

**Universidade de São Paulo
Escola de Artes, Ciências e Humanidades**

Sistemas de Informação

**ESTUDO DE SÍTIOS ALVOS DE MICRORNAS
PRESENTES FORA DE REGIÕES
3' UTR DE MRNAS**

Orientado:

Gabriel Di Pardi Arruda

Orientadora:

Profa. Arianne Machado Lima

1 Introdução

Esse trabalho insere-se no campo da Bioinformática, em particular com foco nos estudos dos microRNAs, uma descoberta relativamente recente da biologia com importante papel na regulação da síntese de proteínas e envolvimento em várias doenças, como câncer e diabetes (Chen et al., 2008), portanto é de grande importância o estudo de seu funcionamento e o que pode afetá-lo.

Os microRNAs (miRNAs) são uma classe específica de RNAs, porém menores e não codificantes. Sua função é silenciar alvos específicos do RNA mensageiro (mRNA), regulando assim sua estabilidade e tradução. Um mesmo miRNA pode regular milhares de alvos, assim como um único mRNA pode ser regulado por vários miRNAs (Chen et al., 2008).

Os miRNAs, tendo aproximadamente 21 nucleotídeos de comprimento, se ligam aos seus sítios no mRNA alvo por meio de complementaridade de bases parcial. É justamente essa complementaridade parcial que permite que o miRNA se ligue a vários sítios de sequências distintas, tornando mais difícil a predição computacional de alvos (Chu e Rana, 2007).

Há cinco tipos conhecidos de sítios de ligação de miRNAs: canônico, 3' compensatório, sítio com pareamento central, sítio com pareamento central sem envolvimento de seed e pivô. O sítio canônico possui de sete a oito pareamentos em uma região chamada seed, que envolve os nucleotídeos 2-8 contando a partir do extremo 5' do microRNA (Bartel, 2009; Witkos et al., 2011; Moore et al., 2015). O sítio 3' compensatório apresenta pareamento ruim na região seed, com presença de pelo menos uma base não pareada no meio dessa região, mas compensado por uma boa complementaridade na região dos nucleotídeos 13-16 (acima de quatro nucleotídeos) do miRNA (Bartel, 2009). O sítio de pareamento central possui 11-12 pareamentos contíguos de Watson-Crick na região central (nucleotídeos 4-15) (Shin et al., 2010). O pareamento central sem envolvimento de seed apresenta pareamentos confinados ao meio e ao extremo 3' do microRNA (Helwak et al., 2013). Já o sítio pivô possui um pivô no nucleotídeo 6, com pareamento das bases 2-6 e arqueamento nas regiões 5-6 (Chi et al., 2012).

Há atualmente várias ferramentas computacionais destinadas à predição de alvos de miRNAs em animais (citar revisões). Cada uma delas se baseia em características envolvidas na ligação entre o miRNA e seu alvo, dentre elas: padrão de pareamento de bases, estabilidade termodinâmica do miRNA-mRNA, conservação evolutiva, acessibilidade do sítio alvo e quantidade de sítios alvos (Min e Yoon, 2010; Piovezani, 2013).

Acreditava-se que os miRNAs se ligavam somente à região 3'UTR do mRNA pelo extremo 5' (região seed) (Lewis et al., 2005). Entretanto, estudos mostram que os miRNAs podem se ligar também às regiões 5'UTR e CDS do mRNA, e promotora do DNA (Ørom et al., 2008; Chi et al., 2009; Hafner et al., 2010; Toscano-Garibay e Aquino-Jarquín, 2012). Além disso, os miRNAs também podem se ligar em sequências de outros RNA não codificadores (Zisoulis et al., 2012). No entanto, a maioria das ferramentas computacionais baseiam-se em

características oriundas apenas dos estudos com sítios alvos presentes na região 3' UTR de RNAs mensageiros. Logo, carece-se de um estudo com os sítios alvos presentes fora dessa região.

2 Objetivos

Este projeto de Iniciação Científica tem como objetivo realizar um estudo dos sítios alvos de miRNAs presentes em regiões fora da 3' UTR de RNAs mensageiros, incluindo sítios em RNAs não codificantes e em DNA, a fim de verificar se as características utilizadas pelas ferramentas computacionais de predição de sítios alvos de miRNAs são invariantes à região onde se localiza o sítio, e se tais ferramentas conseguiriam, com igual acurácia, identificar os sítios alvos independente de sua localização.

3 Metodologia

Para cumprir os objetivos acima mencionados, serão realizadas as seguintes etapas:

1. Levantamento dos sítios alvos de miRNAs, validados, e dividi-los em 5 grupos de acordo com sua localização: 5' UTR de mRNAs, CDS de mRNAs, 3' UTR de mRNAs, RNAs não codificantes e DNA. Esse levantamento será realizado em bancos de dados públicos que contenham sítios validados de miRNAs, como o miRecords (Xiao et al., 2009), TarBase (Paraskevopoulou et al., 2016), miRTarBase (Chou et al, 2016), miR2Disease (Jiang et al, 2009) e miRWalk (Dweep et al, 2011; Dweep et al, 2014). Poderão ser considerados também experimentos de CLASH (*Cross-linking, Ligation and Sequencing of Hybrids*) específicos de miRNAs. CLASH é uma técnica que identifica interações RNA–RNA ocorridas em um complexo proteico, dos bancos doRiNA (Blin et al, 2015), starBase (Li et al, 2014) e PolymiRTS (Bhattacharya et al, 2014).
2. Executar análises sobre todos esses sítios a fim de identificar se há diferença significativa entre esses 5 grupos de sítios. Essas análises incluem (mas não se restringindo a) :
 - a. executar as ferramentas de predição computacional de sítios alvos nessas regiões para verificar se as medidas de desempenho são diferentes entre as regiões;
 - b. cálculo da energia termodinâmica entre o sítio alvo e o respectivo miRNA utilizando o programa RNAduplex;

- c. cálculo de acessibilidade do sítio considerando a estrutura conformacional da molécula alvo;
- d. cálculo da proporção dos tipos de *seed* utilizada pelos sítios em cada grupo;
- e. levantamento de outras características relevantes e análises das mesmas.

4 Cronograma

Atividade	Bimestre					
	1	2	3	4	5	6
1 - Levantamento de sítios alvos de miRNAs	x					
2a - Execução de ferramentas de predição	x	x				
2b - Cálculo de energia de ligação do duplex			x			
2c - Cálculo de acessibilidade do sítio			x			
2d - Cálculo das proporções dos tipos de <i>seed</i>			x	x		
2e - Levantamento e análise de outras características				x	x	x
Escrita de artigo científico					x	x
Escrita do relatório final	x	x	x	x	x	x

Referências

Bartel DP. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. Cell. 2009 jan 23;136(2):215-33.

Bhattacharya A, Ziebarth JD, Cui Y. PolymiRTS Database 3.0: linking polymorphisms in microRNAs and their target sites with human diseases and biological pathways. Nucleic Acids Res. 2014 Jan;42(Database issue):D86-91.

Blin K, Dieterich C, Wurmus R, Rajewsky N, Landthaler M, Akalin A. DoRiNA 2.0--upgrading the doRiNA database of RNA interactions in post-transcriptional regulation. *Nucleic Acids Res.* 2015 Jan;43(Database issue):D160-7.

Chen X, et al. (2008). Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Research* (2008) **18**:997–1006.

Chou CH, Chang NW, Shrestha S, Hsu SD, Lin YL, Lee WH et al.. miRTarBase 2016: updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016 Jan 4;44(D1):D239-47.

Chu CY, Rana TM. Small RNAs: regulators and guardians of the genome. *J Cell Physiol.* 2007;213:412-19.

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 Oct;44(5):839-47.

Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods Mol Biol.* 2014;1182:289-305.

Hafner M, Landthaler M, Burger L, Khorshid M, Hausser J, Berninger P et al.. Transcriptome-wide identification of RNA-binding protein and microRNA target sites by PAR-CLIP. *Cell.* 2010 Apr 2;141(1):129-41.

Helwak A, Kudla G, Dudnakova T, Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell.* 2013 Apr 25;153(3):654-65.

Jiang Q, Wang Y, Hao Y, Juan L, Teng M, Zhang X et al.. miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res.* 2009 Jan;37(Database issue):D98-104.

Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* 2005;120: 15–20.

Li JH1, Liu S, Zhou H, Qu LH, Yang JH. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2014 Jan;42(Database issue):D92-7.

Min H, Yoon S. Got target?:computational methods for microRNA target prediction and their extension. *ExpMol Med*. 2010 Apr 30;42(4):233-44.

Moore MJ, Scheel TK, Luna JM, Park CY, Fak JJ, Nishiuchi E et al. miRNA-target chimeras reveal miRNA 3'end pairing as a major determinant of Argonaute target specificity. *Nat Commun*. 2015 nov 25;6:8864.

Paraskevopoulou MD^{1,2}, Vlachos IS^{1,2}, Hatzigeorgiou AG^{1,2}. DIANA-TarBase and DIANA Suite Tools: Studying Experimentally Supported microRNA Targets. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2016 Sep 7;55:12

Piovezani AR. SIMTar: Uma ferramenta para predição de SNPs interferindo em sítios alvos de microRNAs[dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Programa de Interunidades em Bioinformática; 2013.

Shahi P, Loukianiouk S, Bohne-Lang A, Kenzelmann M, Küffer S, Maertens S et al.. Argonaute--a database for gene regulation by mammalian microRNAs. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(Database issue):D115-8.

Shin C, Nam JW, Farh KK, Chiang HR, Shkumatava A, Bartel DP. Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing. *Mol Cell*. 2010 jun 25;38(6):789-802.

Toscano-Garibay, J. D. & Aquino-Jarquín, G. Regulation exerted by miRNAs in the promoter and UTR sequences: MDR1/P-gp expression as a particular case. *DNA Cell Biology* 2012;31:1358–64.

Witkos TM, Koscińska E, Krzyżosiak WJ. Practical aspects of microRNA target prediction. *CurrMol Med*. 2011 Mar;11(2):93-109.

Xiao, F., Zuo, Z., Cai, G. & et al. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* 2009;37:D105–D110.

Zisoulis, D. G., Kai, Z. S. & Chang, R. K. (2012). Autoregulation of microRNA biogenesis by let-7 and Argonaute. *Nature* **486**, 541-544.

Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460-71.

