

استفاده از الگوریتم CTAnalyzer به منظور شناسایی توالی‌های کاندید

Azadirachta indica در ژنوم pri-microRNA

Utilization of CTAnalyzer algorithm to identify pri-microRNA candidate sequences in the genome of *Azadirachta indica*

سبحان عطائی^۱، جعفر احمدی^{۲*}، سید امیر مرعشی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمينی (ره)، قزوین، ایران

۲- استاد، گروه ژنتیک و به‌نژادی گیاهی، دانشگاه بین‌المللی امام‌خمينی (ره)، قزوین، ایران

۳- دانشیار، گروه بیوتکنولوژی، پردیس علوم، دانشگاه تهران، تهران، ایران

Ataei S¹, Ahmadi J^{*2}, Marashi SA³

1- PhD Student, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

2- Professor, Department of Genetics and Plant Breeding, Imam Khomeini International University, Qazvin, Iran

3- Associate Professor, Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, Tehran, Iran

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: j.ahmadi@eng.ikiu.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۷/۲۸)

چکیده

ساختارهایی که مولکول‌های microRNA بالغ از آن‌ها حاصل می‌شوند (pri-microRNA و pre-microRNA) دارای ویژگی‌های به‌خصوصی هستند که آن‌ها را از مولکول‌های مشابه، متمایز ساخته و برای آنزیم‌ها و پروسورها قابل شناسایی می‌نماید. این خصوصیات عمدتاً متأثر از ویژگی‌های ساختار ثانویه مولکول RNA است. به همین دلیل، تا به امروز الگوریتم‌های متعددی به‌منظور پیش‌بینی ساختار ثانویه برای توالی‌های پلی‌نوکلئوتید طراحی شده است. نرم‌افزار CTAnalyzer الگوریتمی است که با هدف رقوم‌سازی ویژگی‌های ساختارهای ثانویه مولکول RNA طراحی شده و طبقه‌بندی این ساختارها را با محوریت ویژگی‌های مهم در شناسایی مولکول‌های microRNA انجام می‌دهد. در تحقیق حاضر، نرم‌افزار CTAnalyzer با تعریف فیلترها و ضوابط مناسب، برای بررسی و طبقه‌بندی ساختارهای ثانویه استخراج شده از توالی ژنوم گیاه *Azadirachta indica* مورد استفاده قرار گرفت و هدف از این پژوهش، بررسی کارآمدی این نرم‌افزار در شناسایی جزئیات ساختاری RNA دو رشته‌ای و دسته‌بندی توالی‌ها بر مبنای ویژگی‌های ساختارهای ثانویه آن‌ها بود. برای این منظور هم‌ردیفی بین ژنوم *A. indica* و تمام توالی‌های miR گیاهی به‌وسیله الگوریتم BLASTn انجام گرفت و تعداد ۸۰۲۱۷ ناحیه در سراسر ژنوم *A. indica* با هومولوژی قابل قبول شناسایی شدند. پس از گسترش طولی نواحی شناسایی شده در هم‌ردیفی و حذف توالی‌هایی که در نواحی کدکننده ژنوم قرار داشتند، برای ۳۸۰۶۷ توالی باقی‌مانده پیش‌بینی ساختار ثانویه انجام گرفت. مقادیر مورد توافق برای ضوابط مربوط به ساختارهای ثانویه microRNA در فیلتر نرم‌افزار CTAnalyzer تعریف شد و این نرم‌افزار موفق به شناسایی و معرفی توالی‌های کاندید microRNA شد. بر اساس نتایج نرم‌افزار CTAnalyzer از کل ۵۶۶۷۵۴ ساختار ثانویه مورد بررسی برای شناسایی microRNAهای ژنوم *A. indica* تعداد ۴۸۲ ساختار ثانویه (۰/۰۸ درصد) با دارا بودن تمام ویژگی‌های مورد تایید برای microRNAها شناسایی شدند.

واژه‌های کلیدی

بیوانفورماتیک

ساختار ثانویه

Azadirachta indica
CTAnalyzer
microRNA

مقدمه

مولکول RNA سلولی، در بخش عمده‌ای از تاریخ زیست‌شناسی مولکولی تنها به‌عنوان واسطه‌ای بین DNA و پروتئین مورد توجه قرار گرفته است. کشف خاصیت کاتالیزوری RNA و توانایی آن در ایفای وظیفه‌ای جدید که تصور می‌شد منحصر به مولکول‌های پروتئین است، این دیدگاه را به‌کلی تغییر داد و جایگاه متمایزی برای مولکول RNA در دنیای زیست‌شناسی مولکولی ایجاد کرد (Mathews et al. 2010). عملکرد RNA مکمل^۱، به‌عنوان فاکتوری فعال در ممانعت از ترجمه RNAهای کدکننده، در اوایل دهه ۱۹۸۰ مورد توجه قرار گرفت (Izant and Weintraub 1984). همچنین (Fire et al. 1998) اثبات کردند که RNA در رشته‌ای در گونه *C. elegans* در فرایند خاموشی ژن^۲ نقش دارد (Fire et al. 1998). این یافته‌ها سنگ بنای مطالعات بعدی در خصوص نقش مولکول‌های RNA کوچک (sRNA) در تنظیم بیان ژن بودند. تا کنون انواع مختلفی از مولکول‌های RNA کوچک شناسایی شده است که microRNAها و RNAهای کوچک مداخله‌گر^۳ از مهم‌ترین انواع آن‌ها هستند. این مولکول‌ها که دارای توالی‌هایی به‌طول تقریبی ۱۹ الی ۲۵ نوکلئوتید هستند، اغلب در نتیجه ایجاد برش بر روی مولکول‌های دو رشته‌ای بلندتر با ساختار سنجاق‌سری ایجاد می‌شوند (Knip et al. 2014). فرآیند خاموشی ژن که از مسیرهای تنظیم بیان ژن است، به‌واسطه اندرکنش RNAهای کوچک (miRNAs و siRNAs) با پروتئین‌های آرگونات و تشکیل ساختاری تحت عنوان ریسک (RISC)^۴ رخ می‌دهد. در این فرایند، انطباق مولکول RNA کوچک موجود در این مجموعه با قسمتی از توالی هدف، در انجام این وظیفه نقش کلیدی دارد. مکانیزم خاموشی ژن بر مبنای RNA، چه در مرحله پیش از رونویسی و چه در مرحله پس از رونویسی، در یوکاریوت‌ها دارای ماهیت حفاظت شده است (Chang et al. 2012; Axtell 2013). فرآیند خاموشی ژن با هدایت RNAهای کوچک^۵ در هسته، از طریق ایجاد اختلال در

فعالیت RNAPol II (Allo and Kornblihtt 2010)، القاء تغییرات اپی‌ژنتیک بر روی هیستون‌ها (Castel and Martienssen 2013) و متیلاسیون DNA (Agrawal et al. 2003; Martínez de Alba et al. 2013) اتفاق می‌افتد. از طرف دیگر، خاموشی ژن پس از رونویسی با مداخله RNA^۶ در سیتوزول از طریق شکافت در mRNA و یا از طریق ممانعت از ترجمه با هدایت مولکول‌های RNA کوچک صورت می‌گیرد (Agrawal et al. 2003). در تمامی مسیرهای فوق‌الذکر که تحت عنوان مداخله RNA (RNAi)^۷ طبقه‌بندی می‌شوند (Knip et al. 2014) ساختار سنجاق‌سری RNA^۸ نقش کلیدی ایفا می‌کند.

ساختار سنجاق‌سری یکی از ساختارهای مهم RNA بوده و در تاخوردگی مولکول RNA، اندرکنش‌های مرتبط با ریبوزوم، حفاظت از mRNA در مقابل عوامل تجزیه کننده، عملکرد به‌عنوان موتیف قابل شناسایی برای پروتئین‌های متصل شونده به RNA و عملکرد به‌عنوان سوپسترا در واکنش‌های آنزیمی نقش بنیادی دارد. در این ساختار که متشکل از یک ساقه دو رشته‌ای و یک حلقه انتهایی می‌باشد، نوکلئوتیدهای قسمت ساقه به‌طور کامل مکمل یکدیگر نبوده و اغلب در این ناحیه تعدادی عدم انطباق، بیرون زدگی‌های یک طرفه (Bulges) و حباب‌های داخلی (Internal loops) متقارن یا غیر متقارن مشاهده می‌شود (Tian et al. 2004; Svoboda and Di Cara 2006; Popena et al. 2010). ساختارهای سنجاق‌سری ممکن است در نتیجه رونویسی از نواحی تکراری معکوس شده‌ی DNA توسط آنزیم‌های رونوشت بردار وابسته به DNA^۹ ایجاد شوند. در مسیری دیگر، ممکن است الگوی قرارگرفتن ناحیه‌ی پیچ خورده‌ی RNA، برای سنتز ادامه‌ی رشته توسط آنزیم رونوشت بردار وابسته به RNA^{۱۰}، موجب تولید رشته‌ی مکمل و شکل‌گیری ساختار سنجاق‌سری شود. البته حالت دوم که رخدادی غیر متداول است، منجر به تولید دوبلکس‌های بلند RNA با انطباق بالا شده و منحصراً در برخی ویروس‌ها مشاهده می‌شود (Behrens et al. 1996).

⁶ PTGS/RNAi: post-transcriptional Gene silencing RNA interference

⁷ RNAi: RNA interference

⁸ RNA hairpin structure

⁹ DNA-dependent RNA polymerase

¹⁰ RNA-dependent RNA polymerase

¹ anti-sense RNA

² Gene silencing

³ small-interfering RNAs

⁴ RISC: RNA induced silencing complex

⁵ sRNA-guided transcriptional Gene silencing

نتایج آزمایشی نشان داد که بیش از یک سوم microRNAهای بالغ در *C. elegans* با microRNAهای انسان هومولوگ هستند (Lim et al. 2003)؛ ولی با انتقال پیش‌ساز این microRNAهای هومولوگ به سلول انسانی، فرایند تبدیل این پیش‌سازها به microRNA بالغ صورت نمی‌گیرد (Auyeung et al. 2013). این مطلب، شاهی بر لزوم توجه بیشتر بر روی ساختارهای فراتوالی در این گونه مطالعات است. اساساً مطابق با دستورالعمل ارائه شده توسط Axtell and Meyers (2018)، حفاظت شده بودن توالی جزو ضوابط و ملزومات شناسایی بیوانفورماتیکی ساختارهای مسیر بیوستز microRNA نیست؛ چرا که اولاً شواهدی بر این الزام وجود ندارد و دوم اینکه مولکول‌های RNA متفرقه فراوانی در سلول وجود دارد که علی‌رغم شباهت در توالی، در مسیر بیوستز microRNA قرار نمی‌گیرند (Axtell and Meyers 2018).

در سال‌های اخیر با توجه به سهولت به‌وجود آمده در توالی‌یابی اسیدهای نوکلئیک و وفور داده‌های NGS، رویکرد غیر آزمایشگاهی و به‌کارگیری توابع و الگوریتم‌های رایانه‌ای به‌منظور بررسی ساختار و پیش‌بینی عملکرد توالی‌های اسیدهای نوکلئیک به‌خصوص microRNA مورد اقبال گسترده محققین این زمینه قرار گرفته است. این قبیل مطالعات می‌تواند به‌عنوان مقدمه‌ای بر آزمایشات مولکولی، موجب صرفه‌جویی در زمان و هزینه شده و بر احتمال حصول نتایج مطلوب بیفزاید. در حالت کلی، شناسایی microRNA در موجودات زنده با استفاده از اطلاعات حاصل از توالی‌یابی به دو روش انجام می‌گیرد. روش اول که بر مبنای بررسی هومولوژی بین توالی‌های کاندید و miRهای شناسایی شده در سایر موجودات می‌باشد، از ماهیت حفاظت‌شدگی miRNA بهره‌جسته و با شناسایی این توالی‌ها در نواحی غیر کدکننده و همچنین شناسایی مکمل توالی‌های فوق‌الاشاره (به‌عنوان ناحیه هدف miRNA) در نواحی کدکننده ژنوم یا ESTهای موجود، اقدام به معرفی miRهای کاندید می‌نماید. بدیهی است این روش که بر مبنای هومولوژی با miRهای حفاظت‌شده درون گونه‌ای و بین گونه‌ای عمل می‌کند، منجر به شناسایی miRهای جدید نمی‌شوند (Mendes et al. 2009; Kleftogiannis et al. 2013). در روش دوم، الگوریتم‌های

طبقه‌بندی ساختارهای سنجاق‌سری کار دشواری است؛ چرا که ساختارهایی از این دست به آسانی و با فراوانی بالا به‌وجود آمده و از جنبه‌های ساختاری متعددی مانند موقعیت بر روی رشته RNA، طول ساقه، بزرگی حلقه انتهایی، محل و موقعیت بیرون زدگی‌ها و در نهایت توالی نوکلئوتیدی با یکدیگر تفاوت دارند. از لحاظ عملکردی نیز ساختارهای سنجاق‌سری دارای قابلیت تنظیم بیان ژن به‌صورت سیس و ترنس هستند که در حالت سیس، ساختار تشکیل شده روی مولکول mRNA صرفاً بیان همان مولکول را تحت تأثیر قرار می‌دهد؛ ولی در حالت ترنس، این ساختار در القای اثر کترلی بر روی مولکول ژنتیکی دیگری نقش دارد. ساختارهای سنجاق‌سری به‌عنوان جایگاه اتصال برای بسیاری از پروتئین‌ها و به‌عنوان پیش ماده در بسیاری از واکنش‌های آنزیمی نقش داشته و بعضاً به‌صورت مستقیم عملکرد آنزیمی از خود نشان می‌دهند (Svoboda and Di Cara 2006). اولین مشاهدات مبنی بر مداخله مولکول RNA با ساختار سنجاق‌سری در تنظیم بیان ژن، به ساختار سنجاق‌سری ۶۱ نوکلئوتیدی یا RNA تک رشته‌ای ۲۲ نوکلئوتیدی Lin-4 که یک توالی غیرقابل ترجمه است مربوط می‌شود که این مولکول RNA با اتصال به ناحیه 3'UTR موجب کاهش بیان ژن *lin-14* در *C. elegans* می‌شود (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993; Bartel 2004). علی‌رغم وجود یافته‌هایی از این دست، تشخیص نقش microRNAها به‌عنوان یکی از شایع‌ترین ابزارهای تنظیم بیان ژن در یوکاریوت‌ها طی فرایند RNAi و نقش ساختار سنجاق‌سری در بیوستز microRNA بیش از یک دهه به‌طول انجامید (Fire et al. 2000; Zamore et al. 1998). فرایند تولید microRNA هسته و با رونویسی microRNA اولیه توسط RNA pol-II آغاز می‌شود (Du and Zamore 2005; Ha and Kim 2014). شایان ذکر است با وجود شباهت‌های بسیار زیاد در مسیر بیوستز و مکانیزم‌های اثر مولکول‌های RNA کوچک در کنترل بیان ژن، هیچ‌یک از اجزای فرایند در بین موجودات مختلف به‌خصوص گیاهان، در سطح توالی کاملاً حفاظت‌شده نبوده (Lagos-Quintana et al. 2001; Lee and Ambros 2001; Auyeung et al. 2013) و بیشترین سطح حفاظت‌شدگی در توالی miRNA بالغ دیده می‌شود (Reinhart et al. 2002). در تأیید این مطلب

BLASTn از مجموعه BLAST+ (Sayers et al. 2019) با تنظیمات مناسب برای توالی‌های کوتاه، برای بررسی هومولوژی بین قطعات مورد استفاده قرار می‌گیرد. تاکنون الگوریتم‌های متعددی به منظور پیش‌بینی ساختار ثانویه توالی‌های پلی‌نوکلئوتید طراحی شده و مورد استفاده قرار گرفته است که نرم‌افزار و وب سرویس‌های mFOLD (Zuker 2003)، RNAstructure (Reuter and Mathews 2010)، SPOR-RNA (Singh et al. 2019)، RNAsoft (Andronescu et al. 2003) و RNAfold از مجموعه Vienna RNA package (Lorenz et al. 2011) از این جمله هستند. صرف‌نظر از نحوه انجام محاسبات، این نرم‌افزارها حالات مختلف تشکیل ساختار دوم را برای توالی مورد نظر پیش‌بینی کرده و نتیجه محاسبات را به صورت فایل‌های تصویری و یا در قالب‌هایی نظیر جدول اتصال^۱ یا نقطه-کمانک^۲ در اختیار کاربر قرار می‌دهند. نظر به این‌که ساختار ثانویه مولکول‌های microRNA اولیه (primary microRNA) و پیش‌ساز microRNA (pre-miRNA) اهمیت ویژه و کلیدی در عملکرد این مولکول‌ها دارد، نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده ساختار ثانویه RNA، از مهم‌ترین ابزارهای مورد استفاده در شناسایی microRNA به صورت نرم‌افزاری (in silico) هستند.

تا به امروز نرم‌افزارها و الگوریتم‌های توانمند و کارآمدی هم برای تشخیص هومولوژی بین توالی‌ها و هم به منظور پیش‌بینی ساختارهای ثانویه، طراحی و در پژوهش‌ها و مطالعات متعددی به کار گرفته شده است. با استخراج مجموعه‌ای از توالی‌های اعتبار سنجی شده miRNA از منابعی نظیر miRBase (Ambros et al. 2003; Griffiths-Jones 2004; Griffiths-Jones et al. 2006; Griffiths-Jones et al. 2008; Meyers et al. 2008; Kozomara and Griffiths-Jones 2011; Kozomara et al. 2019)، به عنوان query، و با در دست داشتن توالی‌های ژنوم یا ترانسکرپتوم موجودات مورد نظر به عنوان subject و تنظیمات مناسب برای شناسایی هومولوژی توالی‌های کوتاه، هم‌ردیفی‌های معتبر بین این دو مجموعه شناسایی شده و با گسترش این نواحی در دو جهت، رشته‌ای به دست می‌آید که در صورت تایید غیر کدکننده بودن آن می‌توان

machine learning با دریافت مجموعه‌ای از داده‌ها (بر اساس ویژگی‌های مربوط به miRهای تایید شده و همچنین اطلاعات مربوط به توالی‌هایی که علی‌رغم برخورداری از ساختارهای مشابه microRNA، در این گروه طبقه‌بندی نمی‌شوند)، قادر به شناسایی miRهای غیر هومولوگ به روش غیرمقایسه‌ای خواهند بود (Ni et al. 2010).

ویژگی‌های ساختاری و عملکردی miRهای گیاهی و جانوری با یکدیگر متفاوت بوده (Alptekin et al. 2017) و اغلب نرم‌افزارهای مربوط به شناسایی بیوانفورماتیکی miRها برای جانوران و به خصوص برای انسان طراحی شده است؛ که این امر متاثر از اهمیت و نقش RNAهای غیر کدکننده من جمله miRها در بیماری‌های انسانی می‌باشد (Esteller 2011). همچنین با توجه به تنوع بالا در طول و ساختار پیش‌ساز miRNA بین گونه‌های مختلف گیاهی و فراوانی توالی‌های تکراری به‌ویژه در ژنوم گیاهان اقتصادی نظیر غلات (Mehrotra and Goyal 2014)، عمده توجه محققین در شناسایی miRهای گیاهی بر روی ارتباط بین دو رشته miR و مکمل آن یعنی miR* (Reinhart et al. 2002) و همچنین ویژگی‌های ساختاری پیش‌ساز miRNA متمرکز است (Reinhart et al. 2002; Mendes et al. 2009; Axtell and Meyers 2018). البته این مطالب، مانند آنچه که در mir319 دیده می‌شود، وجود توالی حفاظت‌شده در سایر نواحی پیش‌ساز miRNA را نفی نمی‌کند. در mir319 یک توالی حفاظت‌شده در بالادست دابلکس miR/miR* دیده می‌شود (Palatnik et al. 2003; Warthmann et al. 2008; Addo-Quaye et al. 2009; Bologna et al. 2009; Li et al. 2011; Sobkowiak et al. 2012) و بنابراین می‌توان انتظار داشت توالی‌های حفاظت شده در خارج از محدوده miR/miR* نیز وجود داشته باشد (Chorostecki et al. 2017).

با توجه به ماهیت حفاظت‌شده توالی microRNA، همچنین اهمیت ویژگی‌های ساختاری در رونوشت‌هایی که منجر به سنتز microRNA بالغ می‌شوند (pri-miRNA و pre-miRNA)، بررسی توالی و ساختار ثانویه قطعات مورد مطالعه، دو گام مقدماتی در شناسایی مولکول‌های microRNA است. انواع الگوریتم‌های بررسی هومولوژی و مهم‌ترین آن‌ها، الگوریتم

¹ Connectivity table

² Dot-bracket file format

مواد و روش‌ها

به منظور شناسایی توالی‌های مشابه با miRهای شناسایی شده، هم‌ردیفی بین ژنوم *A. indica* به عنوان subject و توالی‌های miR گیاهی منحصر به فرد به عنوان query با تنظیمات مناسب برای توالی‌های کوتاه^۱، به وسیله الگوریتم BLASTn از مجموعه standalone BLAST+ نسخه ۲.۱۱.۰ در سیستم عامل لینوکس انجام گرفت (Sayers et al. 2019). طی این فرایند، با در نظر گرفتن ضوابط مورد توافق در رابطه با هومولوژی microRNA در گیاهان (Axtell and Meyers 2018) تعداد ۸۰۲۱۷ ناحیه در سراسر ژنوم *A. indica* با هومولوژی قابل قبول شناسایی شد. پس از گسترش نواحی شناسایی شده در هم‌ردیفی به اندازه حداکثر ۲۰۰ نوکلئوتید در بالادست و پایین دست قطعه با استفاده از الگوریتم getFASTA از مجموعه BEDtools (Quinlan and Hall 2010) و حذف توالی‌هایی که در ناحیه کدکننده ژنوم قرار داشتند، در نهایت ۳۸۰۶۷ توالی باقی‌مانده جهت مرحله پیش‌بینی ساختار ثانویه آماده سازی شدند.

برای استفاده از نرم‌افزار CTAnalyzer، لازم است توالی‌های مورد نظر پیش از معرفی به نرم‌افزار پیش‌بینی ساختار ثانویه، با شیوه به‌خصوصی نام‌گذاری شوند. اطلاعات مندرج در نام توالی، توسط نرم‌افزار CTAnalyzer مورد استفاده قرار می‌گیرد. پس از انجام هم‌ردیفی بین ژنوم هدف و miRهای شناسایی شده در سایر گونه‌ها و گسترش دو جهت ناحیه شناسایی شده، هریک از توالی‌های چندصد نوکلئوتیدی قابل معرفی به نرم‌افزار پیش‌بینی ساختار ثانویه، دارای ناحیه‌ای با شباهت معنی‌داری با miRهای بالغ شناخته شده، با طول تقریبی ۱۶ الی ۲۸ نوکلئوتید بودند. در ساختار ثانویه پیش‌بینی شده، محل قرارگیری این قطعه کوتاه (ناحیه Hit در هم‌ردیفی‌های انجام شده) و همچنین وضعیت آن نسبت به توالی مکملش که در ادامه با نام Hit* شناخته خواهد شد، در بررسی ساختار ثانویه حائز اهمیت است. در صورت تایید اعتبار ساختار ثانویه مورد مطالعه به عنوان miRNA، دو ناحیه Hit و Hit* به miR و miR* تغییر نام خواهد داد. در روش نام گذاری قطعات کاندید، نام هر توالی پس از علامت ">" از چهار

آن را به عنوان توالی کاندید microRNA اولیه به الگوریتم‌های بررسی ساختار ثانویه معرفی کرد.

الگوریتم‌های پیش‌بینی کننده ساختار ثانویه، ساختار پیش‌بینی شده را در قالب فایل‌های متنی و تصویری در اختیار کاربر قرار می‌دهد. در مواردی که تعداد توالی‌های مورد نظر و همچنین تعداد ساختارهای پیش‌بینی شده محدود و انگشت‌شمار است، امکان بررسی بصری تصاویر شماتیک وجود داشته و با توجه به مشخص بودن ویژگی‌های مهم ساختار از قبیل عدم انطباق‌ها، حباب‌های یک‌طرفه (Asymmetric bulges)، حلقه‌های داخلی (Internal loops)، تعداد شاخه‌های جانبی و سایر ویژگی‌های ساختاری، تایید یا رد ساختار بسته به نظر محقق و ضوابط مورد قبول وی صورت می‌گیرد. حال آن‌که در عصر انبوه اطلاعات، که در اغلب مطالعات ژنتیک مولکولی حجم عظیمی از داده‌های حاصل از توالی‌یابی ژنوم و ترنسکرپتوم موجودات در دسترس بوده و مورد استفاده قرار می‌گیرد، تعداد توالی‌ها و به تبع آن تعداد ساختارهای پیش‌بینی شده ابعاد میلیونی به خود گرفته که این امر بهره‌گیری از نرم‌افزارها و الگوریتم‌های مناسب به منظور مدیریت و پالایش داده‌ها را اجتناب ناپذیر می‌نماید.

در این راستا در پژوهشی که به منظور شناسایی بیوانفورماتیکی miRNome گیاه *Azadirachta indica* صورت گرفت، حجم انبوه داده‌های تولید شده در مرحله‌ی پیش‌بینی ساختار ثانویه، موجب ایجاد انگیزه در مؤلفین اثر برای تهیه و تدوین ابزاری به منظور گروه‌بندی، تحلیل و پالایش این اطلاعات با محوریت ساختار سنجاق سری و به‌طور خاص microRNA اولیه شد. این الگوریتم که با هدف رقوم‌سازی ویژگی‌های مهم در ساختارهای دوم مولکول‌های RNA، با نام CTAnalyzer توسط مؤلفین اثر حاضر طراحی و معرفی شده است، با زبان برنامه نویسی PHP نوشته شده و در محیط لینوکس اجرا می‌شود. در این مقاله، با استفاده از توالی ژنوم گیاه *Azadirachta indica* توانایی نرم‌افزار CTAnalyzer در شناسایی ویژگی‌های ساختاری در Hairpin RNA مورد ارزیابی قرار خواهد گرفت. در صورت مکاتبه با مؤلفین اثر، این نرم‌افزار با حفظ مالکیت معنوی در اختیار پژوهشگران این زمینه قرار داده خواهد شد.

¹ word size= 7, mismatch penalty= -3, match reward= 2, gap opening penalty= -5, gap extension penalty= -2

جایگاه (در جهت ۵' به ۳' مطابق با فایل FASTA)، علامت اختصاری نوکلئوتید، شماره جایگاه منهای یک، شماره جایگاه به اضافه یک، شماره نوکلئوتیدی که با جایگاه مورد نظر جفت شده است و در نهایت شماره گذاری طبیعی جایگاهها ثبت شده است. این اطلاعات به منظور تشخیص ویژگی های ساختار دوم پیش بینی شده مورد استفاده قرار می گیرد.

به منظور انجام آنالیز، پوشه اصلی حاوی تمام زیر پوشه ها و فایل های ساختارهای ثانویه پیش بینی شده در مرحله قبل، جهت بررسی و تحلیل به نرم افزار CTAnalyzer معرفی شد. در حالت کلی تحلیل وضعیت ساختار دوم با محوریت ناحیه Hit، بر پایه بررسی روند سلسله اعداد ستون پنجم (ستون اتصال) در مقابل اعداد متوالی ستون ششم (شماره هر جایگاه در توالی) استوار است. با توجه به اهمیت وضعیت متقابل ناحیه Hit و مکمل آن از نظر تعداد و پراکنش عدم انطباقها، بیرون زدگی های یک طرفه، حلقه های داخلی، وضعیت ساختار ثانویه در محل برش توسط آنزیم، ابعاد و فاصله حلقه انتهایی از ناحیه Hit، طول ساختار دو رشته ای در پایین دست ناحیه Hit، طول دنباله های تک رشته ای در انتهای ساقه و نیز وجود یا عدم وجود شاخه های متعدد در ساختار ثانویه، هریک از این موارد به شرحی که در ادامه به آن پرداخته می شود توسط نرم افزار CTAnalyzer مورد شناسایی و بررسی قرار گرفتند.

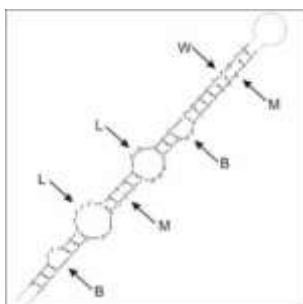
نرم افزار CTAnalyzer برخی اطلاعات پایه از قبیل طول رشته، تعداد انواع نوکلئوتید، نسبت نوکلئوتیدهای G و C در ناحیه Hit و کل توالی و نیز مقدار محاسبه شده dG که اهمیت آنها در منابع مختلف مورد اشاره قرار گرفته است (Jin et al. 2008) را به صورت مستقیم از هر فایل CT استخراج و در جدول نتایج ارائه می نماید. سایر شاخص های ساختاری مهم (Cuperus et al. 2011; Bologna et al. 2012; Bologna et al. 2013; Chorostecki et al. 2017) که طی بررسی ترتیب و توالی اعداد مربوط به هر جایگاه و رابطه متقابل بین نوکلئوتیدهای رشته RNA توسط الگوریتم CTAnalyzer شناسایی و محاسبه می شود، به شرح زیر می باشند:

بررسی استقلال توالی Hit از Hit*: در ساختار اولیه miRNA توالی miR و miR* دو ناحیه مستقل در یک توالی واحد هستند

جزء اصلی تشکیل می شود. این اجزا به ترتیب عبارت است از: نام کانتینگ یا کروموزوم، رشته ای از کانتینگ یا کروموزوم که ناحیه Hit روی آن شناسایی شده است (+ یا -)، شماره اولین و آخرین جایگاه رشته مورد نظر در کانتینگ یا کروموزوم (شماره جایگاه در رشته +) و شماره اولین و آخرین جایگاه ناحیه Hit در توالی مورد بررسی، که این اجزا با علامت "|" از یکدیگر تفکیک می شوند. به عنوان نمونه، یک توالی با نام AMWY02010195.1|+|2847-3265|201-219، برشی از جایگاه ۲۸۴۷ الی ۳۲۶۵ از رشته مثبت در کانتینگ AMWY02010195.1 بوده و در این رشته ۴۱۹ نوکلئوتیدی، دامنه بین جایگاه ۲۰۱ و ۲۱۹ (ناحیه Hit) از نظر توالی دارای شباهت قابل قبول با یک microRNA در بانک اطلاعات miRNA سایر موجودات می باشد. پس از نام گذاری، کلیه توالی ها در یک فایل multi FASTA ذخیره شدند.

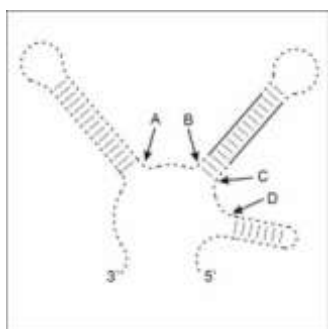
در مرحله بعد، بسته به نظر پژوهشگر، هر نرم افزاری که قابلیت ارائه ساختارهای دوم پیش بینی شده را در فرمت CT داشته باشد، قابل استفاده است. در این تحقیق از نسخه ۳/۶ نرم افزار mFold (Zuker et al. 1999; Zuker 2003) برای پیش بینی ساختارهای ثانویه استفاده شد. الگوریتم CTAnalyzer نیز برای خروجی همین نرم افزار بهینه سازی شده است. نرم افزار mFOLD تعداد n ساختار پیش بینی شده برای هر توالی را با درج اعداد ۱ الی n در انتهای نام توالی، در پوشه ای که هم نام با توالی مورد نظر است (با حذف علامت "<" و جایگزینی "|" با "-") ذخیره می نماید. این نرم افزار، پذیرنده فایل های FASTA بوده و در صورت معرفی فایل multi FASTA به نرم افزار، تنها اولین توالی توسط نرم افزار مورد تجزیه و تحلیل قرار می گیرد. برای رفع این مشکل، دستوری نوشته شد که با بازخوانی فایل multi FASTA، توالی ها را به صورت یک به یک به نرم افزار mFold معرفی کرده و فایل های خروجی مربوط به هر توالی را در پوشه های هم نام با توالی مورد نظر ذخیره نماید. با طی این مرحله در تحقیق حاضر برای ۳۸۰۶۷ توالی کاندید مورد نظر، در مجموع ۵۶۶۷۵۴ ساختار ثانویه پیش بینی و ذخیره شد. در سطر اول هر فایل CT تولید شده توسط نرم افزار mFold به ترتیب طول توالی، مقدار dG و نام توالی مندرج است. از سطر دوم، در شش ستون به ترتیب شماره

به ناحیه Hit در ناحیه پایه ساختار سنجاق سری از نظر وضعیت اتصال مورد بررسی قرار می‌گیرد.



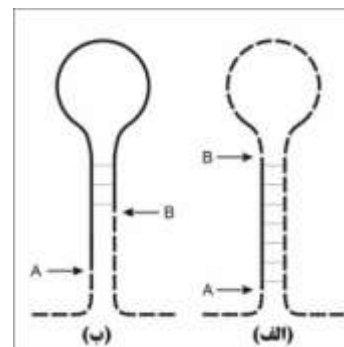
شکل ۲- انواع حالت‌های عدم برقراری رابطه مکملی بین نوکلئوتیدها در dsRNA. بزرگی و جایگاه عدم انطباق‌ها (M: mismatch)، بیرون زدگی‌های یک‌طرفه (B: bulge)، و حلقه‌های داخلی (L: loop) توسط نرم‌افزار CTAnalyzer شناسایی می‌گردد. بسته به تنظیمات نرم‌افزارهای پیش‌بینی کننده ساختار ثانویه، ممکن است جفت شدگی‌های نامتعارف (W: wobble) (base pairing) به‌عنوان match یا mismatch در نظر گرفته شود.

معمولاً ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده به‌صورت چند شاخه‌ای بوده و در چنین وضعیتی فقط شاخه حاوی توالی Hit مد نظر پژوهشگر است. نرم‌افزار CTAnalyzer ضمن مشخص کردن جایگاه آغازین و پایانی شاخه اصلی، با توجه به اهمیت وجود دو دنباله تک رشته‌ای قبل و بعد از ساختار سنجاق سری (Zeng and Cullen 2005; Han et al. 2006)، طول RNA تک رشته‌ای (ssRNA) در دو انتهای شاخه اصلی را نیز مشخص و در جدول نتایج منعکس می‌کند (شکل ۳).



شکل ۳- شناسایی شاخه اصلی در یک ساختار چند شاخه‌ای. در این تصویر ابتدا و انتهای شاخه اصلی با حروف B و C مشخص شده است. ناحیه Hit و مکمل آن با خطوط ممتد نمایش داده شده است. همچنین قطعات AB و CD به‌عنوان نواحی ssRNA قبل و بعد از شاخه اصلی، توسط نرم‌افزار CTAnalyzer شناسایی می‌شود.

که با یک ساختار ساقه-حلقه انتهایی از یکدیگر جدا می‌شوند (Starega-Roslan et al. 2011; Zhu et al. 2011). در این نرم‌افزار، وجود همپوشانی بین ناحیه Hit و Hit* شناسایی می‌شود. همچنین در صورت استقلال، طول توالی بین این دو ناحیه محاسبه و ثبت می‌شود. دو حالت مربوط به استقلال و عدم استقلال ناحیه Hit و Hit* در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- حالت استقلال (الف) و عدم استقلال (ب) ناحیه Hit از Hit*. در هر دو شکل، ناحیه Hit با خطوط پیوسته و پیوند هیدروژنی بین نوکلئوتیدها با نقطه‌چین مشخص شده است. ابتدا و انتهای ناحیه Hit با حروف A و B مشخص شده است.

در اغلب موارد، توالی miR و miR* به‌طور کامل مکمل یکدیگر نیستند (Lee et al. 2015). تعداد و بزرگی نواحی غیرمکمل مشتمل بر عدم انطباق، بیرون‌زدگی و حلقه‌های داخلی، در ناحیه Hit توسط نرم‌افزار شناسایی شده و در جدول نتایج درج می‌شود (شکل ۲). مطابق با ضوابط تعریف شده در شناسایی microRNA، در طول دوبلکس miR/miR* علاوه بر تعداد کلی جایگاه‌های جفت نشده، پراکندگی این جایگاه‌ها نیز حائز اهمیت است (Meyers et al. 2010; Lee et al. 2015). در نتیجه هر دو فاکتور برای هر توالی مشخص شده و در جدول نتایج ثبت می‌گردد.

نظر به اینکه جایگاه‌های مجاور با ابتدا و انتهای دوبلکس miR/miR* سوبسترای انواع آنزیم‌های RNase III و کمپلکس‌های حاوی این آنزیم بوده (Zhu et al. 2011; Auyeung et al. 2013) و هرگونه عدم انطباق بین دو رشته RNA در این ناحیه می‌تواند منجر به جلوگیری از عملکرد صحیح آنزیم برشی گردد (Alptekin et al. 2017)، وضعیت شش جایگاه نوکلئوتیدی در هر یک از نواحی ابتدا و انتهای دوبلکس و شش جایگاه منتهی

نوکلئوتیدها را استخراج می‌نماید. میزان گسترش توالی به طرفین توسط کاربر قابل تعریف است. در ادامه نام توالی جدید با توجه به جایگاه آن روی کروموزوم یا کانتیگ و همچنین با توجه به موقعیت ناحیه Hit در توالی جدید تعریف می‌شود.

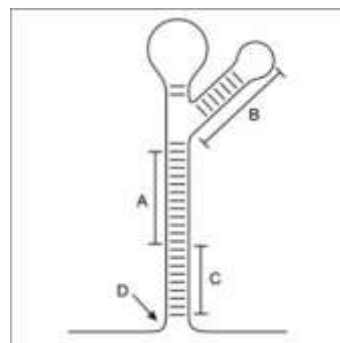
این امکان برای نرم‌افزار CTAnalyzer در نظر گرفته شده است که با تعریف مقادیر و محدوده قابل پذیرش برای برخی از پارامترها و ضوابط کلیدی در شناسایی ساختارهای قابل قبول، فقط ساختارهای مورد تایید را در جدول نهایی نتایج منعکس نماید. این مزیت نه تنها موجب کاهش چشم‌گیر در حجم داده‌های خروجی می‌شود، بلکه به‌کارگیری ضوابط صحیح در تعریف فیلتر، این نرم‌افزار را به‌طور خاص در زمره نرم‌افزارهای توانمند در زمینه شناسایی microRNA قرار می‌دهد.

نتایج و بحث

برای تایید صلاحیت ساختارهای ثانویه به‌عنوان کاندیدای ایفای نقش به‌عنوان pri-microRNA، ویژگی‌های ساختاری در دو گروه طبقه‌بندی می‌شوند: گروه اول عبارت است از شاخص‌های تیپیک و الزامی برای ساختار سنجاق سری، که در صورت نقض هریک از آن‌ها، نیازی به انجام بررسی‌ها بیشتر و جزئی‌تر برای آن ساختار ثانویه وجود ندارد. در نتایج حاصل از مطالعه ساختارهای ثانویه استخراج شده از ژنوم *A. indica*، تعداد و درصد ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده که مطابق با تحلیل صورت گرفته توسط الگوریتم CTAnalyzer از ویژگی‌ها و شاخص‌های اولیه و اصلی ساختار سنجاق سری تبعیت نمودند، در جدول ۱ نشان داده شده است.

مطابق با خروجی نرم‌افزار (جدول ۱)، مشاهده شد که در ۴۵۸۹ ساختار (۰/۸۱٪ از کل ساختارهای مورد بررسی)، ناحیه Hit در تشکیل dsRNA مشارکت ننموده است. در ۱۱۹۲۴۲ ساختار (۲۱/۰۴٪)، عدم استقلال Hit از Hit* (اشتراک توالی بین Hit و Hit*) مشاهده شد. به‌عبارتی در این ساختارهای ثانویه، بین برخی از نوکلئوتیدهای ناحیه Hit، جفت‌شدگی داخلی وجود دارد (مانند حالتی که در قسمت ب از شکل ۱ نشان داده شده است). در ۱۳۳۴۲ ساختار (۲/۳۵٪)، بین ناحیه Hit و Hit* هیچ نوکلئوتید دیگری وجود نداشته و در نتیجه ساختار فاقد ناحیه ساقه-حلقه

در ساختار اغلب pre-miRNA تایید شده، وجود شاخه‌های جانبی و حلقه‌های انتهایی متعدد مشاهده نمی‌شود (Alptekin et al. 2017). نرم‌افزار CTAnalyzer پس از شناسایی شاخه اصلی به بررسی تعداد حلقه‌های انتهایی در این شاخه پرداخته و نتیجه را در جدول نتایج مندرج می‌نماید. در بیشتر مطالعات شاخه‌هایی که دارای بیش از یک حلقه انتهایی هستند از ادامه بررسی حذف می‌شوند (شکل ۴).



شکل ۴- ساختار دوم با شاخه اصلی منشعب. در این شکل ناحیه Hit (A)، شاخه فرعی (B)، ناحیه دو رشته‌ای پایه (C) و تقاطع RNA تک رشته‌ای-دو رشته‌ای (D) مشخص شده است. چنین ساختاری به‌واسطه وجود شاخه فرعی جانبی، فاقد قابلیت تبدیل به microRNA بالغ می‌باشد.

علاوه بر طول ناحیه پایه (فاصله بین ssRNA-dsRNA junction و دوبلکس miR/miR*) (Han et al. 2006; Chorostecki et al. 2017) وضعیت این منطقه از نظر انواع عدم انطباق حائز اهمیت است (Bologna et al. 2012). نرم‌افزار طراحی شده با بررسی این ناحیه موقعیت و بزرگی انواع عدم انطباق را شناسایی و در جدول نتایج ثبت می‌نماید.

همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد برای پیش‌بینی pre-miRNA به فرادست و پایین دست ناحیه شناسایی شده دنباله‌هایی به طول بیش از ۱۰۰ نوکلئوتید افزوده می‌شود. پس از تشخیص قسمتی از این توالی چندصد نوکلئوتیدی که ساختار سنجاق سری مناسبی تشکیل داده و می‌تواند به‌عنوان pre-miRNA مد نظر قرار گیرد، حذف نواحی غیر درگیر به‌منظور محاسبه مجدد سطوح انرژی رویکردی منطقی به‌نظر می‌رسد (Alptekin et al. 2017). در این مرحله نرم‌افزار اولین جایگاه در شاخه اصلی را به‌عنوان نقطه مرجع در نظر گرفته و با گسترش دادن توالی از این جایگاه و جایگاه مکمل آن به سمت ابتدا و انتهای توالی، دامنه جدیدی از

انتهایی است. در ۱۲۶۱۷۹ ساختار (۲۲/۲۶٪)، ناحیه Hit* منقطع بوده و به عبارتی قسمتی از توالی مکمل Hit، مربوط به پایانه ۵' و قسمت دیگر مربوط به پایانه ۳' توالی می‌باشد. در ۶۷۰۹۹ ساختار (۱۱/۸۴٪)، بیش از یک ناحیه ساقه- حلقه انتهایی شناسایی شد. علی‌رغم وجود موارد استثنا، چنین وضعیتی در اغلب miRهای تایید شده، مشاهده نمی‌شود. همچنین در ۷۷۲۵۹ ساختار (۱۳/۶۳٪)، ناحیه بین Hit و Hit* فاقد ساقه شناسایی شد. در مجموع مطابق با خروجی نرم‌افزار CTAnalyzer (جدول ۱) مشاهده شد که ۴۰۳۲۰۹ ساختار از کل ۵۶۶۷۵۴ ساختار ثانویه پیش‌بینی شده توسط نرم‌افزار mFold (۷۱/۱۴ درصد)، حداقل از یکی از ویژگی‌های اصلی ساختار سنجاق سری برخوردار نبوده و نمی‌توانند به عنوان ساختار کاندید pri-microRNA مد نظر قرار گیرند و بنابراین از ادامه بررسی‌ها حذف شدند.

گروه دوم شاخص‌های مورد بررسی، بر جزئیات ساختار سنجاق سری تمرکز دارد. منطقه دابلکس Hit/Hit*، نواحی بالادستی و پایین دستی دابلکس، مواضع برش و دنباله‌های تک رشته‌ای بر

روی ساختارهای انتخاب شده و باقی مانده از مرحله قبل برای ساختارهای ثانویه ژنوم گیاه *A. indica* توسط نرم‌افزار CTAnalyzer بررسی شد. برای بررسی وضعیت حاکم در ناحیه Hit/Hit*، ضوابط عنوان شده توسط (Axtell and Meyers 2018) ملاک ارزیابی نرم‌افزار CTAnalyzer قرار گرفت (Axtell and Meyers 2018).

مطابق با این ضوابط، تعداد عدم انطباق مجاز بین Hit و Hit* پنج جایگاه است که از این تعداد، نهایتاً سه جایگاه می‌تواند در بیرون زدگی‌های یک‌طرفه یا حلقه‌های داخلی قرار گیرد. همچنین مطابق با نظر برخی محققین، هیچ نوع عدم انطباق در محل برش آنزیم، مجاز نمی‌باشد (Alptekin et al. 2017). بنابراین مطابق با استانداردهای اشاره شده، پس از حذف ساختارهای نامناسب مطابق با جدول ۱، نتایج و اطلاعات آماری ساختارهای ثانویه‌ای که به واسطه دارا نبودن ضوابطی که در بالا به آن اشاره شد نامناسب شناخته شدند، در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۱- تعداد و درصد ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده که مطابق با تحلیل صورت گرفته توسط الگوریتم CTAnalyzer از شاخص‌های اولیه ساختار سنجاق سری تبعیت نکردند.

شاخص‌های پایه‌ای ساختار سنجاق سری	تعداد ساختارهای شناسایی شده	درصد از کل ساختارها
عدم شرکت توالی Hit در ناحیه دو رشته‌ای RNA	۴۵۸۹	۰/۸۱٪
عدم استقلال Hit از Hit* (جفت شدگی داخلی توالی Hit)	۱۱۹۲۴۲	۲۱/۰۴٪
عدم وجود توالی linker بین Hit و Hit*	۱۳۳۴۲	۲/۳۵٪
وجود انقطاع در توالی Hit*	۱۲۶۱۷۹	۲۲/۲۶٪
وجود بیش از یک شاخه انتهایی	۶۷۰۹۹	۱۱/۸۴٪
فقدان ناحیه دو رشته‌ای (ساقه) بین دابلکس Hit/Hit* و حلقه انتهایی	۷۷۲۵۹	۱۳/۶۳٪
ساختارهای مشمول حداقل یکی از حالت‌های فوق	۴۰۳۲۰۹	۷۱/۱۴٪

جدول ۲- تعداد و درصد ساختارهای سنجاق سری که مطابق با ارزیابی صورت گرفته توسط الگوریتم CTAnalyzer از ضوابط مورد تایید microRNA در ناحیه miR/miR* تبعیت نمودند.

وضعیت متناقض با ضوابط ناحیه miR/miR*	تعداد ساختارهای شناسایی شده	درصد از کل ساختارهای باقی مانده
شناسایی بیش از پنج عدم انطباق بین Hit و Hit*	۲۶۶۲۴	۱۶/۲۸٪
درگیری بیش از سه جایگاه در بیرون زدگی‌های یک‌طرفه	۲۴۹۹۲	۱۵/۲۸٪
درگیری بیش از سه جایگاه در حلقه‌های داخلی	۱۱۰۸۰۱	۶۷/۷۵٪
وجود حلقه داخلی، عدم انطباق یا بیرون زدگی در جایگاه برش آنزیم	۱۳۲۷۵۹	۸۱/۱۸٪
ساختارهای مشمول حداقل یکی از حالت‌های فوق	۱۵۷۹۰۸	۹۶/۵۵٪

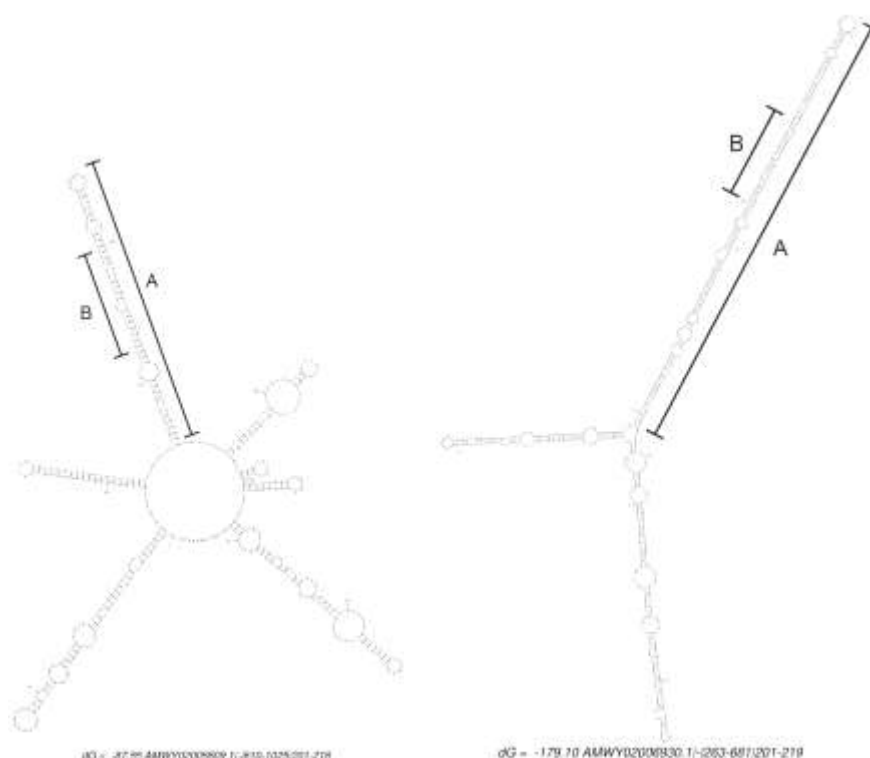
همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود در ۱۵۷۹۰۸ ساختار از ۱۶۳۵۴۵ ساختار باقی‌مانده مورد بررسی (۹۶/۵۵ درصد)، حداقل از یکی از ضوابط لازم برای ناحیه miR/miR^* تبعیت نکردند؛ بدین شرح که وجود بیش از پنج عدم انطباق بین توالی Hit و Hit^* در ۲۶۶۲۴ ساختار، درگیری بیش از سه جایگاه در بیرون زدگی‌های یک‌طرفه در ۲۴۹۹۲ ساختار، درگیری بیش از سه جایگاه در حلقه‌های داخلی در ۱۱۰۸۰۱ ساختار و وجود حلقه داخلی، عدم انطباق یا بیرون زدگی در جایگاه برش آنزیم در ۱۳۲۷۵۹ ساختار شناسایی شد.

با توجه به اهمیت وضعیت ساختار سنجاق سری در محل استقرار ریزپردازنده (ناحیه دو رشته‌ای در پایین دست دابلکس Hit/Hit^*)، طول این ناحیه و وضعیت جفت‌شدگی دو رشته در آن مورد بررسی قرار گرفت. وجود عدم انطباق وسیع و بیرون زدگی‌های بزرگ در این ناحیه، مانع استقرار ریزپردازنده می‌شود. مطابق با نظر Bologna et al. (2012) این ناحیه در miR ‌های جانوری ۱۱ bp طول داشته و به دو دنباله بلند ssRNA متصل می‌شود؛ حال آن‌که در miR ‌های گیاهی، طول این ناحیه حدود ۱۵ bp بوده و در انتهای آن یک حلقه نسبتاً بزرگ قرار دارد (Bologna et al. 2012). این طول مطابق با نظر Unver et al. (2009) معادل ۱۷ bp می‌باشد. با در نظر گرفتن ضوابط فوق، ساختارهای ثانویه باقی‌مانده از نظر وضعیت محل استقرار ریزپردازنده، توسط نرم‌افزار CTAnalyzer مورد بررسی قرار گرفتند که نتایج حاصل در جدول ۳ گزارش شده است. در این مرحله از بین ۵۶۳۷ ساختار ثانویه باقی‌مانده از بررسی‌های مرحله

اول و دوم ساختارها (جدول ۱ و ۲)، وجود عوارض ممانعت کننده در محل برش (cut site) در ۴۰۳۴ ساختار، کوتاه‌تر بودن طول ناحیه دو رشته‌ای در پایین دست ناحیه Hit/Hit^* نسبت به طول مورد نیاز جهت استقرار مجموعه ریزپردازنده در ۲۹۷۳ ساختار و وجود عوارض ممانعت کننده در محل استقرار ریزپردازنده در ۱۸۳۹ ساختار مشاهده شد. بنابراین مطابق با نتایج مندرج در جدول ۳ مشاهده شد که مجموعاً در ۵۱۵۵ ساختار ۵۶۳۷ ساختار ثانویه باقی‌مانده (حدود ۹۱/۴۵ درصد)، در محل استقرار ریزپردازنده یا محل برش آنزیم، ممانعت فضایی (شامل عدم انطباق‌های متوالی، بیرون زدگی و حلقه داخلی با ابعاد بزرگ) وجود داشته و یا ناحیه dsRNA در پایین دست ناحیه Hit/Hit^* از طول کافی برخوردار نبوده و به دلایل فوق جزو ساختارهای ثانویه مورد تأیید برای pri-microRNA قرار نگرفته و حذف شدند. بررسی فایل گرافیکی (شکل ۵) چند نمونه از ساختارهای ثانویه ترسیم شده توسط نرم‌افزار mFOLD برای توالی‌های باقی‌مانده شناسایی شده توسط نرم‌افزار CTAnalyzer، نتایج به‌دست آمده از خروجی نرم‌افزار CTAnalyzer را تأیید نمود. با درج مقادیر مورد توافق استاندارد در فیلتر نرم‌افزار CTAnalyzer برای ضوابطی که طی مراحل قبل مورد اشاره قرار گرفتند، مشاهده شد که خروجی نهایی نرم‌افزار با نتایجی که طی مراحل سه‌گانه قبل (جدول ۱، ۲ و ۳) به‌دست آمد، به‌طور کامل منطبق بوده و الگوریتم CTAnalyzer با دریافت ضوابط مورد نظر در فیلتر نرم‌افزار ضمن بررسی کلیه ساختارهای ثانویه، موفق به شناسایی و معرفی توالی‌های مناسب شده است.

جدول ۳- نسبت ساختارهایی که علی‌رغم وضعیت مناسب در ناحیه Hit/Hit^* ، دارای موضع مناسب برای استقرار مجموعه ریزپردازنده نبودند.

وضعیت ممانعت کننده از استقرار ریز پردازنده	تعداد ساختارهای شناسایی شده	درصد از کل ساختارهای باقیمانده
وجود عوارض ممانعت کننده در محل برش ناحیه Hit/Hit^*	۴۰۳۴	٪ ۷۱/۵۶
کوتاه بودن طول ناحیه دو رشته‌ای در پایین دست Hit/Hit^*	۲۹۷۳	٪ ۵۲/۷۴
وجود عوارض ممانعت کننده در محل استقرار ریزپردازنده	۱۸۳۹	٪ ۳۲/۶۲
ساختارهای مشمول حداقل یکی از حالت‌های فوق	۵۱۵۵	٪ ۹۱/۴۵



شکل ۵- دو نمونه از ساختارهای ثانویه ترسیم شده توسط نرم افزار mFOLD برای توالی‌های کاندید pri-microRNA حاوی شاخه اصلی ساختار (A) و ناحیه دابلکس (B) Hit/Hit*

گرفتن الگوهای شناخته شده در ساختار دوم microRNAهای اعتبارسنجی شده، امکان پیش‌بینی پتانسیل یک رشته RNA برای تبدیل به microRNA وجود دارد. نرم افزار CTAnalyzer با رقوم سازی ویژگی‌های تعداد بسیار زیاد ساختارهای ثانویه پیش‌بینی شده برای توالی‌های RNA، امکان گروه‌بندی آن‌ها را فراهم کرده و همچنین با حذف حجم انبوهی از ساختارهای فاقد معیارهای تعریف شده و در نتیجه انتخاب ساختارهای برتر، حجم داده‌های نیازمند اعتبارسنجی را به صورت محسوس تقلیل و احتمال شناسایی miRهای حقیقی را افزایش می‌دهد. بدیهی است در اینجا نیز مانند کلیه روش‌های بیوانفورماتیک شناسایی microRNA، لازم است اعتبارسنجی توالی‌های شناسایی شده طی روش‌های آزمایشگاهی نیز انجام گیرد.

بدین ترتیب در نتایج خروجی نرم افزار CTAnalyzer با ضوابط در نظر گرفته شده، برای شناسایی microRNAهای ژنوم A. indica مشاهده شد که از بین کل ۵۶۶۷۵۴ ساختار ثانویه مورد بررسی تعداد ۵۶۶۲۷۲ ساختار ثانویه (حدود ۹۹/۹۱٪) فاقد ویژگی‌های مورد تایید برای microRNA اولیه بودند و ۴۸۲ ساختار ثانویه باقی‌مانده، دارای ویژگی‌های مورد تایید برای microRNA شناسایی شدند.

ویژگی‌های ساختار ثانویه در شناسایی و فراوری مولکول‌های microRNA نقشی اساسی و تعیین کننده دارد. چنان‌که به نظر می‌رسد علی‌رغم وجود ساختار اولیه مناسب در سطح توالی نوکلئوتیدی، فقدان ساختار ثانویه کارآمد، مانع قرارگیری رشته‌های RNA در مسیر بیوسنتز microRNA می‌شود. با در نظر

منابع

Addo-Quaye C, Snyder JA, Park YB, Li YF, Sunkar R and Axtell MJ (2009) Sliced microRNA targets and precise loop-first processing of MIR319 hairpins revealed by

analysis of the Physcomitrella patens degradome. RNA 15:2112-2121.

Agrawal N, Dasaradhi PV, Mohammed A, Malhotra P, Bhatnagar RK and Mukherjee SK (2003) RNA

- interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67:657-685.
- Alló M and Kornblihtt AR (2010) Gene Silencing: Small RNAs Control RNA Polymerase II Elongation. *Current Biology* 20:704-707.
- Alptekin B, Akpinar BA and Budak H (2017) A Comprehensive Prescription for Plant miRNA Identification. *Frontiers in plant science* 7:2058.
- Ambros V, Bartel B, Bartel DP, Burge CB, Carrington JC, Chen X, Dreyfuss G, Eddy SR, Griffiths-Jones S, Marshall M, Matzke M, Ruvkun G and Tuschl T (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* 9:277-279.
- Andronescu M, Aguirre-Hernández R, Condon A and Hoos H H (2003) RNAsoft: A suite of RNA secondary structure prediction and design software tools. *Nucleic Acids Research* 31:3416-3422.
- Auyeung VC, Ulitsky I, McGeary SE and Bartel DP (2013) Beyond secondary structure: primary-sequence determinants license pri-miRNA hairpins for processing. *Cell* 152:844-858.
- Axtell MJ (2013) Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Review of Plant Biology* 64:137-159.
- Axtell MJ and Meyers BC (2018) Revisiting Criteria for Plant MicroRNA Annotation in the Era of Big Data. *The Plant Cell* 30:272-284.
- Bartel D (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* 116:281-297.
- Behrens SE, Tomei L and De Francesco R (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *The EMBO Journal* 15:12-22.
- Bologna NG, Mateos JL, Bresso EG and Palatnik JF (2009) A loop-to-base processing mechanism underlies the biogenesis of plant microRNAs miR319 and miR159. *The EMBO Journal* 28:3646-3656.
- Bologna NG, Schapire AL and Palatnik JF (2012) Processing of plant microRNA precursors. *Brifings in functional genomics* 12:37-45.
- Bologna NG, Schapire AL, Zhai J, Chorostecki U, Boisbouvier J, Meyers BC and Palatnik JF (2013) Multiple RNA recognition patterns during microRNA biogenesis in plants. *Genome research* 23:1675-1689.
- Castel S E and Martienssen R A (2013) RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics* 14:100-112.
- Chang S-S, Zhang Z and Liu Y (2012) RNA Interference Pathways in Fungi: Mechanisms and Functions. *Annual Review of Microbiology* 66:305-323.
- Chorostecki U, Moro B, Rojas A, Debernardi J, Schapire A, Notredame C and Palatnik J (2017) Evolutionary Footprints Reveal Insights into Plant MicroRNA Biogenesis. *The Plant cell* 29:1248-1261.
- Cuperus JT, Fahlgren N and Carrington JC (2011) Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell* 23:431-442.
- Du T and Zamore PD (2005) microPrimer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 132:4645-4652.
- Esteller M (2011) Non-coding RNAs in human disease. *Nature Reviews Genetics* 12:861-874.
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE and Mello CC (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391:806-811.
- Griffiths-Jones S (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Research* 32:109-111.
- Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A and Enright AJ (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* 34:D140-D144.
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S and Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research* 36:D154-D158.
- Ha M and Kim VN (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15:509-524.
- Han J, Lee Y, Yeom KH, Nam JW, Heo I, Rhee JK, Sohn SY, Cho Y, Zhang BT and Kim VN (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125:887-901.
- Izant JG and Weintraub H (1984) Inhibition of thymidine kinase gene expression by anti-sense RNA: A molecular approach to genetic analysis. *Cell* 36:1007-1015.
- Jin W, Li N, Zhang B, Wu F, Li W, Guo A and Deng Z (2008) Identification and verification of microRNA in wheat (*Triticum aestivum*). *Journal of Plant Research* 121:351-355.
- Kleptogiannis D, Korfiati A, Theofilatos K, Likothanassis S, Tsakalidis A and Mavroudi S (2013) Where we stand, where we are moving: Surveying computational techniques for identifying miRNA genes and uncovering their regulatory role. *Journal of Biomedical Informatics* 46:563-573.
- Knip M, Constantin ME and Thordal-Christensen H (2014) Trans-kingdom Cross-Talk: Small RNAs on the Move. *PLoS Genetic* 10:e1004602.
- Kozomara A, Birgaoanu M and Griffiths-Jones S (2019) miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* 47:D155-D162.
- Kozomara A and Griffiths-Jones S (2011) miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research* 39:D152-D157.
- Kozomara A and Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Research* 42:D68-D73.
- Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T (2001) Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294:853-858.
- Lee R C and Ambros V (2001) An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294:862-864.
- Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75:843-854.
- Lee W C, Lu S H, Lu M H, Yang C J, Wu S H and Chen H M (2015) Asymmetric bulges and mismatches determine 20-nt microRNA formation in plants. *RNA biology* 12:1054-1066.

- Li Y, Li C, Ding G and Jin Y (2011) Evolution of MIR159/319 microRNA genes and their post-transcriptional regulatory link to siRNA pathways. *BMC evolutionary biology* 11:122.
- Lim LP, Lau NC, Weinstein EG, Abdelhakim A, Yekta S, Rhoades MW, Burge CB, Bartel DP (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes and Development* 17:991-1008.
- Lorenz R, Bernhart SH, Höner zu Siederdisen C, Tafer H, Flamm C, Stadler PF and Hofacker IL (2011) ViennaRNA Package 2.0. *Algorithms for Molecular Biology* 6:26.
- Martínez de Alba AE, Elvira-Matlot E and Vaucheret H (2013) Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* 1829:1300-1308.
- Mathews D, Moss W and Turner D (2010) Folding and Finding RNA Secondary Structure. Cold Spring Harbor perspectives in biology 2:a003665.
- Mehrotra S and Goyal V (2014) Repetitive Sequences in Plant Nuclear DNA: Types, Distribution, Evolution and Function. *Genomics, Proteomics and Bioinformatics* 12:164-171.
- Mendes ND, Freitas AT and Sagot MF (2009) Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Research* 37:2419-2433.
- Meyers BC, Axtell MJ, Bartel B, Bartel DP, Baulcombe D, Bowman JL, Cao X, Carrington JC, Chen X, Green PJ, Griffiths-Jones S, Jacobsen SE, Mallory AC, Martienssen RA, Poethig RS, Qi Y, Vaucheret H, Voinnet O, Watanabe Y, Weigel D and Zhu J-K (2008) Criteria for Annotation of Plant MicroRNAs. *The Plant Cell* 20:3186-3190.
- Meyers BC, Simon SA and Zhai J (2010) MicroRNA Processing: Battle of the Bulge. *Current Biology* 20:68-70.
- Ni M, Shu W, Bo X, Wang S and Li S (2010) Correlation between sequence conservation and structural thermodynamics of microRNA precursors from human, mouse, and chicken genomes. *BMC evolutionary biology* 10:329.
- Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, Schwab R, Carrington JC and Weigel D (2003) Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425:257-263.
- Popenda M, Szachniuk M, Blazewicz M, Wasik S, Burke EK, Blazewicz J and Adamiak RW (2010) RNA FRABASE 2.0: an advanced web-accessible database with the capacity to search the three-dimensional fragments within RNA structures. *BMC bioinformatics* 11:231.
- Quinlan AR and Hall IM (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)* 26:841-842.
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP (2002) MicroRNAs in plants. *GENES & DEVELOPMENT* 16:1616-1626.
- Reuter JS and Mathews DH (2010) RNAstructure: software for RNA secondary structure prediction and analysis. *BMC bioinformatics* 11: 129.
- Sayers EW, Agarwala R, Bolton EE, Brister JR, Canese K, Clark K, Connor R, Fiorini N, Funk K, Hefferon T, Holmes JB, Kim S, Kimchi A, Kitts PA, Lathrop S, Lu Z, Madden TL, Marchler-Bauer A, Phan L, Schneider VA, Schoch CL, Pruitt KD and Ostell J (2019) Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* 47:D23-D28.
- Singh J, Hanson J, Paliwal K and Zhou Y (2019) RNA secondary structure prediction using an ensemble of two-dimensional deep neural networks and transfer learning. *Nature Communications* 10:5407.
- Sobkowiak L, Karlowski W, Jarmolowski A and Szweykowska-Kulinska Z (2012) Non-Canonical Processing of Arabidopsis pri-miR319a/b/c Generates Additional microRNAs to Target One RAP2.12 mRNA Isoform. *Frontiers in plant science* 3:46.
- Starega-Roslan J, Koscińska E, Kozłowski P and Krzyżosiak WJ (2011) The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:2859-2871.
- Svoboda P and Di Cara A (2006) Hairpin RNA: a secondary structure of primary importance. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63:901-908.
- Tian B, Bevilacqua PC, Diegelman-Parente A and Mathews MB (2004) The double-stranded-RNA-binding motif: interference and much more. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5:1013-1023.
- Unver T, Namuth-Covert DM and Budak H (2009) Review of current methodological approaches for characterizing microRNAs in plants. *International Journal of Plant Genomics* 262463.
- Warthmann N, Das S, Lanz C and Weigel D (2008) Comparative analysis of the MIR319a microRNA locus in Arabidopsis and related Brassicaceae. *Molecular biology and evolution* 25:892-902.
- Wightman B, Ha I and Ruvkun G (1993) Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75:855-862.
- Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA and Bartel DP (2000) RNAi: Double-Stranded RNA Directs the ATP-Dependent Cleavage of mRNA at 21 to 23 Nucleotide Intervals. *Cell* 101:25-33.
- Zeng Y and Cullen BR (2005) Efficient processing of primary microRNA hairpins by Drosha requires flanking nonstructured RNA sequences. *The Journal of biological chemistry* 280:27595-27603.
- Zhu S, Jiang Q, Wang G, Liu B, Teng M and Wang Y (2011) Chromatin structure characteristics of pre-miRNA genomic sequences. *BMC genomics* 12:329.
- Zuker M (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Research* 31:3406-3415.
- Zuker M, Mathews DH and Turner DH (1999) Algorithms and Thermodynamics for RNA Secondary Structure Prediction: A Practical Guide. In *RNA Biochemistry and Biotechnology*, J. Barciszewski and B.F.C. Clark, eds., NATO ASI Series, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL 11-43.