بسم الله الرحمن الرحيم

بسمه تعالی

دانشکده علوم زیستی

تاییدیه اعضای هیات داوران حاضر در جلسه دفاع از پایان‌نامه کارشناسی ارشد

اعضای هیئت داوران نسخهٔ نهایی پایان‌نامه نامه آقای سیدعلی موسوی زاده رشته ژنتیک به شماره دانشجویی ۸۹۵۱۰۴۱۰۲۳ با عنوان : **" بررسی تاثیر بیش بیان miR-302f برژن هدف احتمالی TrkA وتاثیر آن برچرخه سلولی در رده های سلولی HuH -7 و HEk293T"** از نظر فرم و محتوا بررسی نموده و آنرا برای اخذ درجهٔ کارشناسی‌ارشد مورد تائید قرار دادند.

اعضای هیأت داوران	نام و نام خانوادگی	رتبه علمی	امضاء
۱- استاد راهنما	دکتر بهرام محمدسلطانی	استادیار	
۲- استاد مشاور	دکتر مسعود سلیمانی	دانشیار	
۳- استاد ناظر داخلی	دکتر سیدجواد مولی	دانشیار	
۴- استاد ناظر خارجی	دکتر سیروس زینلی	استادیار	
۵- نماینده تحصیلات تکمیلی	دکتر سیدجواد مولی	دانشیار	

آیین‌نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهشهای علمی دانشگاه تربیت مدرس

مقدمه: با عنایت به سیاست‌های پژوهشی و فناوری دانشگاه در راستای تحقق عدالت و کرامت انسانها که لازمه شکوفایی علمی و فنی است و رعایت حقوق مادی و معنوی دانشگاه و پژوهشگران، لازم است اعضای هیأت علمی، دانشجویان، دانش‌آموختگان و دیگر همکاران طرح، در مورد نتایج پژوهشهای علمی که تحت عناوین پایان‌نامه، رساله و طرحهای تحقیقاتی با هماهنگی دانشگاه انجام شده است، موارد زیر را رعایت نمایند:

ماده ۱- حق نشر و تکثیر پایان نامه/ رساله و درآمدهای حاصل از آنها متعلق به دانشگاه می باشد ولی حقوق معنوی پدید آورندگان محفوظ خواهد بود.

ماده ۲- انتشار مقاله یا مقالات مستخرج از پایان‌نامه/ رساله به صورت چاپ در نشریات علمی و یا ارائه در مجامع علمی باید به نام دانشگاه بوده و با تایید استاد راهنمای اصلی، یکی از اساتید راهنما، مشاور و یا دانشجو مسئول مکاتبات مقاله باشد. ولی مسئولیت علمی مقاله مستخرج از پایان نامه و رساله به عهده اساتید راهنما و دانشجو می باشد.

تبصره: در مقالاتی که پس از دانش‌آموختگی بصورت ترکیبی از اطلاعات جدید و نتایج حاصل از پایان‌نامه/ رساله نیز منتشر می‌شود نیز باید نام دانشگاه درج شود.

ماده ۳- انتشار کتاب، نرم افزار و یا آثار ویژه (اثری هنری مانند فیلم، عکس، نقاشی و نمایشنامه) حاصل از نتایج پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرحهای تحقیقاتی کلیه واحدهای دانشگاه اعم از دانشکده ها، مراکز تحقیقاتی، پژوهشکده ها، پارک علم و فناوری و دیگر واحدها باید با مجوز کتبی صادره از معاونت پژوهشی دانشگاه و براساس آئین نامه های مصوب انجام شود.

ماده ٤- ثبت اختراع و تدوین دانش فنی و یا ارائه یافته ها در جشنواره‌های ملی، منطقه‌ای و بین‌المللی که حاصل نتایج مستخرج از پایان‌نامه/ رساله و تمامی طرح‌های تحقیقاتی دانشگاه باید با هماهنگی استاد راهنما یا مجری طرح از طریق معاونت پژوهشی دانشگاه انجام گیرد.

ماده ٥- این آیین‌نامه در ٥ ماده و یک تبصره در تاریخ۸۷/٤/۱ در شورای پژوهشی و در تاریخ ۸۷/٤/۲۳ در هیأت رئیسه دانشگاه به تایید رسید و در جلسه مورخ ۸۷/۷/۱۵ شورای دانشگاه به تصویب رسیده و از تاریخ تصویب در شورای دانشگاه لازم‌الاجرا است.

«اینجانب سید علی موسوی زاده دانشجوی رشته زیست شناسی - زنتیک ورودی سال تحصیلی ۹۰-۸۹

مقطع کارشناسی ارشد دانشکده علوم زیستی متعهد می شوم کلیه نکات مندرج در آئین نامه حق مالکیت مادی و معنوی در مورد نتایج پژوهش های علمی دانشگاه تربیت مدرس را در انتشار یافته های علمی مستخرج از پایان نامه / رساله تحصیلی خود رعایت نمایم. در صورت تخلف از مفاد آئین نامه فوق الاشعار به دانشگاه وکالت و نمایندگی می دهم که از طرف اینجانب نسبت به لغو امتیاز اختراع بنام بنده و یا هر گونه امتیاز دیگر و تغییر آن به نام دانشگاه اقدام نماید. ضمناً نسبت به جبران فوری ضرر و زیان حاصله بر اساس برآورد دانشگاه اقدام خواهم نمود و بدینوسیله حق هر گونه اعتراض را از خود سلب نمودم»

امضا: .....

تاریخ: ۹۲/۱/۳

آیین نامه چاپ پایان‌نامه (رساله)های دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس

نظر به اینکه چاپ و انتشار پایان نامه (رساله)های تحصیلی دانشجویان دانشگاه تربیت مدرس، مبین بخشی از فعالیتهای علمی - پژوهشی دانشگاه است بنابراین به منظور آگاهی و رعایت حقوق دانشگاه،دانش آموختگان این دانشگاه نسبت به رعایت موارد ذیل متعهد می‌شوند:

ماده ۱: در صورت اقدام به چاپ پایان نامه (رساله)ی خود، مراتب را قبلاً به طور کتبی به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اطلاع دهد.

ماده ۲: در صفحه سوم کتاب (پس از برگ شناسنامه) عبارت ذیل را چاپ کند:

«کتاب حاضر، حاصل پایان نامه کارشناسی ارشد/ رساله دکتری نگارنده در رشته زیست شناسی - گرایش ژنتیک است که در سال ۱۳۹۱ در دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس به راهنمایی سرکار خانم/جناب آقای دکتر سلطانی، مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر سلیمانی و مشاوره سرکار خانم/جناب آقای دکتر ــــــــ از آن دفاع شده است.»

ماده ۳: به منظور جبران بخشی از هزینه‌های انتشارات دانشگاه، تعداد یک درصد شمارگان کتاب (در هر نوبت‌چاپ) را به «دفتر نشر آثارعلمی» دانشگاه اهدا کند. دانشگاه می‌تواند مازاد نیاز خود را به نفع مرکز نشر درمعرض فروش قرار دهد.

ماده ۴: در صورت عدم رعایت ماده ۳، ۵۰٪ بهای شمارگان چاپ شده را به عنوان خسارت به دانشگاه تربیت‌مدرس، تأدیه کند.

ماده ۵: دانشجو تعهد و قبول می کند در صورت خودداری از پرداخت بهای خسارت، دانشگاه می‌تواند خسارت مذکور را از طریق مراجع قضایی مطالبه و وصول کند؛ به علاوه به دانشگاه حق می‌دهد به منظور استیفای حقوق خود، از طریق دادگاه، معادل وجه مذکور در ماده ۴ را از محل توقیف کتابهای عرضه شده نگارنده برای فروش، تامین نماید.

ماده ۶: اینجانب سید علی موسوی زاده دانشجوی رشته زیست شناسی - ژنتیک مقطع کارشناسی ارشد تعهد فوق وضمانت اجرایی آن را قبول کرده، به آن ملتزم می شوم.

نام و نام خانوادگی: سید علی موسوی زاده

تاریخ و امضاء: ۹۲،۶،۳

دانشگاه تربیت مدرّس

دانشکده علوم زیستی

پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد ژنتیک

بررسی تأثیر بیش‌بیان miR-302f بر ژن هدف احتمالی TrkA و تأثیر آن بر چرخه سلولی در رده‌های سلولی HUH-7 و HEK293T

نام دانشجو:

سید علی موسوی زاده

استاد راهنما:

دکتر بهرام محمد سلطانی

استاد مشاور:

دکتر مسعود سلیمانی

بهمن ۱۳۹۱

تقدیر و تشکر

با سپاس ازسه وجود مقدس:

آنان که ناتوان شدند تا ما به توانایی برسیم...

موهایشان سپید شد تا ماروسفید شویم...

و عاشقانه سوختند تا گرمابخش وجود ما و روشنگر راهمان باشند...

پدرانمان

مادرانمان

استادانمان

چکیده

ژن‌های miRNA، بیان ژن‌های دیگر را با ممانعت از ترجمه و یا تجزیه رونوشت‌های هدف تنظیم می‌کنند و بیان غیرعادی آن‌ها در بدخیمی‌های مختلف گزارش شده است. ازطرفی، نقش اعضای خانواده گیرنده تیروزین کینازی نوروتروفینی همانند TrkA در سرطان‌های مختلف ازجمله در نوروبلاستوما شناخته شده است. در این تحقیق، به منظور شناسایی miRNAهای جدید که ممکن است رونوشت ژن TrkA را هدف قرار دهند و در پیش‌آگهی مبتلایان به سرطان به کار آیند، ابتدا یک بررسی بیوانفورماتیکی انجام گرفت. دو ناحیه حفظ شده در 3′-UTR رونوشت ژن TrkA وجود دارند که توسط چندین miRNA از جمله miR-302f شناسایی می‌شوند. بیان برخی از این miRNAها (همانند miR-188) بر طبق گزارشات درتومورهای نوروبلاستومایی افزایش می‌یابند ولی هیچ آنالیز تجربی درباره ارتباط خانواده miR-302s و TrkA در این تومورها وجود ندارد. در اینجا با استفاده از روش سنجش لوسیفراز نشان داده شد که miR-302f قادر به میانکنش با 3′-UTR مربوط به TrkA بوده و نسبت بیان رنیلا/لوسیفراز را در مقایسه با کنترل‌ها بیش از ۵۰ درصد کاهش می‌دهد. همچنین بیش بیان miR-302f باعث افزایش مرگ سلولی در رده سلولی سرطانی HUH-7 می‌گردد. در این سلول‌ها ژن TrkA دارای بیان بوده و بیش‌بیان miR-302f باعث کاهش بیان ژن TrkA و احتمالاً در افزایش مرگ سلولی مشاهده شده دخیل است.

واژگان کلیدی: نوروبلاستوما، miRNA، سنجش لوسیفراز، TrkA

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول

۱-۱-کشف miRNAها ۲

۱-۱-۱-بیوژنز miRNAها ۳

۱-۱-۲-عملکرد miRNAها ۴

۱-۲-پیش‌بینی بیوانفورماتیکی اهداف miRNA ۶

۱-۲-۱-اصول پیش‌بینی اهداف miRNAها ۶

۱-۳-معرفی تعدادی از روش‌های بیوانفورماتیکی پیش بینی اهداف miRNAها ۸

۱-۴-اثبات تجربی اهداف miRNA ۱۴

۱-۵-نقش miRNAها در فرآیندهای سلولی ۱۵

۱-۶-معرفی خانواده miR-302s ۱۶

۱-۷-ترانسفکشن سلول‌های انسانی با miRNAها ۲۰

۱-۷-۱-سلول‌های HEK293T ۲۱

۱-۸-ژن TRKA و نقش آن در تمایز سلولهای عصبی ۲۲

۱-۸-۱-نقش ژن TRKA در تومورهای نوروبلاستوما ۲۴

۱-۹-ضرورت انجام تحقیق ۲۷

۱-۱۰-اهداف تحقیق ۲۸

۱-۱۱-سئوالات تحقیق ۲۸

فصل دوم

۲-۱-بررسی‌های بیوانفورماتیکی ۳۰

۲-۲-آماده‌سازی DNA ژنومیک انسانی ۳۱

۲-۲-۱-آماده سازی بافرهای لازم ۳۱

۲-۲-۲-مراحل کار ۳۲

۲-۳-تکثیر و آماده‌سازی 3′-UTR مربوط به ژن TRKA و پیش‌ساز miR-188 ..... ۳۴

۲-۳-۱-طراحی پرایمرها با هدف کلونینگ ۳۴

۲-۳-۲-آماده‌سازی پرایمرها ۳۵

۲-۳-۳-واکنش PCR ۳۶

۲-۴-کلونینگ در وکتور TA ۳۷

۲-۴-۱-تخلیص محصولات PCR ۳۷

۲-۴-۲-واکنش الحاق ۳۸

۲-۴-۳-نحوه تهیه محیط کشت ۳۸
۲-۴-۳-۱-تهیه محیط کشت LB مایع حاوی آنتی‌بیوتیک ۳۸
۲-۴-۳-۲-محیط کشت LB جامد ۳۹
۲-۴-۴-نحوه تهیه سلول مستعد ۴۰
۲-۴-۵-ترانسفورماسیون ۴۱
۲-۴-۶-کلونی PCR برای انتخاب کلون‌های مثبت ۴۲
۲-۴-۷-استخراج پلاسمید در حجم کم ۴۳
۲-۴-۷-۱-تهیه محلول‌های لازم ۴۳
۲-۴-۷-۲-مراحل استخراج پلاسمید ۴۴
۲-۵-کلون سازی در وکتورهای اصلی ۴۶
۲-۵-۱-برش توسط آنزیم‌های محدودگر ۴۶
۲-۵-۲-طرز تهیه ژل آگارز ۴۷
۲-۵-۲-۱-مواد لازم ۴۷
۲-۵-۲-۲-روش کار ۴۷
۲-۵-۳-طرز تهیه بافر الکتروفورز ۴۸
۲-۵-۳-۱-مواد و وسایل لازم ۴۸

۲-۵-۴-رنگ آمیزی ژل آگارز.....۴۸

۲-۵-۵-تخلیص از ژل آگارز.....۴۹

۲-۵-۶-واکنش الحاق ۵۰

۲-۵-۷-تعیین توالی وکتور نهایی ۵۰

۲-۵-۸-استخراج پلاسمید در مقیاس زیاد ۵۰

۲-۶-مراحل اتاق کشت ۵۲

۲-۶-۱-مواد مورد استفاده جهت کشت سلول ۵۲

۲-۶-۲-پاساژ دادن سلول‌ها ۵۳

۲-۶-۳-فریزکردن سلول‌ها ۵۴

۲-۶-۴-دفریزکردن سلول‌ها ۵۵

۲-۶-۵-شمارش سلولی به وسیله لام نئوبار ۵۵

۲-۶-۶-ترانسفکشن و ترانسفکشن همزمان.....۵۶

۲-۶-۷-آنالیزچرخه سلولی به کمک تکنیک فلوسایتومتری ۵۸

۲-۶-۷-۱-مواد و وسایل لازم ۵۸

۲-۶-۷-۲-روش تهیه محلول ذخیره PI.....۵۸

۲-۶-۷-۳-روش تهیه محلول نهایی PI.....۵۸

۲-۶-۸-استخراج RNA از سلول‌ها ۵۹

۲-۶-۸-۱-مواد و وسایل لازم با هدف استخراج RNA..... ۵۹

۲-۶-۸-۲-بررسی کمی و کیفی RNAی استخراج شده ۶۱

۲-۶-۹-پرایمرهای Real Time PCR..... ۶۱

۲-۶-۹-۱-سنتز cDNA..... ۶۲

۲-۶-۱۰-آنالیز میانکنش 3′-UTR,miRNA با استفاده از سنجش لوسیفراز ۶۲

۲-۶-۱۰-۱-روش انجام تست ۶۳

فصل سوم

۳-۱-مطالعات بیوانفورماتیکی ۶۵

۳-۲-تکثیر طول کامل UTR و پیش‌ساز miR-188..... ۶۶

۳-۳-کلون سازی طول کامل UTR و پیش‌ساز miR-188 در وکتور TA..... ۶۷

۳-۴-کلون سازی طول کامل UTR در وکتور psiCHECK^{TM}-2..... ۶۸

۳-۵-کلون سازی پیش‌ساز miR-188 در وکتور PLEX_JRED_TurboGFP..... ۶۸

۳-۶-استخراج وکتورهای نوترکیب وکنترل‌های آن‌ها ۶۹

۳-۷-تأیید نهایی کلونینگ‌ها با روش توالی یابی ۷۱

۳-۸-بررسی بیان TRKA در رده‌های سلولی HUH-7,U87,A549.....۷۲

۳-۹-ترانسفکشن همزمان سلول‌های HEK293T.....۷۴

۳-۱۰-ترانسفکشن در رده سلولی HUH-7.....۷۶

۳-۱۰-۱-نتیجه استخراج RNA از سلول‌های HUH-7.....۷۶

۳-۱۰-۲-ساخت cDNA و کنترل کیفیت آن.....۷۷

۳-۱۱-نتایج تست چرخه سلولی برای بیش بیان پیش‌ساز miR-188.....۷۸

۳-۱۲-نتایج آنالیز چرخه سلولی برای miR-302f.....۸۰

فصل چهارم

۴-۱-اهمیت ژن TRKA.....۸۳

۴-۲-اهمیت miR-302f.....۸۳

۴-۳-سایت شناسایی miR-302f نزدیک جایگاه پلی آدنیلاسیون متناوب ژن TRKA..۸۴

۴-۴-تأیید میانکنش miR-302f با رونوشت ژن TRKA به روش سنجش لوسیفراز ۸۵

۴-۵-تأیید میانکنش miR-302f با رونوشت ژن TRKA در RT-PCR مقدماتی ۸۵

۴-۶-بررسی و آنالیز چرخه سلولی ۸۵

نتیجه‌گیری و پیشنهادات ۸۷

فصل پنجم

منابع ۸۹

فصل اول:

مقدمه

۱-۱-کشف miRNAها

در سال ۱۹۹۳ پشتکار و دیدگاه علمی گروهی از دانشمندان منجر به کشف بزرگی در زیست‌شناسی گردید. ویکتورآمبروس و همکارانش کشف کردند که ژن lin-4 که در کنترل رشد و نمو مرحله لاروی در c-elegans نقش دارد، به جای کد کردن پروتئین، یک جفت RNA کوچک را تولید می‌کند (R. C. Lee et al. 1993). یکی از RNAها تقریباً ۲۲ نوکلئوتید طول داشت در حالی که طول دیگری ۶۱ نوکلئوتید بود. RNA بزرگتر که ساختاری لوپی شکل را ایجاد می‌کرد پیش‌ساز تولید RNA کوتاه در نظر گرفته شد (Bartel 2004).

RNAی کوتاه، دارای چندین جایگاه مکمل در ژن کدکننده lin-14 بود. این نواحی مکمل در بخش ´3-UTR این ژن قرار گرفته بودند که دو سال قبل توسط وایتمن و همکارانش پیشنهاد شده بود که در مهار lin-14 توسط lin-4 اهمیت دارند (Wightman et al. 1991).

این RNA در حقیقت اولین miRNA بود که با جفت شدن نواحی مکمل در بخش ´3UTR ژن lin-14 باعث کاهش سطح پروتئین مربوط به این ژن بدون تأثیر در سطح رونویسی می‌شد.

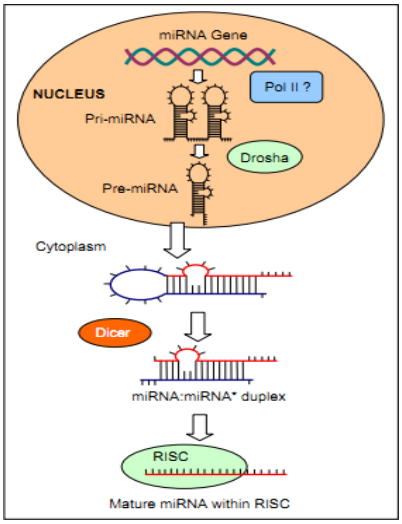
تا هفت سال پس از شناسایی lin-4 هیچ شاهدی برای RNAهای شبیه آن وجود نداشت و هیچ RNA غیرکدکننده‌ای نیز در نماتودها یافت نشد. این وضعیت با شناسایی let-7 تغییر کرد. این ژن نیز در مسیرهای زمانبندی نمو c-eleganse نقش داشت و دومین RNA تنظیمی ۲۲ نوکلئوتیدی را کد می‌کرد (A E Pasquinelli 2000). مدت زمانی پس از کشف let-7 ژن‌های هومولوگ آن و نیز RNA مربوط به آن در ژنوم انسان و برخی گونه‌های دیگر نیز کشف گردید (A E Pasquinelli 2000).

درکمتر از یک سال، چندین miRNA دیگر در انسان و سایر موجودات کشف شد که محصولات RNA مربوط به تمام این ژن‌ها مشابه RNAهای let-7 و lin-4 بودند و همگی RNAهای کوچک ۲۲ نوکلئوتیدی را تولید می‌کردند که حفظ شدگی ژن تمام آن‌ها مشهود بوده و از خصوصیات مهم این RNAها بیان مخصوص در مراحل تمایز و یا در سلول‌های بافتی مشخص بود (Lagos-Quintana et al. 2001).

مطالعه miRNAها دارای جنبه‌های مختلفی نظیر کشف ژن‌های miRNA، بررسی مکانیسم تولید و عملکرد miRNAها و بررسی نقش miRNAهاست.

۱-۱-۱-بیوژنز miRNAها

در اغلب موارد ژن‌های miRNA در مجاورت ژن‌های مورد هدف آن‌ها در ژنوم قرار ندارند (Bartel 2004). به همین علت رونویسی آن‌ها کاملاً مستقل بوده و این miRNAها احتمالاً دارای پروموتورهای اختصاصی خود می‌باشند. علاوه بر این برخی از ژن‌های miRNA به صورت کلاستر ژنی بوده و احتمالاً دارای پروموتر اختصاصی خود می‌باشند. ژن‌های این کلاسترها معمولاً از یک خانواده بوده و دارای عملکرد مرتبط با یکدیگر می‌باشند (Bartel 2004). برخی از ژن‌های miRNA در اینترون ژن‌های کدکننده پروتئین‌ها می‌باشند که بیان این miRNAها اغلب تحت تأثیر بیان ژن‌های میزبان است. بیان ژن‌های miRNA در اینترون‌های ژن-های کد کننده و بیان بسیاری از miRNAها به وسیله RNA پلیمراز II واحتمالاً بیان برخی دیگر نیز به وسیله RNA پلیمراز III انجام می‌گیرد (Bartel 2004). فرآیند رونویسی از ژن‌های miRNA منجر به تولید رونوشت اولیه (Pri-miRNA) می‌گردد که دارای طول بلندتر نسبت به پیش‌ساز miRNA می‌باشد. پیش‌ساز miRNA و یا Pre-miRNA از برش Pri-miRNA توسط آنزیم Drosha تولید می‌گردد. پیش‌ساز miRNA دارای طول 70-60 نوکلئوتید بوده و دارای ساختار لوپی شکل است. این ساختار پس از تولید از هسته به سیتوپلاسم منتقل می‌شود. سپس عملکرد آنزیم دیگری به نام Dicer منجر به تولید دورشته miRNA:miRNA* می‌گردد. هنگامی که داپلکس miRNA به کمپلکس RISC وارد می‌شود، دو رشته جدا شده و یکی از رشته‌ها تجزیه می‌گردد (Bartel 2004).



شکل ۱-۱ بیوژنز miRNAها(Brown & Sanseau 2005)

۱-۱-۲-عملکرد miRNAها

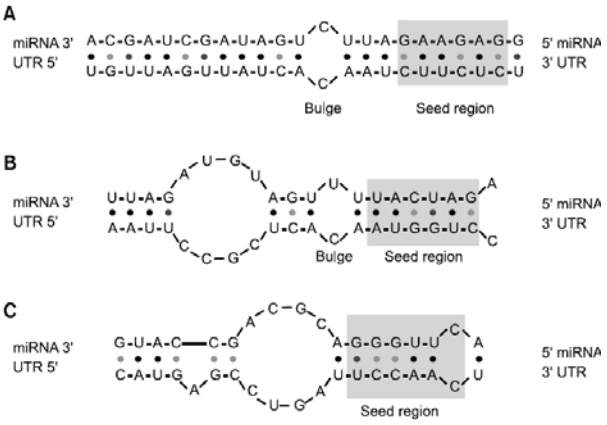
ژن‌های miRNA، بیان ژن‌ها را با دو مکانیسم تنظیم می‌کنند. miRNAها به کمپلکس RISC متصل شده و با هدایت آن به سوی رونوشت هدف باعث تجزیه mRNA شده و یا اینکه ترجمه را مهار می‌کنند (Bartel 2009).

تجزیه miRNA و یا ممانعت از ترجمه به میزان جفت‌شدگی miRNA با رونوشت هدف بستگی دارد. شواهد زیادی وجود دارد که جفت شدگی کامل miRNA با رونوشت هدف منجر به تجزیه mRNA می‌گردد. کمپلکس RISC دارای حداقل یک پروتئین آرگونات است که با miRNA همراه می‌باشد. خانواده پروتئین-های آرگونات دارای چند عضو متفاوت بوده و تجزیه رونوشت هدف و یا ممانعت از ترجمه، همچنین بستگی به پروتئین آرگوناتی دارد که با miRNA همراه است، به عنوان مثال Ago2 مسئول برش رونوشت‌ها توسط RISC است(Meister et al. 2004) ، اگرچه miRNAها اغلب در ممانعت از ترجمه نقش دارند.

اولین باری که مشاهده شد بدون تغییر در مقدار mRNAی هدف، میزان پروتئین کاهش می‌یابد، شناسایی مهار ترجمه lin-14 توسط miRNAی lin-4 بود. به نظر می‌رسد miRNAها در پستانداران، مهار ترجمه را

بر تجزیه mRNA ترجیح می‌دهند. عمل تعاونی کمپلکس‌های RISC، نشان‌دهنده کارایی بیشتر ممانعت ترجمه‌ای است، به همین علت، چندین جایگاه شناسایی[1] miRNAها در 3′-UTR برخی رونوشت‌های هدف وجود دارند (Bartel 2004). یک ژن می‌تواند دارای چندین جایگاه شناسایی برای یک miRNA و یا چند miRNA باشد[2] که به نظر می‌رسد این جایگاه‌ها مستقل از یکدیگر عمل کرده و تعداد جایگاه‌ها باعث افزایش تأثیر miRNAها می‌شود(Selbach et al. 2008)(Grimson et al. 2007).

ژن‌های miRNA اغلب با اتصال به جایگاه‌های خود در بخش 3′-UTR رونوشت‌های هدف عمل می‌کنند، اگرچه این جایگاه‌های شناسایی می‌توانند در بخش 5′-UTR و یا چارجوب رونویسی نیز باشند (Bartel 2009). اگرچه تعداد زیادی از جایگاه‌های هدف در ORFها وجود دارند، به نظر می‌رسد که این جایگاه‌ها دارای اثر کمتری نسبت به جایگاه‌های شناسایی در 3′-UTR باشند. جایگاه‌های هدف در 5′-UTR کمیاب می‌باشند. از آنجا که ریبوزوم‌ها از سمت کلاهک به سمت 3′-UTR حرکت می‌کنند، به نظر می‌رسد که کمپلکس‌های خاموش‌کننده با اتصال به 5′-UTR و یا ORF جایگزین ریبوزم‌های مسئول ترجمه می‌شوند.



شکل ۱-۲ الگوهای مختلف جفت‌شدن و میانکنش miRNA با رونوشت هدف(Min & Yoon 2010)

[1] - Recognition site
[2] - miRNA Redundancy

۱-۲-پیش‌بینی بیوانفورماتیکی اهداف miRNA[1]

اولین قدم در جستجوی ژن‌های موردهدف توسط miRNAها بررسی و آنالیز توالی ژن‌ها با استفاده از الگوریتم‌های محاسباتی مختلف است که با استفاده از پارامترهای مختلف احتمال جایگاه‌های عملکردی اتصال miRNA را در رونوشت‌های هدف پیش‌بینی می‌کنند.

۱-۲-۱-اصول پیش‌بینی اهداف miRNAها

۱- جفت شدگی توالی‌ها:

در جانوران جفت شدن miRNA با رونوشت ژن هدف، اغلب براساس نوکلئوتیدهای ابتدایی ´5 مربوط به miRNA (نوکلئوتیدهای ۷-۲)[2] صورت می‌گیرد. علاوه بر جفت‌شدگی این ناحیه، جفت شدن انتهای ´3 از miRNA نیز در شناسایی رونوشت‌های هدف اهمیت دارد. این ناحیه می‌تواند اختصاصیت[3] اتصال و همچنین میل اتصال را افزایش دهد (Brennecke et al. 2005). مطالعات تجربی نشان می‌دهد که براساس این ناحیه، جایگاه‌های اتصال مربوط به رونوشت ژن هدف به سه گروه تقسیم می‌شوند:(شکل۱-۲)

i- اتصال miRNA و جایگاه هدف از طریق جفت شدن کامل نوکلئوتیدهای ابتدای ´5 مربوط به miRNA با نوکلئوتیدهای جایگاه هدف و گسترش آن به انتهای دیگر miRNA.

ii- اتصال miRNA از طریق جفت شدن کامل نوکلئوتیدهای ابتدای ´5 مربوط به miRNA با نوکلئوتیدهای جایگاه هدف و جفت شدن جزئی انتهای دیگر miRNA با جایگاه هدف

[1] -target prediction
[2] - Seed region
[3] -specifity