان ابزاری برای هدف‌گیری و ویرایش RNA گزارش شده است. CRISPR-C2c2 (Cas13a) در ژنوم ۲۱ باکتری کشف شده و به نوع VI از کلاس ۲ سیستم‌های CRISPR تعلق دارد.

آرایه CRISPR در سیستم CRISPR-C2c2 در ابتدا به pre-crRNA رونویسی می‌شود. crRNA بالغ به آنزیم C2c2 متصل شده و آن را به سمت هدف بر روی RNA مشخص تک رشته‌ای هدایت می‌کند. در ادامه در جایگاه هدف دمین‌های HEPN از پروتئین C2c2 برش تک رشته RNA را انجام می‌دهند. ساختار ساقه–حلقه crRNA برای انجام برش مورد نیاز است؛ بنابراین تکرارهای پالیندرومیک crRNA بایستی بیش از ۲۴ نوکلئوتید باشند تا ساختار ساقه–حلقه حفظ شود. علاوه بر این، C2c2 در ترکیب با طول ۲۲–۲۸ نوکلئوتیدی از بخش مکمل crRNA به طور مؤثری برش را میانجی‌گری می‌کند. سیستم CRISPR-C2c2 نوکلئوتید H(A,U or C) را برای ناحیه کنار protospacer 3` ترجیح می‌دهد، این بخش با (Protospacer Flanking Site) PFS نشان داده می‌شود. تک بازی که برش RNA تک رشته‌ای را میانجی‌گری می‌کند. C2c2 می‌تواند به راحتی به پروتئین غیرفعال متصل شونده به RNA تبدیل شود (dC2c2) این امر با ایجاد جهش در هر یک از ۲ دمین HEPN امکان‌پذیر است. در مقایسه با C2c2، dC2c2 کاربردهای بالقوه بیشتری به عنوان پروتئین متصل شونده به RNA دارد [۲۰].

در این پژوهش با استفاده از ابزارهای بیوانفورماتیکی و هدف قرار دادن پیش‌ساز microRNAهای دخیل در متاستاز سرطان‌های شایع روده و سینه، راهکاری نو برای تنظیم پسارونویسی این سرطان‌ها ارائه شد. همچنین به منظور افزایش دقت و اختصاصیت تکنیک پیشنهادی در این مطالعه (CRISPR-C2c2) ابتدا آنالیزها در سطح طراحی crRNA مورد هدف انجام و سپس بررسی‌های ساختاری به کمک روش‌های بیوانفورماتیک ساختاری صورت گرفت. نگاه همه جانبه این مطالعه به کمک ابزارهای بیوانفورماتیکی علاوه بر افزایش کارایی سیستم CRISPR-C2c2 می‌تواند تأثیر چشمگیری در کاهش زمان، هزینه و دفعات آزمون و خطای پژوهشگران داشته باشد.



شکل ٤: پروتئین C2c2 (pdb 5WTJ)

روش

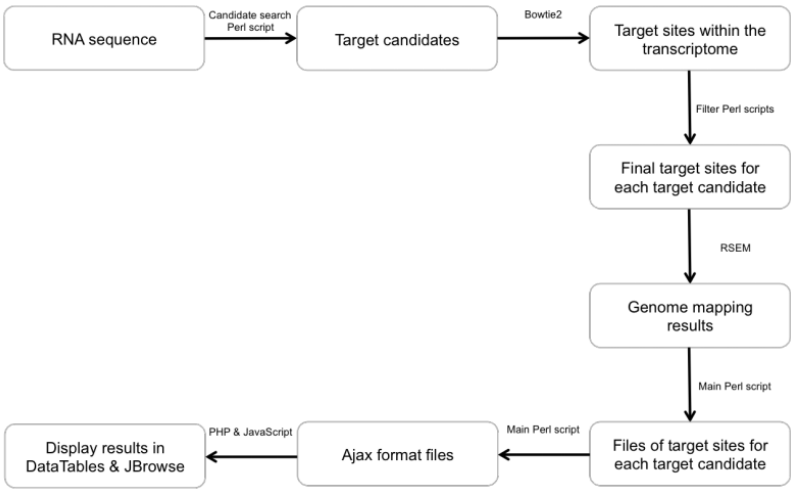
برای انجام این پژوهش نظری، ابتدا توالی‌های پیش‌ساز miRNAهای هدف از سرور mirnamap و mirBase تهیه شدند. هدف‌گیری miRNAهای بالغ به دلیل اندازه کوتاه و امکان ایجاد off-target مقبول نبود؛ بنابراین کنترل miRNAهای دخیل در متاستاز در مرحله پیش‌ساز صورت پذیرفت (جدول ۱).

جدول ۱: توالی miRNAهای mir-10b و mir-126

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

>hsa-mir-10b CCAGAGGUUGUAACGUUGUCUAUAUAUACCCUGUAGAAC CGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUAGUCACAGAUUCGAUUC UAGGGGAAUAUAUGGUCGAUGCAAAAACUUCA	Precursor (mir-10b)
>hsa-mir-126 CGCUGGCGACGGGACAUUAUUACUUUUGGUACGCGCUGUG ACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAUAAUGCGCCGUCCACGGCA	Precursor (mir-126)

برای طراحی crRNAهای هدف گیرنده، از سرور برخط CRISPR-RT(RNA targeting) استفاده شد. CRISPR-RT الگوریتمی است که امکان طراحی crRNA برای تکنیک CRISPR-C2c2 را فراهم آورده است (شکل ۵) این سیستم امکان دستوری در گستره وسیعی از پارامترها را فراهم کرده و طراحی crRNA با بیشترین دقت را امکان‌پذیر می‌کند. این پارامترها می‌توانند طول منطقه مکمل crRNA، PFS و تعداد جفت شدگی‌های اشتباه یا گپ‌های قابل پذیرش توسط سیستم، باشند. بعد از مشخص کردن و تنظیم پارامترهای مورد نظر، سیستم CRISPR-RT لیستی از توالی‌های crRNA با ویژگی‌های متفاوت را براساس داده‌های ورودی برای توالی هدف مورد انتظار، ارائه می‌دهد [۱۵].



شکل ۵: فلوچارت فرآیند CRISPR-RT

***در فلوچارت مسیری که توالی RNA ورودی کاربر و نتایج حاصل را پردازش می‌کند، نمایش داده شده است.**

crRNAهای انتخابی برای هدف‌گیری mir-10b و mir-126 با استفاده از نرم‌افزار RNAbuider2.8.2 مدل‌سازی شدند [۱۹،۲۰]. این نرم‌افزار که پیش‌تر با عنوان MMB یا macromolecule builder نیز شناخته شده، برای شبیه‌سازی پروتئین، DNA و RNA مورد استفاده قرار می گیرد. این نرم‌افزار با کدهای C++ نوشته شده است و برای انواع سیستم‌های عامل قابل استفاده است [۲۱،۲۲]. در واقع crRNAهای طراحی شده در ساختاری که با عنوان scaffold شناخته می‌شود، مورد استفاده قرار می‌گیرند؛ به عبارتی بخش طراحی شده توسط CRISPR-RT برای هدف گیری منطقه هدف مورد استفاده قرار می‌گیرد و بخش scaffold با توجه به ساختار دوم و سومی که به خود می‌گیرد برای فعال‌سازی آنزیم C2c2 استفاده می‌شود. Scaffold که در این مطالعه به کار گرفته شد، ساختار پیشنهادی خود الگوریتم مورد استفاده در CRISPR-RT است، این توالی با ساختار ساقه–حلقه بر اساس پژوهش‌های قبلی تأیید و ارائه شده است [۱۶]. منطبق بر این ساختار و بخش طراحی شده و هدف گیرنده مدل‌سازی ساختار سه بعدی crRNA انجام شد.

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

ساختار کریستالوگرافی آنزیم C2c2(Cas13a) از پایگاه داده پروتئین یا کد 5wtj دریافت و ساختار توسط نرم‌افزار Modeller9.17 ترمیم شد. به منظور انجام داکینگ مولکولی بین RNAهای شبیه‌سازی شده با آنزیم C2c2(Cas13a) از سرور HDOCK استفاده شد [۲۳]. این سرور برخط به منظور انجام داکینگ مولکولی پروتئین-پروتئین، پروتئین-DNA و پروتئین-RNA مورد استفاده قرار گرفت. HDOCK از داکینگ سراسری برای ایجاد کمپلکس‌ها استفاده می‌نماید؛ بنابراین نیازی به داشتن اطلاعات اولیه در مورد محدوده اتصال نیست [۲۴].

کمپلکس‌های حاصل از داکینگ با استفاده از نرم‌افزارهای PyMol و VMD مورد بررسی و مقایسه قرار گرفتند.

طراحی و انتخاب crRNAها با سرور CRISPR-RT

با تنظیم پارامترهای مورد نیاز در سرور CRISPR-RT، کاندیدهایی بر اساس توالی RNA ورودی و الگوریتم‌های جستجو دقیق جایگاه‌های غیرهدف، برای هر توالی ورودی در رونوشتگان (Transcriptome) و ژنگان (Genome) ارائه شد. بنابر نتایج حاصل از سرور CRISPR-RT، crRNAهای مناسب با در نظر گرفتن پارامترهای جایگاه شروع و پایان crRNA مورد نظر، درصد GC، کمترین تعداد جایگاه غیرهدف در ژنگان و رونوشتگان که نشان دهنده اختصاصیت توالی طراحی شده است، انتخاب شدند.

crRNAهای طراحی شده در شکل‌های ۶ و ۷ به ترتیب برای mir-10b و mir-126 ارائه شده‌اند.

نتایج

Protospacer+PF	Start	End	GC	#Transcript_Targets	#Gene_Targets
ACCCUGUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUC [crRNA]	28	56	0.43	1	1
CCCUGUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCC [crRNA]	29	57	0.46	1	1
CUGUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGU [crRNA]	31	59	0.46	1	1
UGUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUA [crRNA]	32	60	0.43	1	1
GUAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAU [crRNA]	33	61	0.43	1	1
UAGAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUA [crRNA]	34	62	0.39	1	1
GAACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUAGU [crRNA]	36	64	0.43	1	1
AACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUAGUC [crRNA]	37	65	0.39	1	1
ACCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUAGUCA [crRNA]	38	66	0.43	1	1
CCGAAUUUGUGUGGUAUCCGUAUAGUCAC [crRNA]	39	67	0.43	1	1

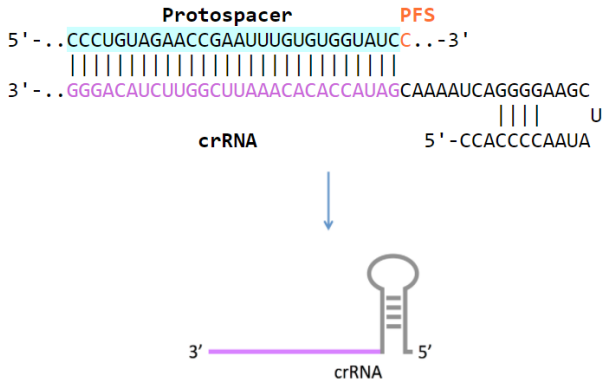
شکل ٦: crRNAهای طراحی شده با هدف‌گیری mir-10b

Protospacer+PFS	Start	End	GC	#Transcript_Targets	#Gene_Targets
UGGUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGU [crRNA]	27	55	0.54	1	1
GGUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUA [crRNA]	28	56	0.54	1	1
GUACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUAC [crRNA]	29	57	0.50	1	1
UACGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACC [crRNA]	30	58	0.50	1	1
CGCGCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGU [crRNA]	32	60	0.57	1	1
CGCUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGA [crRNA]	34	62	0.54	1	1
CUGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGU [crRNA]	36	64	0.50	1	1
UGUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUA [crRNA]	37	65	0.46	1	1
GUGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAA [crRNA]	38	66	0.46	1	1
UGACACUUCAAACUCGUACCGUGAGUAAU [crRNA]	39	67	0.43	1	1

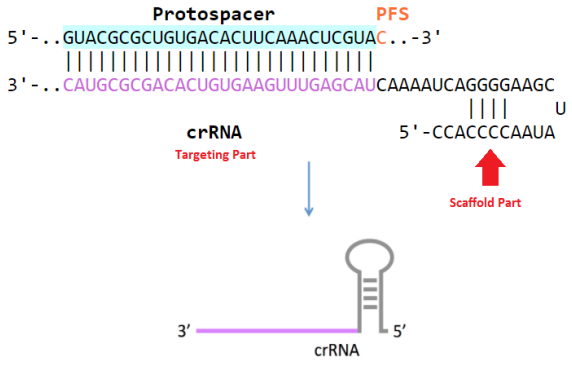
شکل ۷: crRNAهای طراحی شده با هدف‌گیری mir-126

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

توالی crRNAهای انتخاب شده و نحوه اتصال آن‌ها با توالی هدف، برای دو mir-10b و mir-126 در شکل‌های (۸ و ۹) به صورت شماتیک نمایش داده شد که در آن‌ها توالی بنفش رنگ نشان دهنده crRNA طراحی شده است و بخش پیچ‌خورده مشکی‌رنگ ساختار scaffold یا چهارچوبی را که crRNA در آن قرار می‌گیرد را مشخص نمود.



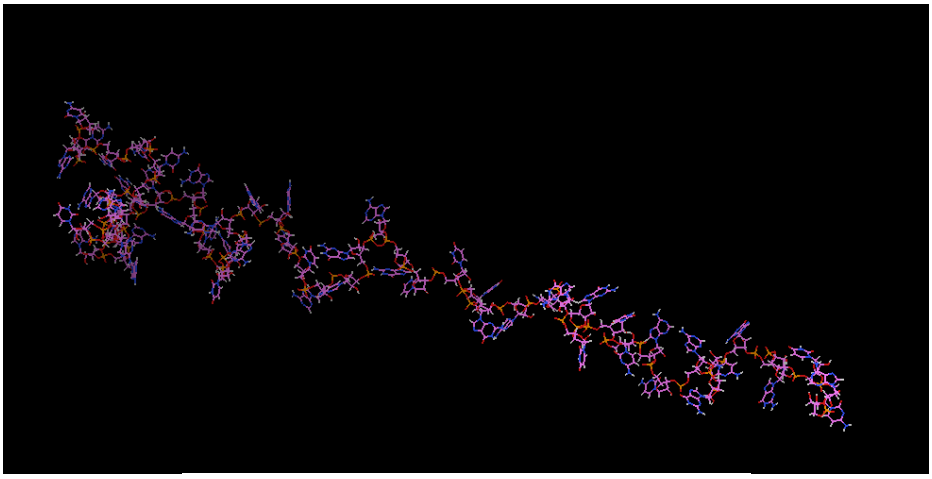
شکل ۸: crRNA طراحی شده برای mir-10b



شکل ۹: crRNA طراحی شده برای mir-126

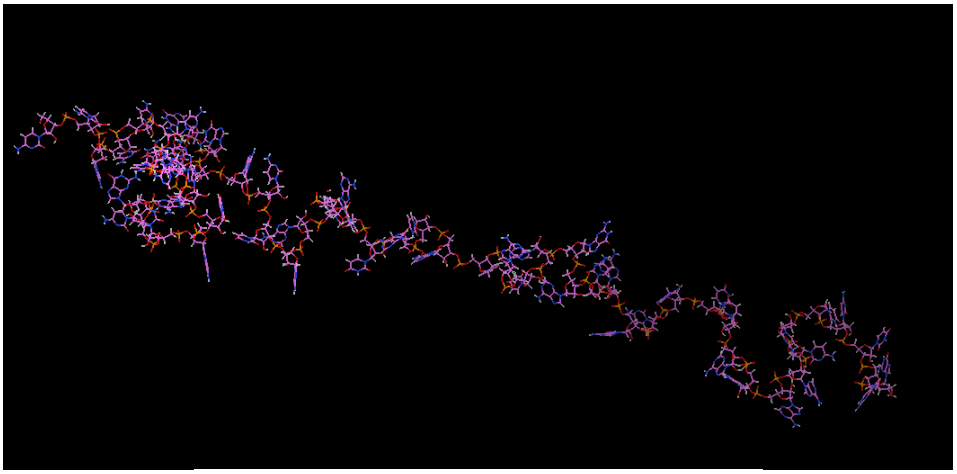
شبیه‌سازی crRNAهای طراحی شده با نرم‌افزار RNA builder 2.8.2

به منظور بررسی میانکنش و کمپلکس بین crRNAها و آنزیم C2C2 (Cas13a)، در ابتدا توالی crRNAهای طراحی شده برای پیش‌ساز دو microRNA مورد نظر به صورت سه‌بعدی شبیه‌سازی شدند. شبیه‌سازی ساختار سه بعدی crRNAهای mir-01b و mir-126، شامل ساختار حلقوی تشکیل شده از جفت بازهای بین بخش ابتدایی crRNA با خود و توالی خطی است، این ساختار طراحی و شبیه‌سازی شده با ساختار مشاهده شده در حالت طبیعی شباهت بالایی را نشان داد (شکل ۱۰و ۱۱).



شکل ۱۰: مدل سه بعدی crRNA طراحی شده برای mir-126

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



شکل ۱۱. مدل سه بعدی crRNA طراحی شده برای mir-10b

داکینگ آنزیم C2c2 و crRNA با سرور HDOCK

با استفاده از سرور بر خط HDOCK، برای هر کدام از microRNAهای هدف، ۱۰۰ مدل داکینگ crRNA شبیه‌سازی‌شده با C2c2(cas13a) ارائه شد که از بین ۱۰۰ مدل پیشگویی شده، ۱۰ مدل برتر بر اساس سطح انرژی انتخاب شدند (جدول ۲ و ۳).

جدول ۲: مدل‌های طراحی شده بر اساس میانکنش بین پروتئین و crRNA طراحی شده برای mir-126

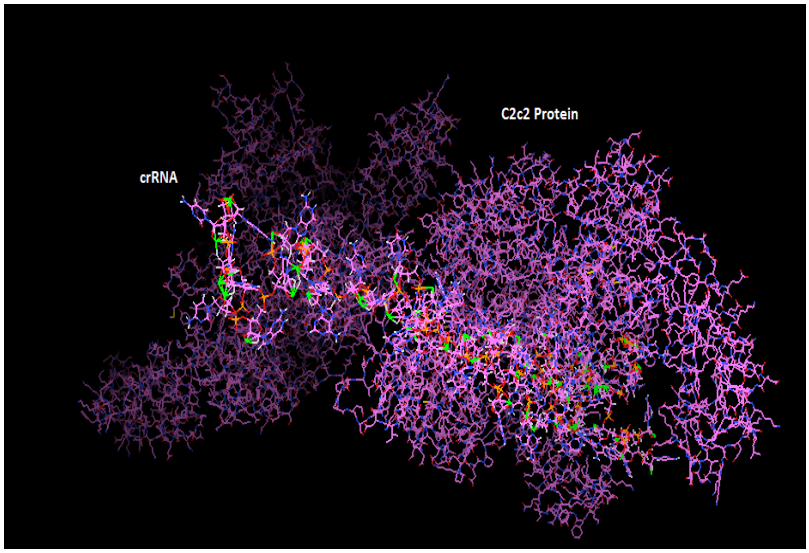
Rank	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱
Docking Score	-۳۴۵/۴۸	-۲۹۰/۸۳	-۲۸۹/۵۴	-۲۸۵/۷۲	-۲۷۶/۳۱	-۲۷۰/۹۷	-۲۶۹/۶۴	-۲۶۷/۶۱	-۲۶۷/۱۳	-۲۶۶/۸۹

جدول ۳: مدل‌های طراحی شده براساس میانکنش بین پروتئین و crRNA ی طراحی شده برای mir-10b

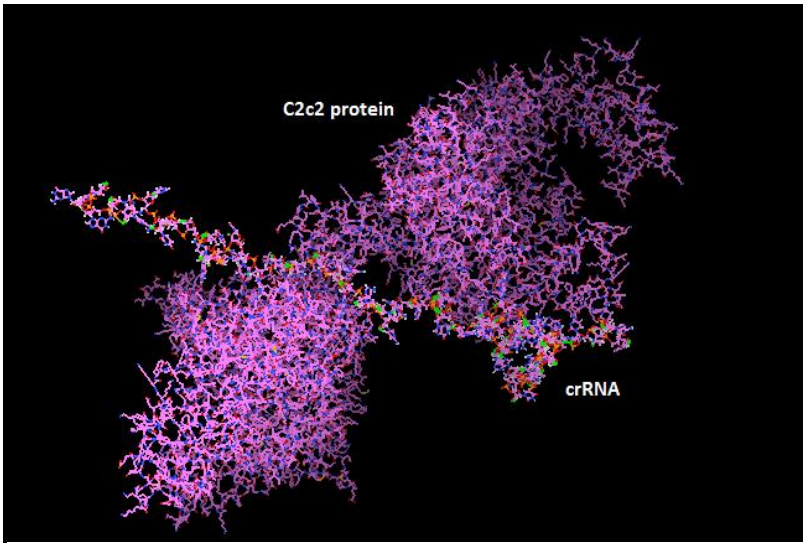
Rank	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱
Docking Score	-۳۰۷/۲۵	-۳۰۳/۲۱	-۳۰۲/۵۹	-۲۹۹/۷۹	-۲۹۸/۷۶	-۲۹۸/۷۰	-۲۹۸/۰۵	-۲۸۷/۱۸	-۲۸۵/۹۳	-۲۸۷/۶۴

کمپلکس داکینگ آنزیم C2c2 و crRNA با استفاده از دو نرم‌افزار VMD و Pymol مورد بررسی قرار گرفتند (شکل ۱۲ و ۱۳). با بررسی کمپلکس‌های تشکیل شده مشاهده شد که crRNA طراحی شده با هدف mir-126 مشابهت ساختاری بسیار بالایی با وضعیت مشاهده شده در حالت طبیعی نشان داد، به عبارتی جهت‌گیری بخش سنجاق سری برای فعال‌سازی آنزیم C2c2(Cas13a) به درستی اتفاق افتاده است. در مورد crRNA طراحی شده به منظور هدف‌گیری mir-10b با وجود این که در بررسی‌های بر مبنای توالی اختصاصیت خوبی مشاهده شد، جهت‌گیری به درستی اتفاق نیفتاده است؛ بنابراین به احتمال بسیار زیاد عدم فعال‌سازی درست آنزیم دور از انتظار نیست.

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



شکل ۱۲: کمپلکس شبیه‌سازی شده پروتئین C2c2 با crRNA طراحی شده برای mir-126



شکل ۱۳: کمپلکس شبیه‌سازی شده پروتئین C2c2 با crRNA طراحی شده برای mir-10b

بحث و نتیجه‌گیری

بر اساس مطالعات انجام شده که به بیان بالای microRNAها به ویژه دو microRNA انتخابی در این مطالعه mir-10b و mir-126 در متاستاز سرطان‌های روده و سینه اشاره دارند و به منظور ارائه نوعی مکانیسم درمانی برای جلوگیری از متاستاز در سرطان‌ها، در مطالعه حاضر هدف‌گیری پیش‌سازهای mir-10b و mir-126 با استفاده از تکنیک CRISPR-C2c2 مورد ارزیابی قرار گرفت.

با توجه به کارایی و دقت بالای تکنیک‌های بر مبنای CRISPR استفاده از آن در زمینه‌های متعدد افزایش یافت. تکنیک CRISPR-C2c2 با توانایی ویرایش RNA هدف پتانسیل بالایی برای استفاده در درمان بیماری‌های با بیان بالای ژن را دارا بود. آنالیزهای بیوشیمیایی نشان داد که آنزیم C2c2 توسط crRNA هدایت شده و در RNA هدف ایجاد برش می‌کند؛ بنابراین دقت و توانایی این تکنیک وابسته به طراحی درست و اختصاصی crRNA است [۲۴]. در این مطالعه به منظور افزایش اختصاصیت و بهبود عملکرد کمپلکس CRISPR، علاوه بر بررسی‌های انجام شده در انتخاب crRNA، با سرور CRISPR-RT که بر مبنای تعداد off targetها در ژنگان و رونوشتگان، درصد GC، موقعیت قرارگیری در توالی ژنومی و ... است، پایداری کمپلکس ریبونوکلئوپروتئینی تشکیل شده از نقطه‌نظر بیوانفورماتیک

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

ساختاری و میزان تمایل اتصال آنزیم و crRNA نیز مورد بررسی قرار گرفت.

بر این اساس بعد از طراحی و انتخاب crRNAهای هدف پیش‌سازهای mir-10b و mir-126 توسط سرور CRISPR-RT که برای ویرایش RNAها طراحی شده است، با به کارگیری نرم‌افزار RNA builder 2.8.2 شبیه‌سازی ساختارهای سه بعدی crRNAها انجام و ارزیابی شدند. این شبیه‌سازی بر اساس ویژگی‌های ساختاری crRNA و نواحی تشکیل دهنده ساقه و حلقه انجام پذیرفت. این فرآیند امکان بررسی تاخوردگی صحیح RNA راهنما در تکنیک CRISPR را فراهم می‌نماید.

در ادامه برای ارزیابی عملکرد کمپلکس آنزیم C2c2 و RNA راهنما، پس از بهینه‌سازی ساختار کریستالوگرافی توسط نرم‌افزار modeller9.17، با استفاده از سرور HDOCK داکینگ انجام شد که از ۱۰۰ مدل ارائه شده ۱۰ مدل بر مبنای سطح انرژی اتصالی انتخاب و با نرم‌افزارهای VMD و Pymol ارزیابی شدند. مطابق نتایج ارائه شده در جدول‌های ۲ و ۳ انرژی اتصال crRNA طراحی و شبیه‌سازی شده به آنزیم C2c2 با استفاده از الگوریتم سرور برخط HDOCK محاسبه شده و مدل با پایین‌ترین سطح انرژی اتصالی انتخاب شد. برمبنای ارزیابی‌های انجام شده و بررسی نحوه اتصال crRNA با استفاده از نرم‌افزارهای VMD و Pymol مشاهده شد، لزوماً هر crRNAای که بدون off-target باشد، در موقعیت مناسبی به آنزیم C2c2 متصل نمی‌شود و ساختار حلقه–ساقه در crRNA در دمین REC آنزیم قرار نمی‌گیرد، در نتیجه می‌توان پیشگویی کرد که توانایی لازم برای فعال‌سازی آنزیم را نداشته و در نتیجه تکنیک CRISPR-C2c2 نمی‌تواند کارایی مورد انتظار را داشته باشد. در این مطالعه مشاهده شد که crRNA طراحی شده با هدف‌گیری پیش‌ساز miR-10b با وجود اختصاصیت مناسب سطح انرژی اتصالی مناسبی نداشت، در حالی که crRNA طراحی شده به منظور هدف‌گیری پیش‌ساز miR-126 هم اختصاصیت مناسب و هم سطح انرژی اتصالی مناسبی داشت.

بر اساس مطالعه انجام شده توسط Liu و همکاران مشخص شد که آنزیم C2c2 (Cas13a) در شناسایی crRNA رفتاری بر پایه توالی و ساختار دارد، به عبارتی ساختار ساقه حلقه تشکیل شده در crRNA هم در اختصاصیت عملکرد آنزیم اثر داشته و هم در ویژگی اندونوکلئازی آن مؤثر است. از طرف دیگر در همان پژوهش مشخص شده است که قرار گیری درست بخش ساقه–حلقه مربوط crRNA طراحی شده در دمین REC آنزیم در فعال شدن آن کاملاً مؤثر است [۲۵]. همچنین بررسی میانکنش بین ساقه crRNA و آنزیم C2c2، نشان داد که این میانکنش از طریق پیوندهای الکتروستاتیک و هیدروژنی با زنجیره‌های جانبی رزیدوهای با بار مثبت انجام شد. رزیدوهای با بار مثبت که به فسفات‌های crRNA متصل می‌شوند، بخشی از توالی حفاظت شده آنزیم C2c2 است که از جمله ویژگی‌های بارز آن نیز به شمار می‌آید. علاوه بر گروه‌های فسفات، گروه‌های هیدروکسیل crRNA تعاملات گسترده‌ای را با دمین هلیکازی و دیگر دمین‌های آنزیم ایجاد می‌کنند [۲۶]. بر همین اساس کمپلکس حاصل از داکینگ موقعیت قرارگیری آنزیم و crRNA را نسبت به هم و همچنین صحت قرارگیری crRNA در دمین‌های مورد انتظار آنزیم را مشخص می‌کند که در نهایت می‌تواند منجر به برش صحیح پیش سازهای mir-10b و mir-126 شود و کاهش سطح این microRNAها در سلول با هدف جلوگیری از متاستاز در پی داشته باشد. این بررسی‌ها و پیش‌گویی‌های بر مبنای بیوانفورماتیک ساختاری می‌تواند به میزان چشم‌گیری از آزمون و خطاهای پرهزینه آزمایشگاهی و اتلاف وقت پژوهشگران نیز جلوگیری نمایند.

استفاده از ابزارهای محاسباتی به طور خاص در زمینه مدل‌سازی و داکینگ می‌تواند دقت طراحی‌های انجام شده را به میزان قابل توجهی افزایش دهد. با در نظر گرفتن هزینه بالای تکنیک‌های ویرایش ژنگان و رونوشتگان و به طور خاص تکنیک‌های مبتنی بر CRISPR، هدف‌گیری درست می‌تواند از تکرارهای بی‌نتیجه و نتایج غیردقیق پیش‌گیری نماید. در پژوهش حاضر مشخص شد که بررسی توالی محور crRNAهای طراحی شده برای اعمال ویرایش در سطح RNA کافی نیست و توصیه می‌شود که در کنار بررسی‌های برپایه اختصاصیت بررسی‌های شبیه‌سازی محور و داکینگ مولکولی به منظور دقت هر چه بیشتر انجام شود.

از جمله محدودیت‌های روش پیشنهادی در این پژوهش می‌توان به کمبود نرم‌افزارهای مناسب برای داکینگ مولکولی بین پروتئین و اسیدهای نوکلئیک، DNA/RNA اشاره کرد. به طور کلی هرچه تعداد نرم‌افزارها و سیستم‌های برخط به منظور انجام شبیه‌سازی‌های ساختاری اسیدهای نوکلئیک و داکینگ مولکولی بین DNA/RNA و پروتئین و آنزیم‌های هدف بیشتر باشد، نتایج حاصل دقیق‌تر بوده و به تبع آن

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

پیشگویی دقت تکنیک مولکولی CRISPR نیز با دقت بالاتری انجام خواهد شد.

در پایان پیشنهاد می‌شود که به منظور افزایش دقت، کمپلکس‌های حاصل از داکینگ مولکولی با استفاده از نرم-افزارهای دینامیک مولکولی بهینه‌سازی شوند تا در نهایت بتوان با تلفیق روش‌های توالی-محور با ارزیابی‌های بر مبنای بیوانفورماتیک ساختاری با اختصاصیت بیشتری crRNA را طراحی کرده و هدف‌گیری با استفاده از تکنیک CRISPR-C2c2 را انجام داد.

تعارض منافع

بدین‌وسیله نویسندگان تصریح می‌نمایند که هیچ‌گونه تضاد منافعی در خصوص پژوهش حاضر وجود ندارد.

References

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. Nature 2004;431(7006):350-5. doi: 10.1038/nature02871

2. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell 2004;116(2):281-97. doi: 10.1016/s0092-8674(04)00045-5

3. Sohel MH. Extracellular/Circulating MicroRNAs: Release Mechanisms, Functions and Challenges. Achievements in the Life Sciences 2016; 10(2): 175-86. doi.org/10.1016/j.als.2016.11.007

4. Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell 2009 23;136(2):215-33. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.

5. Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W. Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. Annu Rev Biochem 2010;79:351-79. doi: 10.1146/annurev-biochem-060308-103103.

6. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. Nat Genet 2005;37(7):766-70. doi: 10.1038/ng1590

7. 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. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035

8. Tanzer A, Stadler PF. Molecular evolution of a microRNA cluster. J Mol Biol 2004;339(2):327-35. doi: 10.1016/j.jmb.2004.03.065

9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. Science 2001; 294(5543):853-8. doi: 10.1126/science.1064921

10. Li C, Feng Y, Coukos G, Zhang L. Therapeutic microRNA strategies in human cancer. AAPS J 2009;11(4):747-57. doi: 10.1208/s12248-009-9145-9.

11. Babashah S. MicroRNAs: Key Regulators of Oncogenesis. NewYork: Springer; 2014.

12. Asangani IA, Rasheed SA, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pdcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. Oncogene 2008;27(15):2128-36. doi: 10.1038/sj.onc.1210856

13. Yin J, Bai Z, Song J, Yang Y, Wang J, Han W, et al. Differential expression of serum miR-126, miR-141 and miR-21 as novel biomarkers for early detection of liver metastasis in colorectal cancer. Chin J Cancer Res 2014;26(1):95-103. doi: 10.3978/j.issn.1000-9604.2014.02.07.

14. Liu J, Zheng M, Tang YL, Liang XH, Yang Q. MicroRNAs, an active and versatile group in cancers. Int J Oral Sci 2011;3(4):165-75. doi: 10.4248/IJOS11063.

15. Zhu H, Richmond E, Liang C. CRISPR-RT: a web application for designing CRISPR-C2c2 crRNA with improved target specificity. Bioinformatics 2018;34(1):117-119. doi: 10.1093/bioinformatics/btx580.

16. Abudayyeh OO, Gootenberg JS, Konermann S, Joung J, Slaymaker IM, Cox DB, Shmakov S, et al. C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. Science 2016;353(6299):aaf5573. doi: 10.1126/science.aaf5573.

17. van der Oost J, Westra ER, Jackson RN, Wiedenheft B. Unravelling the structural and mechanistic basis of CRISPR-Cas systems. Nat Rev Microbiol 2014;12(7):479-92. doi: 10.1038/nrmicro3279.

18. Amitai G, Sorek R. CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. Nat Rev Microbiol 2016;14(2):67-76. doi: 10.1038/nrmicro.2015.14.

19. Flores SC, Altman RB. Turning limited experimental information into 3D models of RNA. RNA 2010;16(9):1769-78. doi: 10.1261/rna.2112110.

20. Flores SC, Altman R. Structural insights into pre-translocation ribosome motions. Pac Symp Biocomput 2011:205-11. doi: 10.1142/9789814335058_0022

21. Flores SC, Wan Y, Russell R, Altman RB. Predicting RNA structure by multiple template homology modeling. Pac Symp Biocomput 2010:216-27. doi: 10.1142/9789814295291_0024

22. Flores SC, Altman RB. Turning limited experimental information into 3D models of RNA. RNA 2010;16(9):1769-78. doi: 10.1261/rna.2112110.

23. Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang SY. HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. Nucleic Acids Res 2017;45(W1):W365-73. doi: 10.1093/nar/gkx407.

24. Yan Y, Wen Z, Wang X, Huang SY. Addressing recent docking challenges: A hybrid strategy to integrate template-based and free protein-protein

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

docking. Proteins 2017;85(3):497-512. doi: 10.1002/prot.25234.
25. Liu L, Li X, Wang J, Wang Chen P, Yin M, Li J, et al. Two Distant Catalytic Sites Are Responsible for C2c2 RNase Activities. Cell 2017;168(1-2):121-34.e12. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.031.

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

Original Article

Journal of Health and Biomedical Informatics
Medical Informatics Research Center
2020; 6(4): 320-332

Design, Modeling and Computational Analysis of crRNA to Regulate MetastamiR-10b and MetastamiR-126 in Post-transcriptional Level by CRISPR-C2c2 (Cas13a) Technique

Ebrahimi Tarki Fatemeh[1], Bourbour Mahsa[1], Zarrabi Mahboobeh[2]*

• **Received:** 16 Apr, 2019 • **Accepted:** 13 Jul, 2019

Introduction: Metastasis is one the most important causes of mortality in cancer patients. Recent studies have shown the metastatic potential of a specific group of microRNAs called metastamirs. miR-126 is shown to be correlated with the colorectal liver metastasis. Also, overexpression of miR-10b has been reported in metastatic breast cancer. Therefore, down regulation of these miRNAs at transcriptional level can reduce the probability of metastasis. This study analyzes targeting of miRNAs precursors using CRISPR-C2c2 (Cas13a) technique.
Method: To conduct this study, we used bioinformatics and structural bioinformatics methods. The structure of C2c2 (Cas13a) enzyme was obtained from RCSB database, and the sequences of miRNAs and their precursors were collected from MirBase and Mirnamap. The crRNAs were designed, evaluated and checked for their specificity by using CRISPR-RT. The modeling of the three-dimensional structure of the designed crRNAs was performed by RNAbuilder 2.8.2 software. We used Hdock server to perform molecular docking to assess the energy level and the position of docked molecules.
Result: The crRNA designed for mir-126 showed high structural similarity with the situation observed in nature and appropriate orientation was obtained. In the case of crRNA designed to target mir-10b, despite high specificity, the correct orientation was not established.
Conclusion: Sequence-based evaluation of crRNAs designed for RNA-level editing is insufficient, and it is recommended that, along with specificity, simulation and molecular docking studies, be performed for higher accuracy.

Keywords: MetastamiR, CRIPSR-C2c2(Cas13a), Metastasis inhibition, CRISPR-RT, crRNA

• **Citation:** Ebrahimi Tarki F, Bourbour M, Zarrabi M. Design, Modeling and Computational Analysis of crRNA to Regulate MetastamiR-10b and MetastamiR-126 in Post-transcriptional Level by CRISPR-C2c2 (Cas13a) Technique. Journal of Health and Biomedical Informatics 2020; 6(4): 320-32. [In Persian]

1. M.Sc. of Microbial Biotechnology, Computational Biology Lab, Biotechnology Dept., Alzahra University, Tehran, Iran
2. Ph.D. in Biophysics, Assistant Professor, Computational Biology Lab, Department of Biotechnology Dept., Alzahra University, Tehran, Iran
***Correspondence**: Faculty of Biological Sciences, Alzahra University, Deh-e-Vanak St., Tehran, Iran
• **Tel:** 02185692722 • **Email:** mzarrabi@alzahra.ac.ir

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