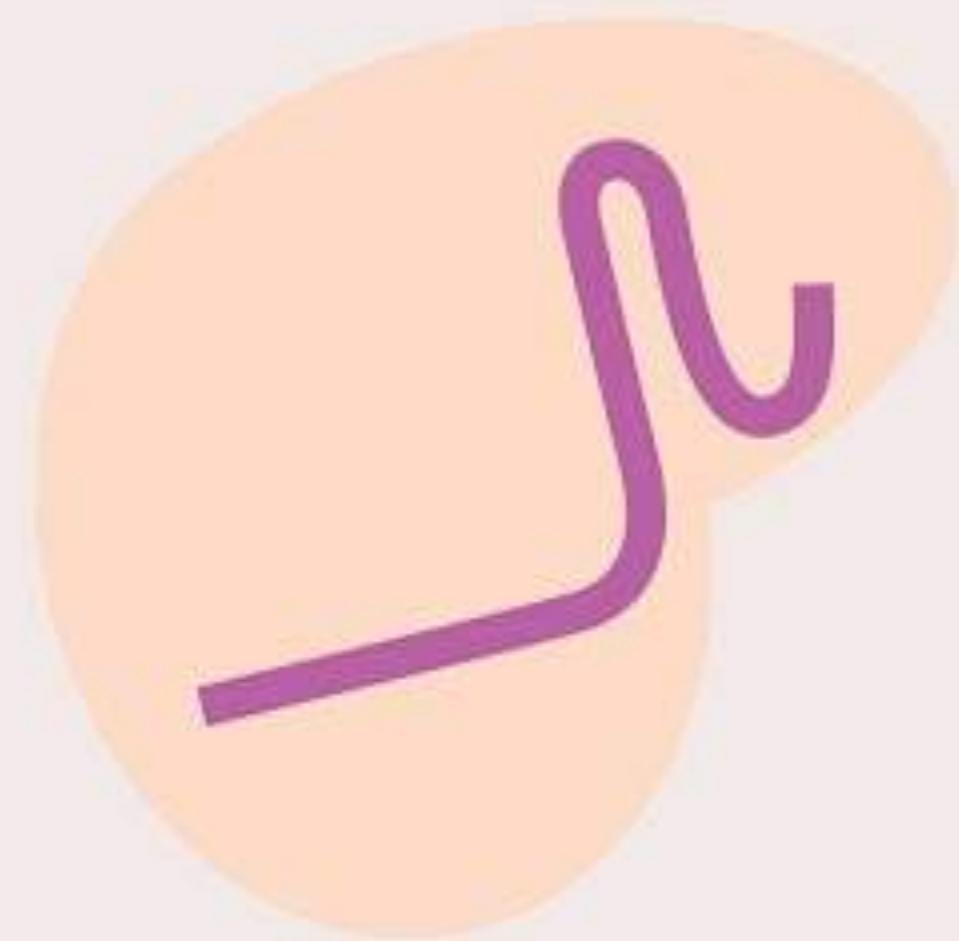


# CRISPR vs RNAi vs TALENs



RNAi



CRISPR



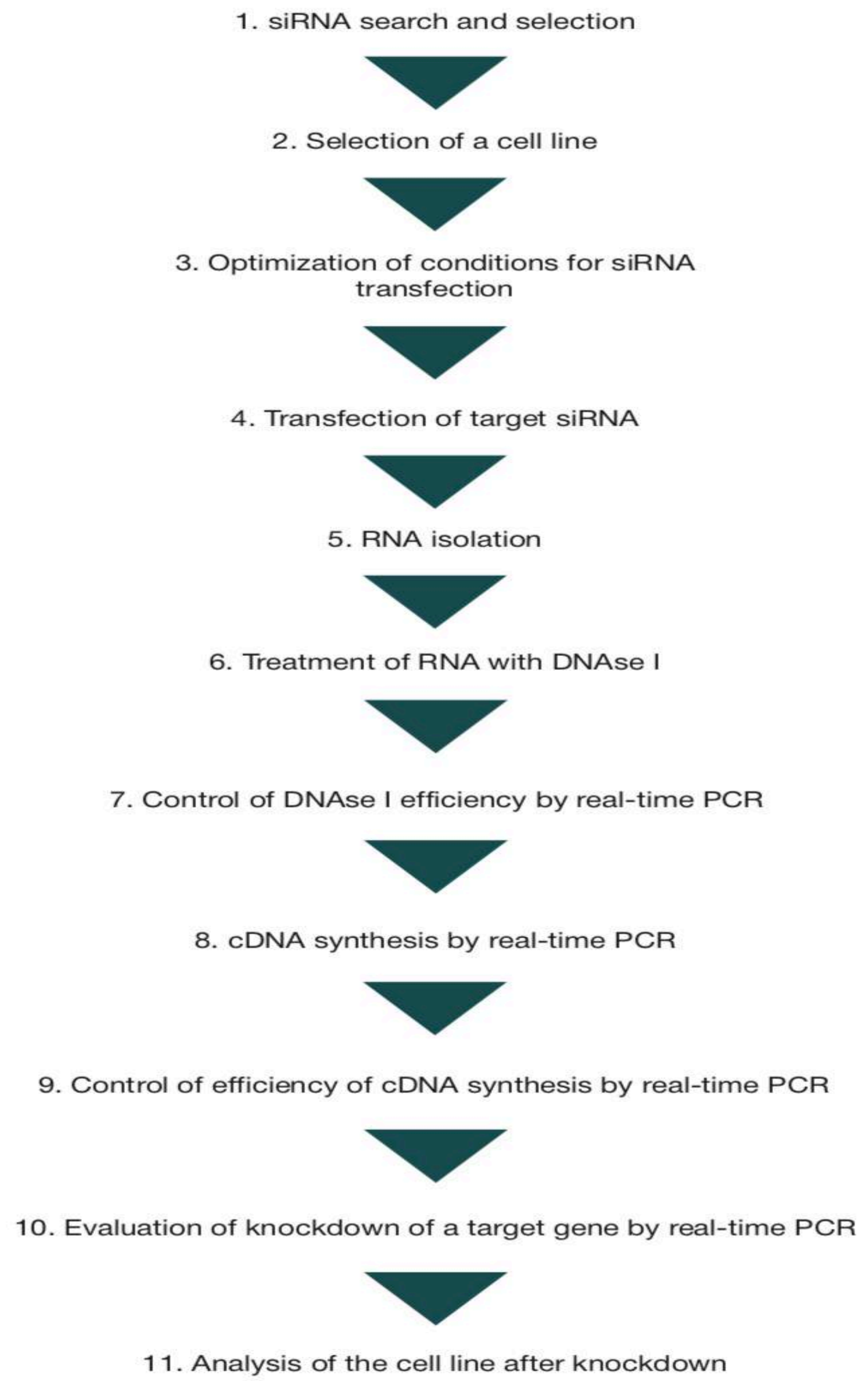
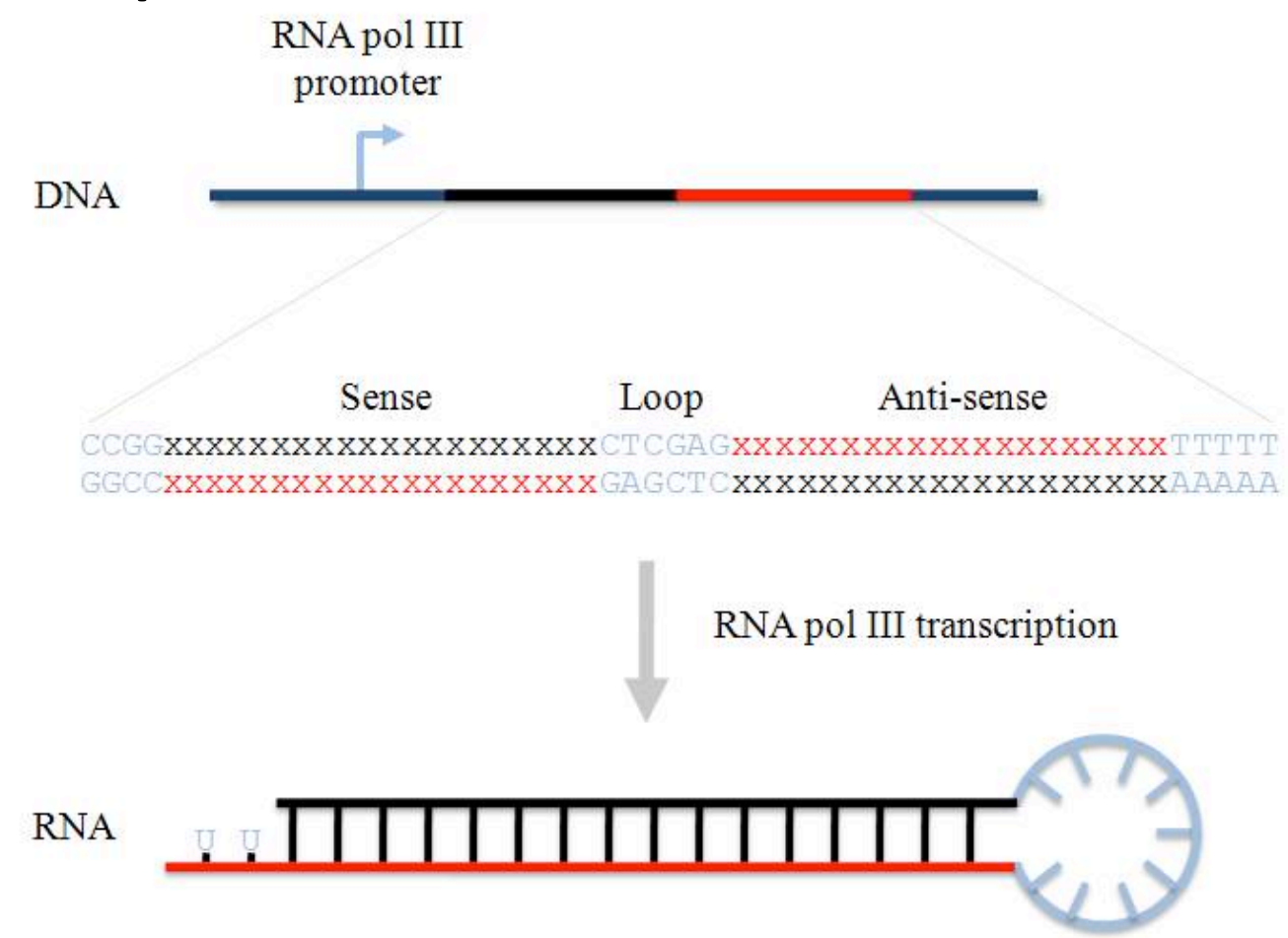
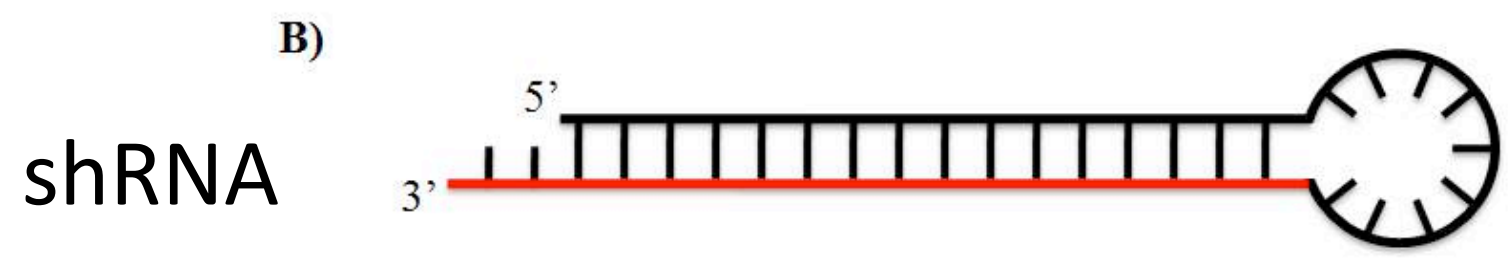
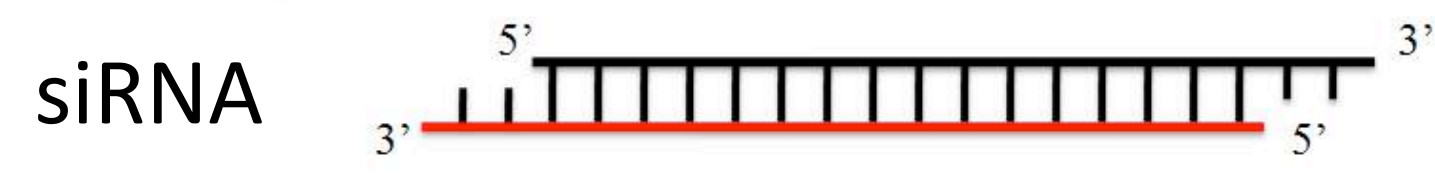
TALENs

# Πειραματική επικαιροποίηση γονιδιακής λειτουργίας

- Οι μέθοδοι για την υπερ-έκφραση γονιδίων αναπτύχθηκαν πρώτα με την ανάπτυξη τεχνικών γενετικής μηχανικής και μοριακής κλωνοποίησης
  - Περιλαμβάνουν ένα εύρος τεχνικών με στόχο τους την αύξηση έκφρασης ενός γονιδίου από τις πιο απλές (όπως τα πλασμίδια κλωνοποίησης/έκφρασης) έως τις πιο περίπλοκες (επαγώμενα συστήματα έκφρασης, φορείς έκφρασης ιών)
- Οι μέθοδοι γονιδιακής αποσιώπησης αναπτύχθηκαν αργότερα και έχουν στόχο τη μείωση έως και εξαφάνιση των μεταγραφικών επιπέδων ενός γονιδίου.
  - Η πρώτη μέθοδος ήταν η εφαρμογή αντι-νοσηματικών ολιγονουκλεοτιδίων, η οποία αρχικά δεν ήταν αποτελεσματική (αλλά στις μέρες εφαρμόζεται περισσότερο πλέον)
  - Η ανακάλυψη του παρεμβαλλόμενου RNA (RNA interference, RNAi), οδήγησε πραγματικά σε μια επανάσταση στις μεθόδους γονιδιακής αποσιώπησης.
  - CRISPR-cas9

# Στρατηγική για την πραγματοποίηση πειραμάτων siRNA knockdown

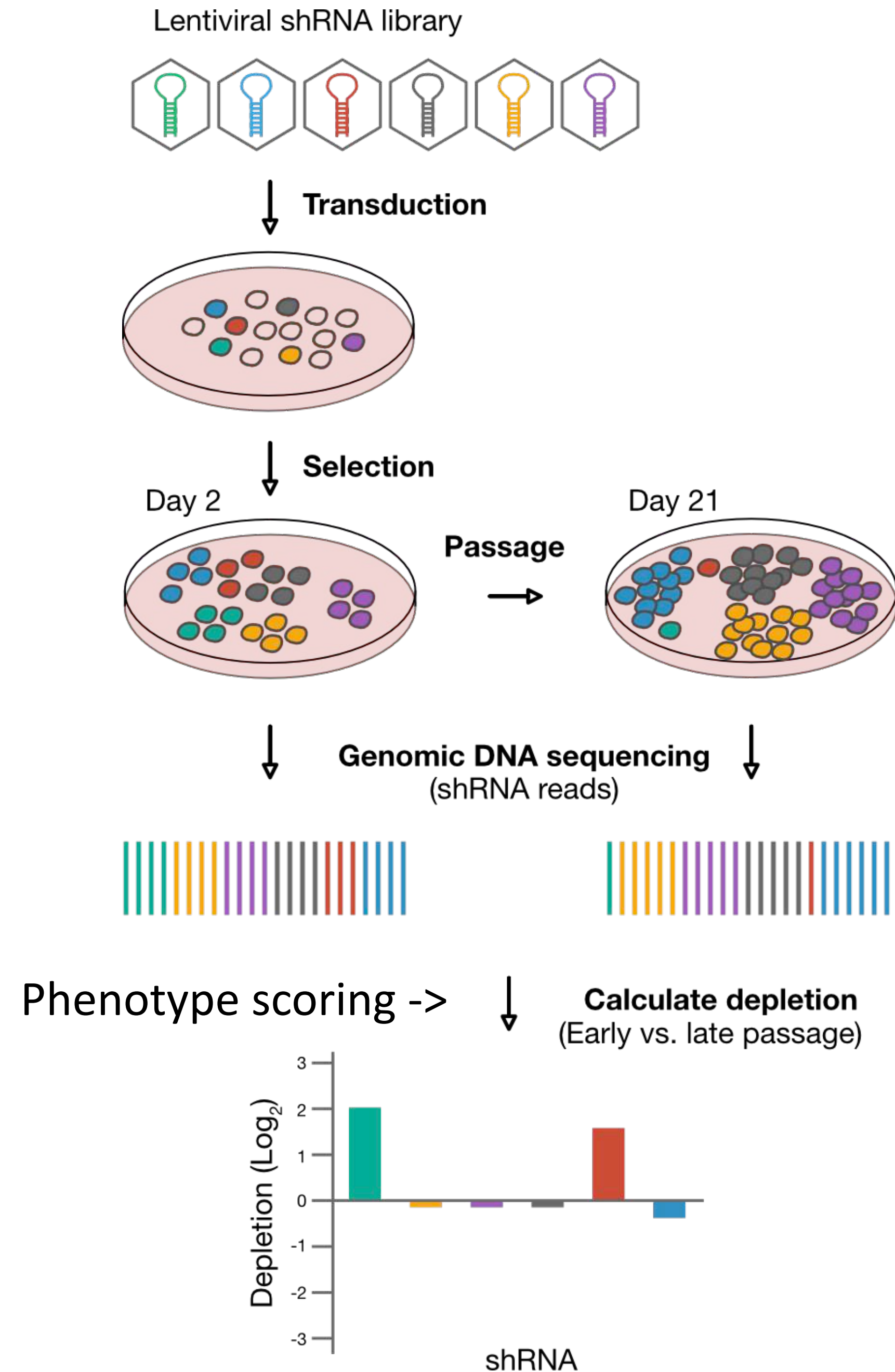
- Υπάρχουν δύο στρατηγικές για πειράματα μείωσης της έκφρασης (knock-down) ενός συγκεκριμένου γονιδίου στις μέρες: τα siRNAs και τα πλασμίδια που φέρουν φουρκέτες (short hairpin RNAs, shRNAs).
- Τα ShRNA έχουν κάποια πλεονεκτήματα έναντι των siRNA: Πιο επαναλήψιμα αποτελέσματα αρνητικής ρύθμισης έκφρασης; Μπορούν να χρησιμοποιηθούν με επαγόμενα συστήματα έκφρασης; Μπορούν να συν-εκφραστούν με γονίδια αναφοράς για τον έλεγχο της αποτελεσματικότητας της διαμόλυνσης; Και την ταυτοποίηση των διαμολυσμένων κυττάρων. Είναι όμως περισσότερο απαιτητικά πειραματικά και συνήθως τα siRNAs προτιμώνται



# Experimental approach for cell essential genes.

The demonstration that sequence-specific RNAi could be triggered by stable expression of a stem-loop short hairpin RNA (shRNA) that mimicked miRNA (Paddison 2002) laid the foundation for viral-vector libraries expressing shRNA that could disrupt expression on a genome-wide level (Paddison 2004, Silva 2005).

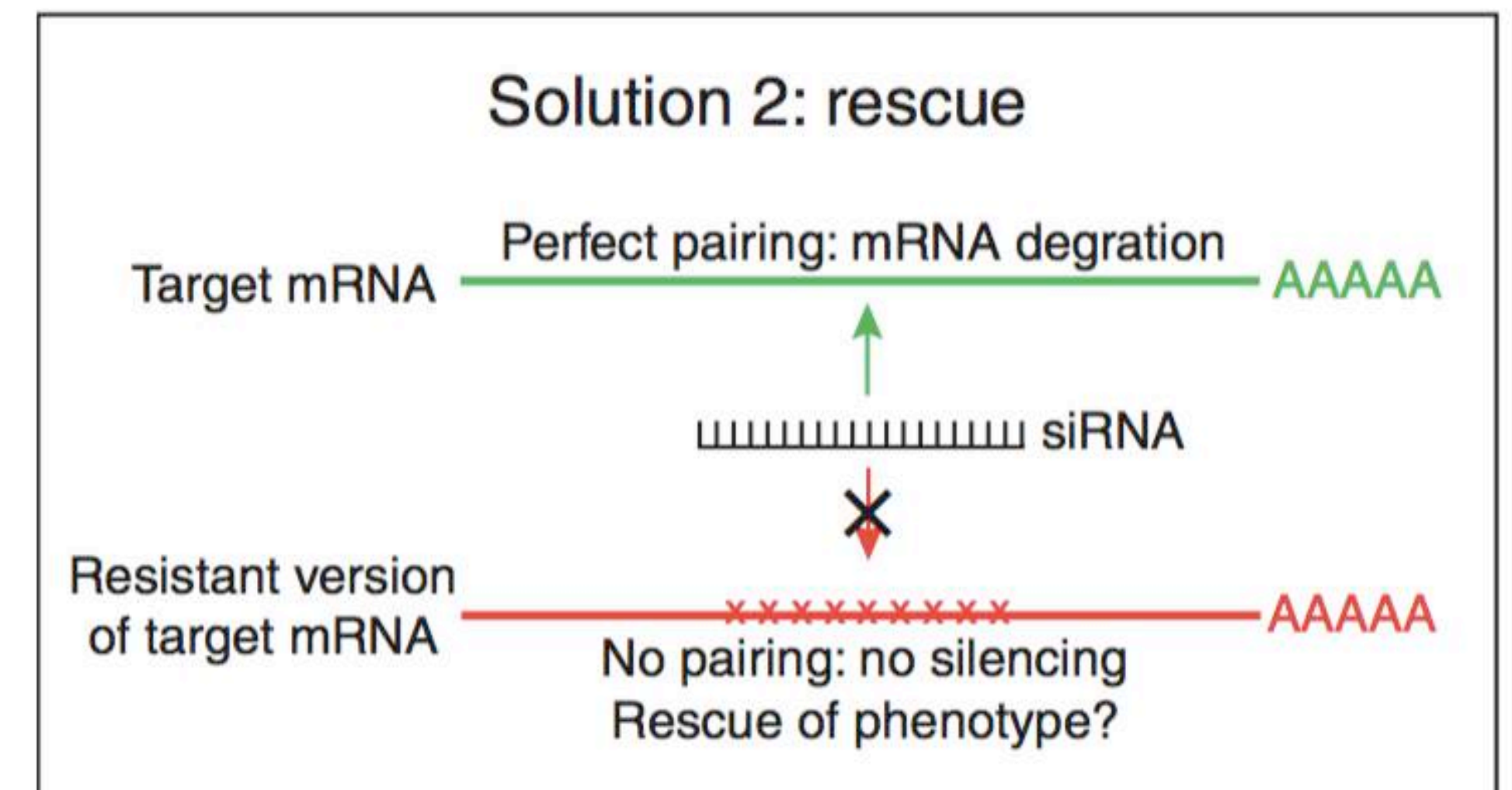
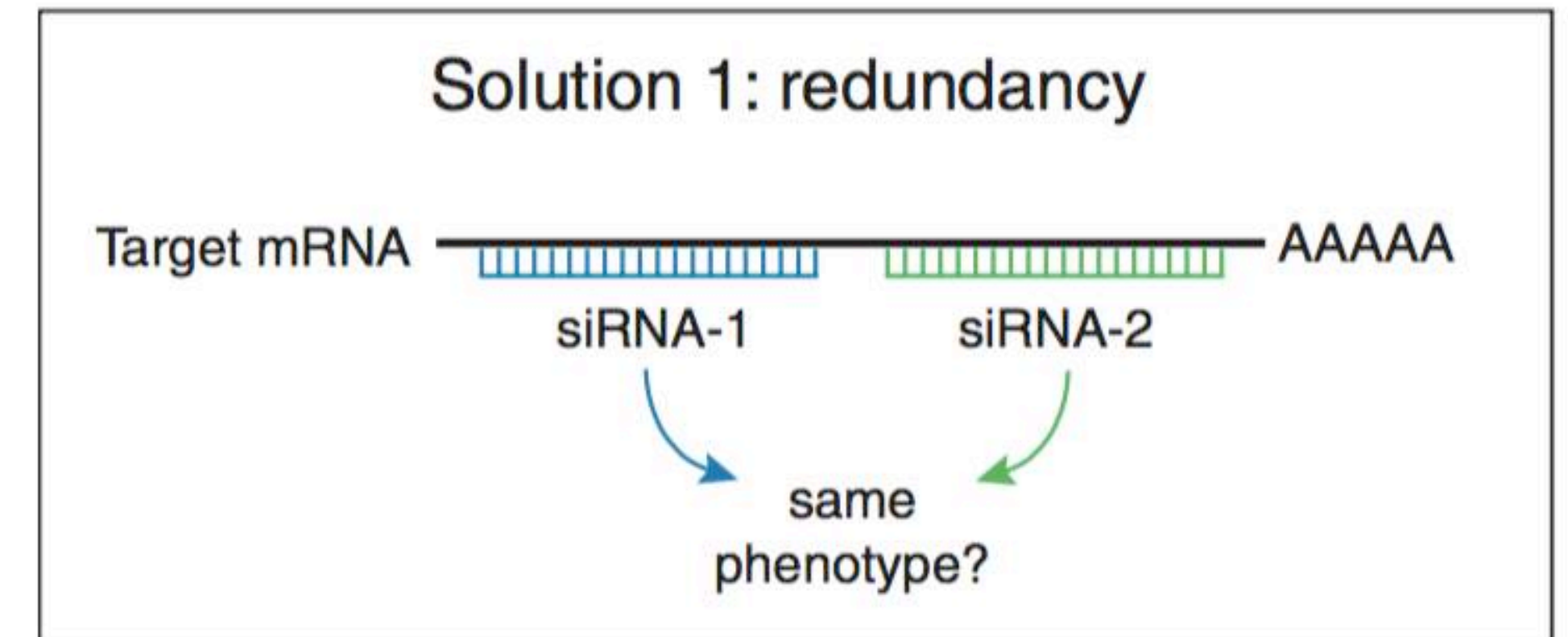
An shRNA expression library is introduced into cells such that any particular cell stably-expresses a single shRNA. shRNA plasmids are packaged into retroviruses and introduced into target cell populations at a low multiplicity of infection to achieve ~1 integrant per cell. Over a culture period, time points were collected early and late after selection. The shRNA are amplified from genomic DNA from screening pools and sequenced. Representation of shRNA in late time points are compared to earlier times to determine depletion. Transduced cells are subjected to experimental conditions; a phenotype of interest is scored and which is then easily linked to an underlying gene via the shRNA harbored within those cells. Adapted from Silva et al., Figure 1 (2008).



# Minimizing false-positives: Rescue and Redundancy

- Όπως συμβαίνει συχνά, η αρχική ευφορία γύρω από τις πειραματικές και θεραπευτικές δυνατότητες του RNAi έδωσε τη θέση της σε μια αυξανόμενη συνειδητοποίηση των παγίδων. Μεταξύ των πιο ολέθριων είναι τα «φαινόμενα εκτός στόχου» (OTE), όπου ένα shRNA δημιουργεί έναν φαινότυπο μέσω ενός γονιδίου στόχου ή μιας διαδικασίας διαφορετικής από τον αρχικά επιδιωκόμενο στόχο. Τέτοια ψευδώς θετικά μπορεί να έχουν σημαντικές συνέπειες, όπως αποδεικνύεται από την αδυναμία των βιομηχανικών ομάδων να επικυρώσουν στόχους φαρμάκων που προσδιορίζονται χρησιμοποιώντας shRNA σε ακαδημαϊκά/ερευνητικά εργαστήρια (Prinz 2011).
- In order to minimize false positives arising from off-target effects of RNAi, **researchers have proposed rules of thumb to follow - the ‘two Rs’** (Echeverri 2006). Appropriate experimental controls to minimize risks of misinterpretation of RNAi data due to off-target effects (OTEs). siRNAs and shRNAs trigger detectable off-target effects in all major systems studied to date, from mammalian cells to *D. melanogaster* and *C. elegans*. Simple solutions are available to minimize the risk that an observed phenotype may arise from an off-target effect rather than the targeted gene’s loss of function. Adapted from Echeverri et al., 2006.

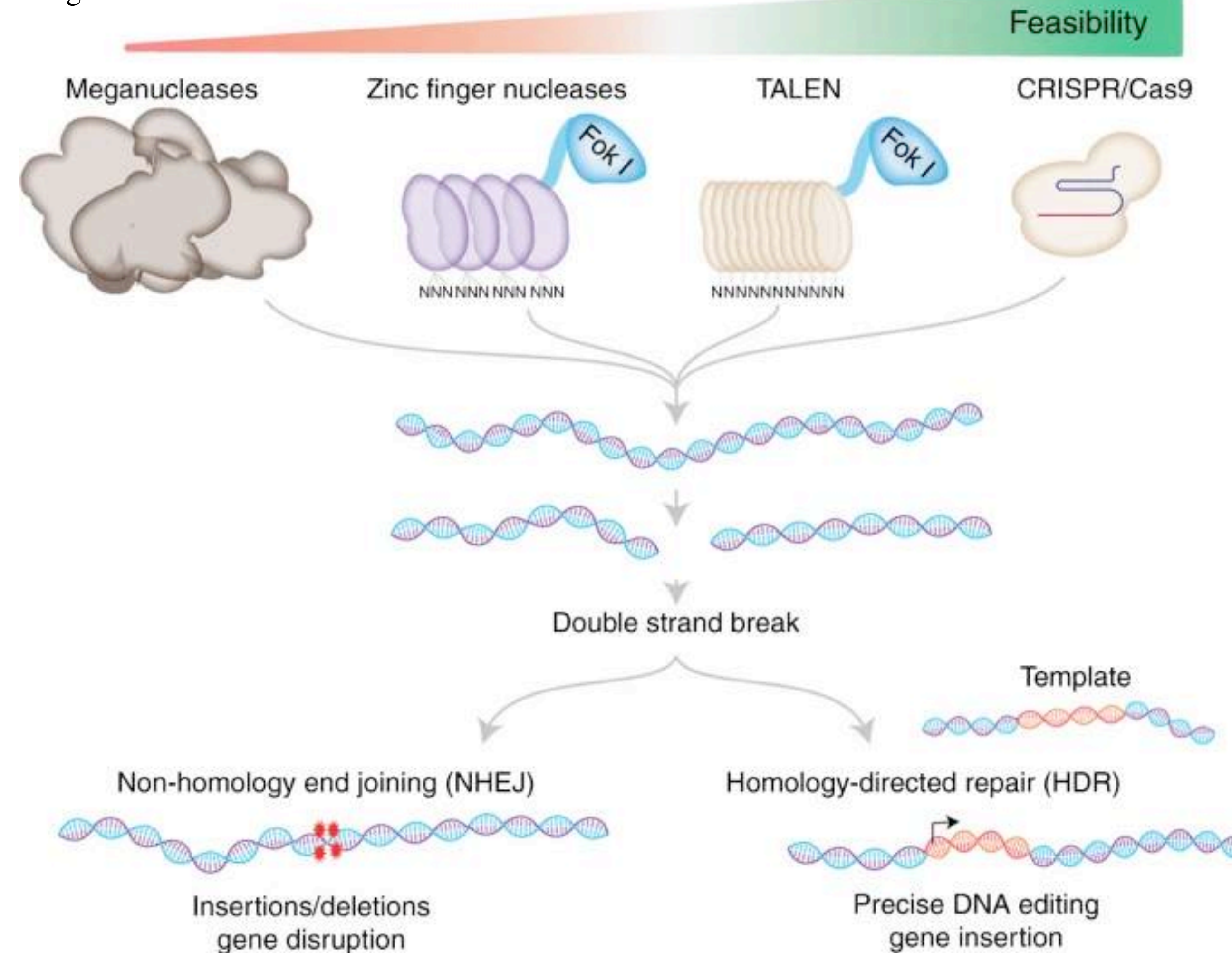
## Sequence-dependent OTEs (for example, miRNA effects, etc.)



# Genome editing systems

Adli, M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun* 9, 1911 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>

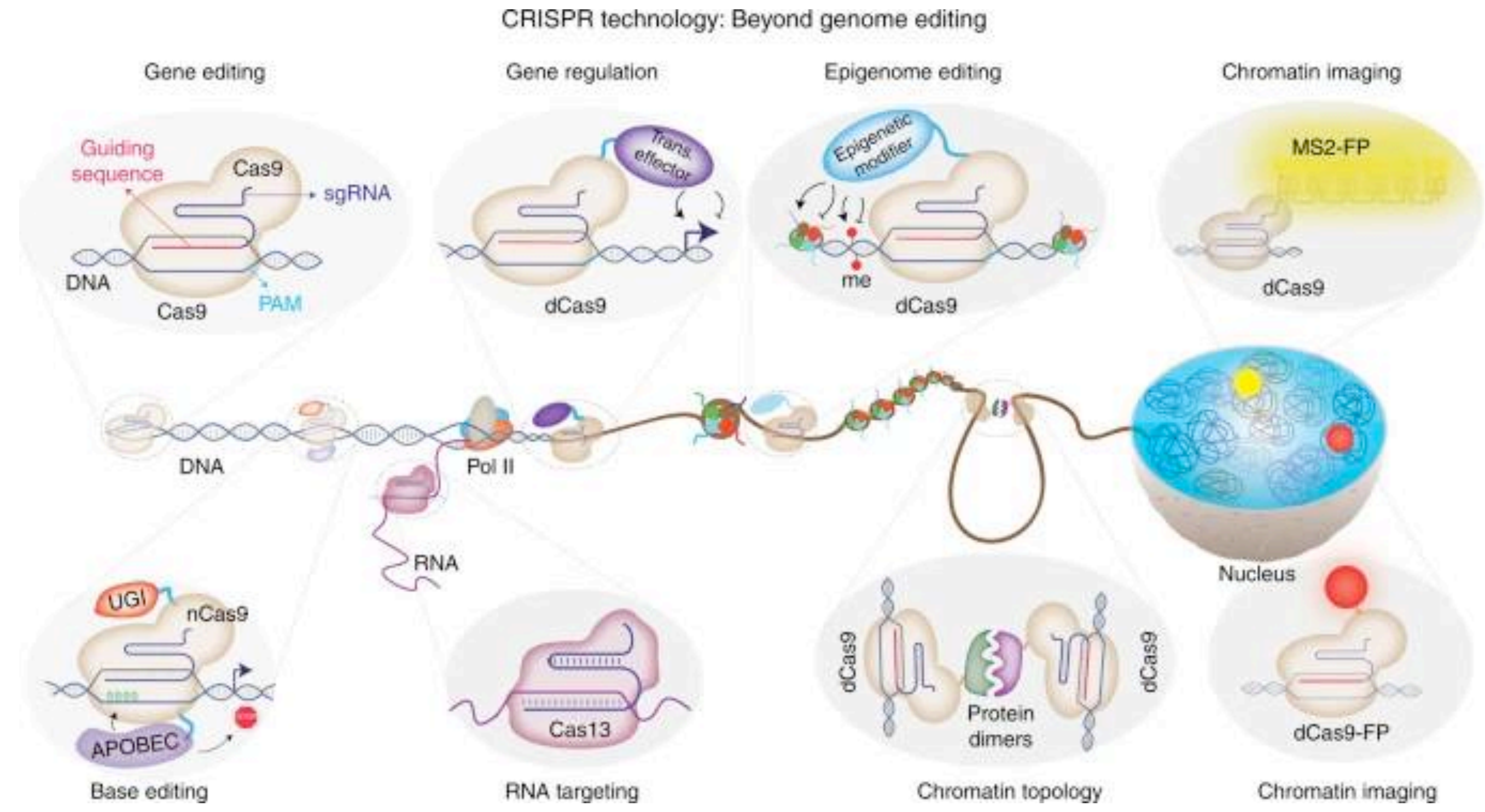
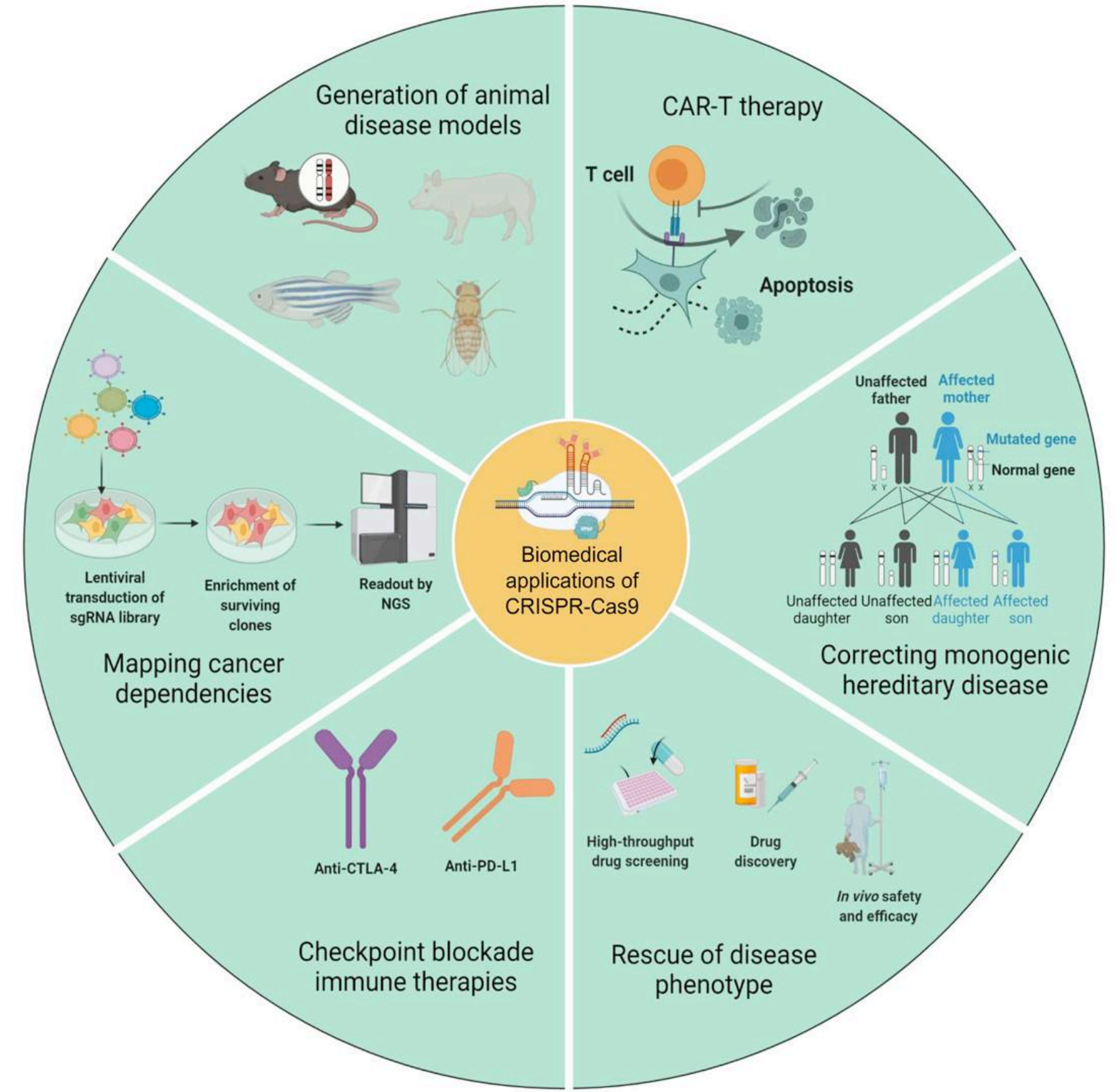
- Knock-out experiments
- CRISPR stands for clustered regularly interspaced short palindromic repeat DNA sequences. Although the name CRISPR was coined much later, these repeat elements were initially noticed in *Escherichia coli* by Dr. Nakata's group. **Interestingly, unlike typical tandem repeats in the genome, the CRISPR repeat clusters were separated by non-repeating DNA sequences called spacers.** It took more than a decade for researchers to recognize the nature and origin of these spacer sequences. During the human genome project (HGP), the genomes of many other organisms, including many different phages, were also sequenced. The computational analysis of these genomic sequences led researchers to notice key features of CRISPR repeat and spacer elements. **1)** the CRISPR sequences are present in more than 40% of sequenced bacteria and 90% of archaea. **2)** the CRISPR elements are adjacent to multiple well-conserved genes called CRISPR-associated (Cas) genes (**cas9**). **3)** most interestingly, the non-repeating spacer DNA sequences were recognized to belong to viruses and other mobile genetic elements.
- Although the idea that it could serve as a bacterial immune system started to circulate among researchers, the exact mechanism of action was not known. After a viral challenge, *Streptococcus thermophilus* bacteria integrate new spacers derived from the phage genomic sequence into its genome. **More importantly, the spacer sequences of CRISPR dictate the targeting specificity of Cas enzymes, which provide defense against the phage.** Immediately following this work, other researchers further elucidated the mechanism of action of the CRISPR system. Within a year after this key discovery, it was shown that the activity of Cas enzymes is guided by short CRISPR RNAs (crRNA) transcribed from the spacer sequences and that it can block horizontal DNA transfer from bacterial plasmids.



The basic working principle of major genome-editing technologies. Meganucleases are engineered restriction enzymes that recognize long stretches of DNA sequences. Each zinc finger nuclease recognizes triple DNA code whereas each TALE recognizes an individual base. Unlike protein–DNA recognition in ZFNs and TALENs, simple RNA–DNA base pairing and the PAM sequence determine CRISPR targeting specificity. All these tools result in DNA double-strand breaks, which are repaired either by error-prone non-homology end joining or homology-directed repair. While NHEJ results in random indels and gene disruption at the target site, HDR can be harnessed to insert a specific DNA template (single stranded or double stranded) at the target site for precise gene editing

# 2nd Generation CRISPR-Cas9 gene-editing tools

- Major application areas of CRISPR-Cas-based technologies beyond genome editing. While WT Cas9 enables genome editing through its guidable DNA cleavage activity, catalytically impaired Cas9 enzymes have been repurposed to achieve targeted gene regulation, epigenome editing, chromatin imaging, and chromatin topology manipulations. Furthermore, the catalytically impaired nickase Cas9 enzyme has been used as a platform for base editing without double strand breaks. In addition to DNA-targeting Cas proteins, novel RNA-targeting CRISPR/Cas systems have been described as well



Bhattacharjee G, Gohil N, Khambhati K, Mani I, Maurya R, Karapurkar Gohil J, Chu DT, Vu-Thi H, Alzahrani KJ, Show PL, Rawal RM, Ramakrishn Singh V. Current approaches in CRISPR-Cas9 mediated gene editing biomedical and therapeutic applications. *J Control Release*. 2022 Mar;343:703-723. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.02.005. Epub 2022 Feb 9. PMID: 35149141.

Τα μικρόRNAs, miRNAs, miRs



# Χαρακτηριστικά των miRNAs στα ζώα

- Βάση δεδομένων mirBase
- 0.5%-1.0% των πιθανών γονιδίων εκφράζουν miRNAs (!!)
- Μία από τις μεγαλύτερες σε αφθονία κατηγορίες ρυθμιστικών γονιδίων
- Έχουν ιστο-ειδική (tissue-specific) έκφραση ή έκφραση ειδική σε μια αναπτυξιακή φάση (developmental stage-specific) του οργανισμού
- Μεγάλη εξελικτική συντήρηση
- Το κάθε miRNA υπολογίζεται ότι μπορεί να στοχεύσει γύρω στα 200 mRNA στόχους

# Homology Between *C. elegans* and *Homo sapiens* miRNAs

## *lin-4* family

UCCCUGAGA . . . CCCU AACUUGUGA Hs miR-125b-1  
 UCCCUGAGA . . . CCCU AACUUGUGA Hs miR-125b-2  
 UCCCUGAGA . . . CCUC AACUUGUGA Ce *lin-4*  
 UCCCUGAGAAUUUCUGAACAGCUU Ce miR-237

## *let-7* family

AGAGGUAGUAGGUGGCAUAGU . . . Hs *let-7d*  
 UGAGGUAGGAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7e*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7a-1*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7a-2*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7a-3*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7a-4*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Ce *let-7*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7f-1*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7f-2*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs miR-98  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7g*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7i*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7b*  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Hs *let-7c*  
 UAGGUAGU . . . UUCAUGUUGUUGGG Hs miR-196-1  
 UAGGUAGU . . . UUCAUGUUGUUGGG Hs miR-196-2  
 UGAGGUAGUAGGUGGUAUAGU . . . Ce miR-84  
 UGAGGUAGG . . . CUCAGUAGUUGCGA . . . Ce miR-48  
 UGAGGUAGG . . . USC . G . AGAAAUUGA . . . Ce miR-241

## *mir-1* family

UGGAAUGUAAAAGAAAGUAUGUA Hs miR-1b  
 UGGAAUGUAAAAGAAAGUAUGUA Hs miR-1d  
 UGGAAUGUAAAAGAAAGUAUGUA . . . Ce miR-1  
 UGGAAUGUAAAAGAAAGUAUGUA . . . Hs miR-206

## *mir-9* family

UCUUUGGUUAAU . . . CUAGCUG . UAUGA Hs miR-9-1  
 UCUUUGGUUAAU . . . CUAGCUG . UAUGA Hs miR-9-2  
 UCUUUGGUUAAU . . . CUAGCUG . UAUGA Ce miR-244

## *mir-10* family

AACCC . . . GUAGAUCGGAACU . UGUU . . . Hs miR-100-1  
 AACCC . . . GUAGAUCGGAACU . UGUU . . . Hs miR-100-2  
 AACCC . . . GUAGAUCGGAACU . UGUU . . . Hs miR-99b  
 UACCCUGUAGA . . . UCGAGCUGUGUGU Ce miR-57  
 UACCCUGUAGA . . . UCGAGCUGUGUGU Hs miR-10a  
 UACCCUGUAGA . . . UCGAGCUGUGUGU Hs miR-10b  
 AACCC . . . GUAGAUCGGAACU . UGUU . . . Hs miR-99a  
 UACCC . . . GUAGAUCGGAACU . UGUU . . . Ce miR-51

## *mir-19* family

UGUGCAAUUC . . . UAU . . . GCAAAACUGA . . . Hs miR-19a  
 UGUGCAAUUC . . . UAU . . . GCAAAACUGA . . . Hs miR-19b-1  
 UGUGCAAUUC . . . UAU . . . GCAAAACUGA . . . Hs miR-19b-2  
 . . . UGCAAUUC . . . UAU . . . GCAAAACUGA . . . Ce miR-254

## *mir-25* family

UAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Hs miR-92-1  
 UAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Hs miR-92-2  
 UAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Ce miR-235  
 CAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Hs miR-25-1  
 CAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Hs miR-25-2  
 UAUUGCACUUGUC . . . CCGG . CUGU Hs miR-32

## *mir-29* family

UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29b-1  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29b-2  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29b-3  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29c  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29a-1  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Hs miR-29a-2  
 UAGCACCAUUUGAAAUCAGU . . . GUU Ce miR-83

## *mir-31* family

AGGCAAGAUGGUGGCA . . . U . . . AGC . . . Ce miR-72  
 . . . GGCAAGAUGGUGGCA . . . U . . . AGC . . . Hs miR-31  
 UGGCAAGAUGGUGGCA . . . U . . . AGC . . . Ce miR-73

## *mir-34* family

AGGCAGUGGUGGUA . . . GCUGGUGU . . . Ce miR-34  
 UGGCAGUGGUGGUA . . . GCUGGUGU . . . Hs miR-34  
 UGG . . . AGGUGGACAAU . . . UGGUGUUGUGU . . . Hs miR-122a

## *mir-50* family

UGAUAUGUAAUCU . . . AGCUUACAG . . . Ce miR-62  
 UGAUAUGUAAUCU . . . AGCUUACAG . . . Ce miR-50  
 UGAUAUGUAAUCU . . . AGCUUACAG . . . Hs miR-190  
 UGAUAUGUAAUCU . . . AGCUUACAG . . . Ce miR-90

## *mir-74* family

UGG . . . AGAGAA . . . AGGCAGUUC . . . Hs miR-185  
 UGGCA . . . AGAAAU . . . AGGCAGU . . . CUACA Ce miR-74

## *mir-76* family

UCCGU . . . UGUGU . . . AU . . . GAAGCCUUGA Ce miR-76  
 . . . UCCGU . . . UGUGU . . . AU . . . GAAGCCUUGA . . . Hs miR-187

## *mir-79* family

AUAAAGCUAGGUUAACCAAGCU . . . Ce miR-79  
 . . . UAAAGCUAGGUUAACCAAGCU . . . Hs miR-131  
 UAAAGCUAGGUUAACCAAGCU . . . Ce miR-75

## *mir-80* family

UGAGAUCAUUC . . . GU . . . GAAAGCCUAGU Ce miR-81  
 UGAGAUCAUUC . . . GU . . . GAAAGCCUAGU Ce miR-82  
 UGAGAUCAUUC . . . GU . . . GAAAGCCUAGU Ce miR-80  
 UGAGAUCAUUC . . . GU . . . GAAAGCCUAGU Hs miR-143

## *mir-105* family

UCAAAUGC . . . UCA . . . GACUCCUGU . . . Hs miR-105-1  
 UCAAAUGC . . . UCA . . . GACUCCUGU . . . Hs miR-105-2  
 . . . UAAAUGC . . . UCA . . . GACUCCUGU . . . Ce miR-232

## *mir-124* family

UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Hs miR-124a  
 UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Hs miR-124a  
 UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Hs miR-124a  
 UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Ce miR-124  
 UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Ce miR-228  
 UAAGGCACGCG . . . GU . . . GAAUGCCA . . . Hs miR-183

## *mir-133* family

UUGGUCCCCUUAACCAAGCUGU Hs miR-133a-1  
 UUGGUCCCCUUAACCAAGCUGU Hs miR-133a-2  
 UUGGUCCCCUUAACCAAGCUGU Hs miR-133b  
 AUUGGUCCCCUUAACCAAGCUGU Ce miR-245

## *mir-137* family

UAUUGCU . . . CG . . . AGAAUACCCUU . . . Ce miR-234  
 UAUUGCU . . . CG . . . AGAAUACCCUU . . . Hs miR-137

## *mir-141* family

UAAUACUGUCAGGUAAU . . . GAC . . . CU Ce miR-236  
 . . . AACACUGUCAGGUAAU . . . GAC . . . CU Hs miR-141

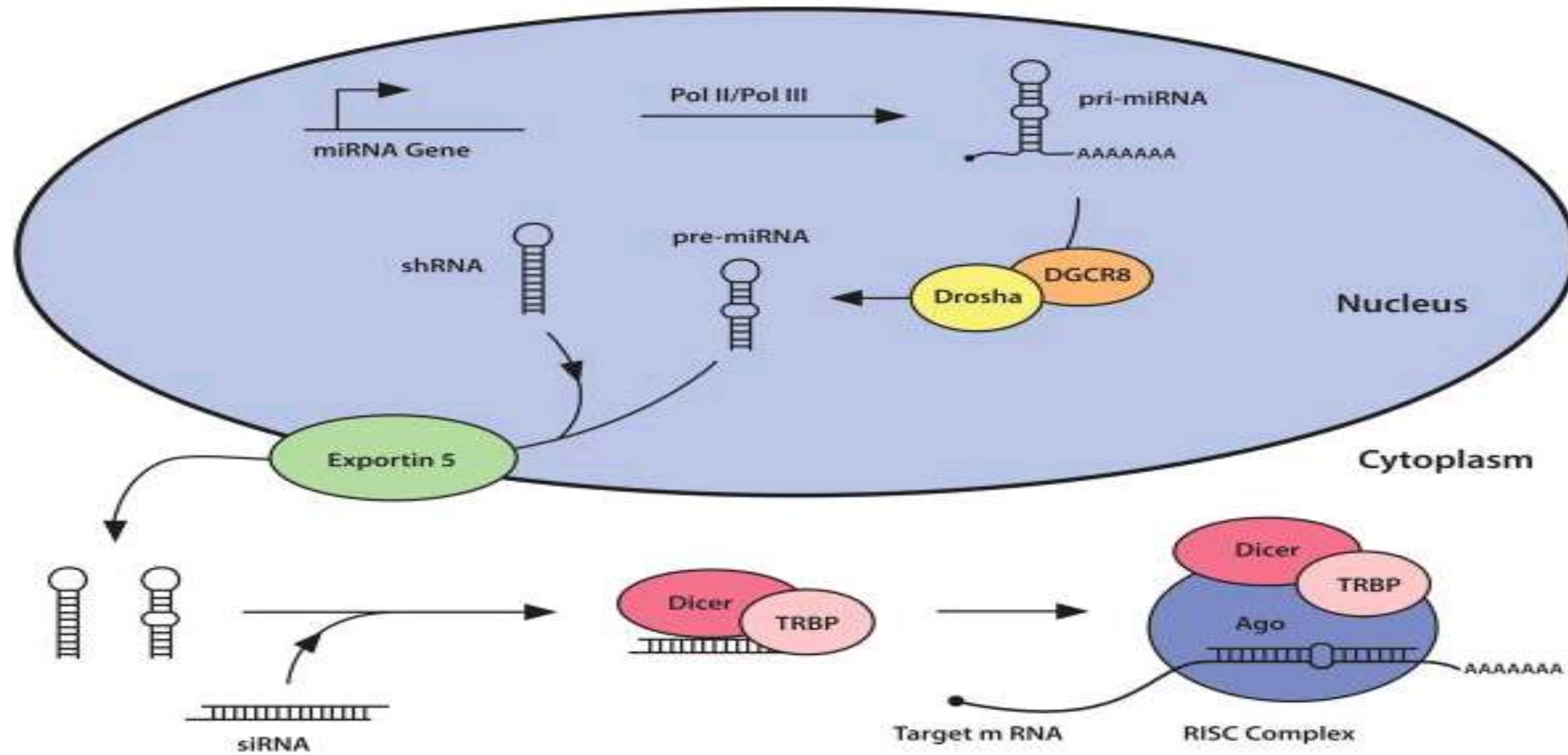
## *mir-193* family

UACUGGCC . . . CC . . . CAAA . . . UCUC . . . CU Ce miR-240  
 AACUGGCC . . . CC . . . CAAA . . . UCUC . . . CU Hs miR-193

## *mir-220* family

CACACACCUCA . . . CU . . . AACACU . . . GAC Ce miR-253  
 C . . . CACACCGUA . . . UCUG . . . AACACU . . . U Hs miR-220

# Το μονοπάτι miRNA/siRNA







# miRBase

# miRBase

<http://www.mirbase.org/>

[Home](#) [Search](#) [Browse](#) [Genomics](#) [Help](#) [Download](#) [Submit](#)

[miRBase](#) has moved to <http://www.mirbase.org/> - please update your links.

## News - release 14

The miRBase database has moved to a new location at <http://www.mirbase.org/>, hosted in the [Faculty of Life Sciences, University of Manchester](#). All pre-existing URLs should forward to their new locations. Please update your links, and note the new contact email address ([mirbase@manchester.ac.uk](mailto:mirbase@manchester.ac.uk)).

With release 14, the miRBase sequence database has broken through the 10000 entries barrier!

## miRBase: the microRNA database

miRBase provides the following services:

- The [miRBase database](#) is a searchable database of published miRNA sequences and annotation. Each entry in the miRBase Sequence database represents a predicted hairpin portion of a miRNA transcript (termed mir in the database), with information on the location and sequence of the mature miRNA sequence (termed miR). Both hairpin and mature sequences are available for [searching](#) and [browsing](#), and entries can also be retrieved by name, keyword, references and annotation. All sequence and annotation data a

miRN

[Relea](#)

[Sear](#)

[Dow](#)

[Dow](#)

[This](#)

[NetW](#)

[Highl](#)

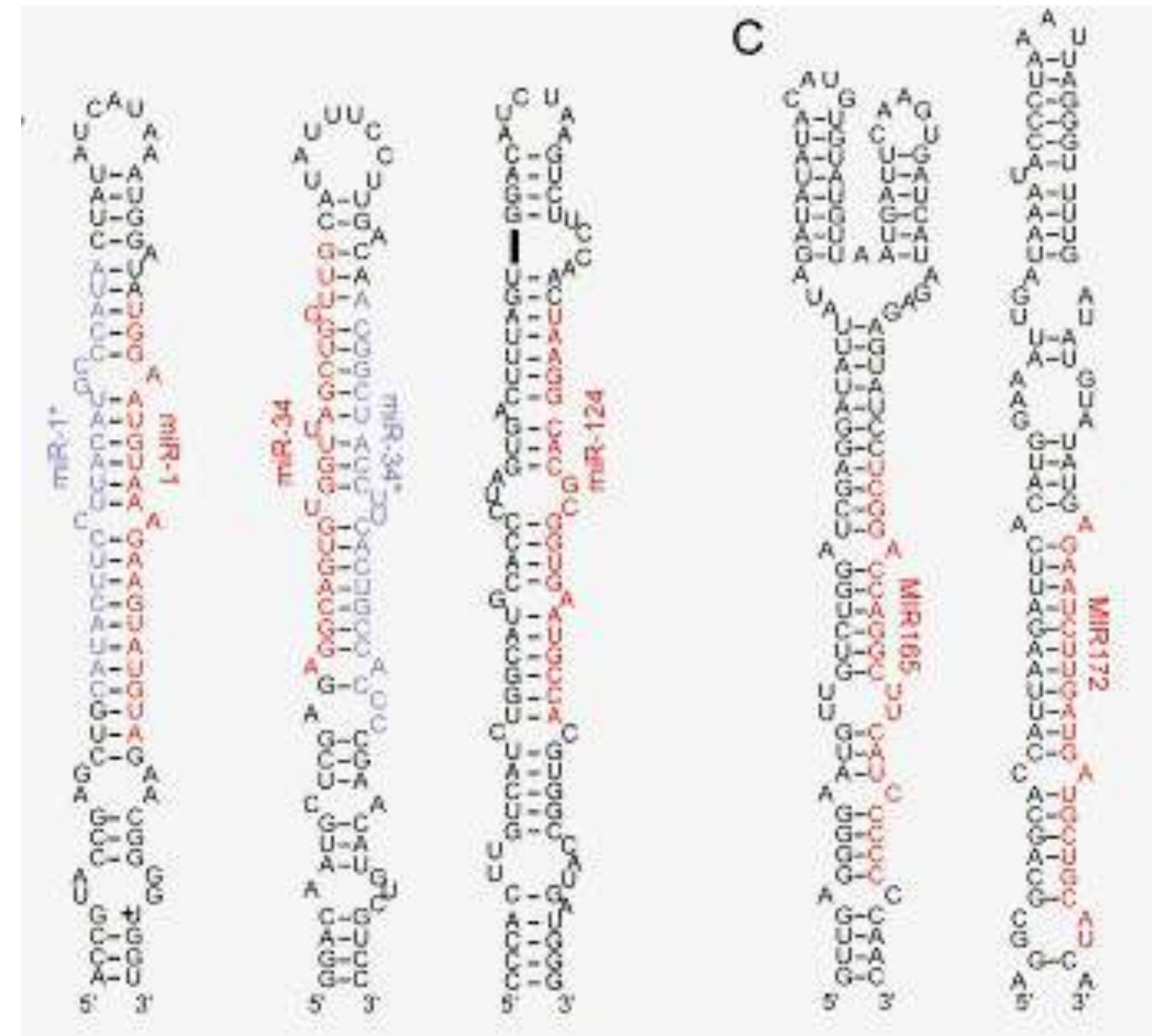
[Gene](#)



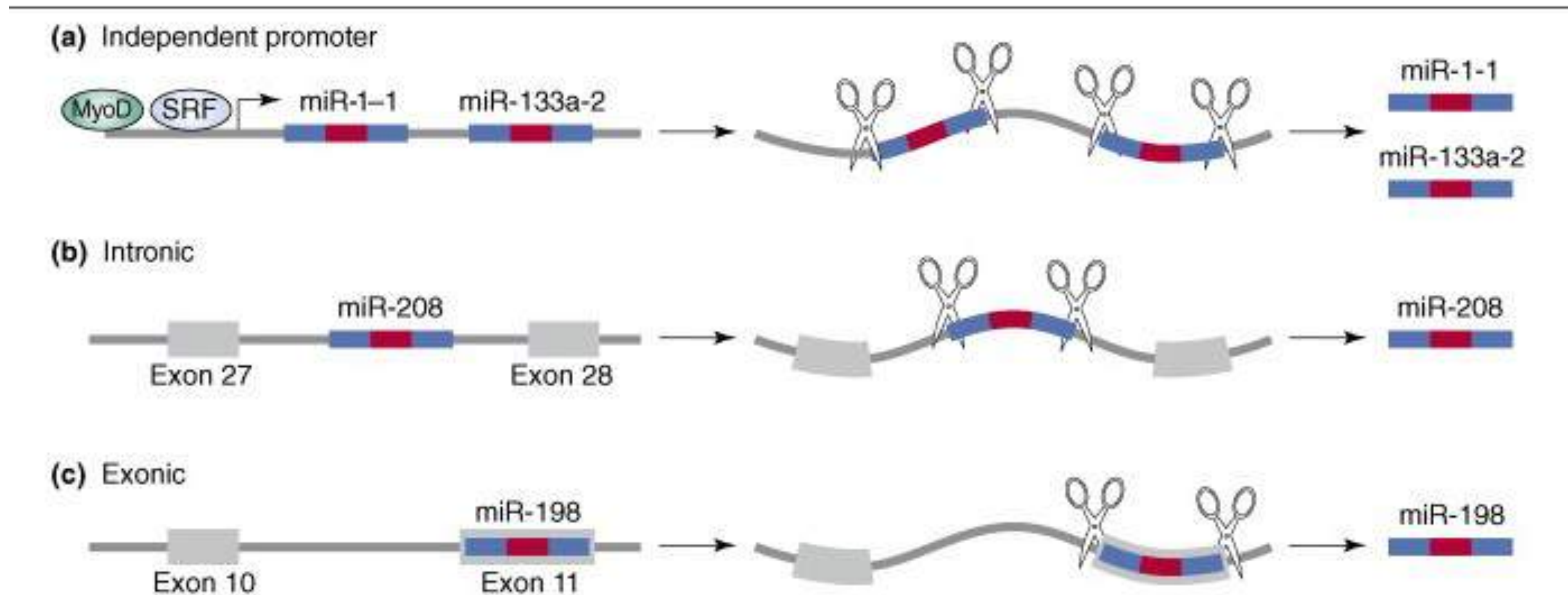
# Βιογένεση των μικροRNAs (microRNA, miRNA)

- Τα miRNAs είναι μονόκλιωνα RNAs (ssRNAs) μήκους ~22 nt που δημιουργούνται από ενδογενή μετάγραφα σε σχήμα φουρκέτας.
- Τα miRNAs λειτουργούν ως μόρια οδηγοί στη μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής ρύθμισης μέσω ζευγαρώματος βάσεων με τα mRNAs στόχους, συνήθως στη 3' μη-μεταφραστική περιοχή (3' untranslated region, 3'UTR).
- Η πρόσδεση ενός miRNA στο mRNA στόχο τυπικά οδηγεί σε μεταφραστική αναστολή και εξωνουκλεολυτική αποικοδόμηση του mRNA, αν και εφόσον η πρόσδεση είναι εξ' ολοκλήρου συμπληρωματική μπορεί να κοπούν ενδονουκλεολυτικά.
- Έχουν καταγραφεί και άλλοι τρόποι ρύθμισης, όπως η μεταφραστική ενεργοποίηση και η δημιουργία ετεροχρωματίνης.

Precursor miRNA Products Form Stem Loop Structures



# Genomic Organization of miRNA Genes

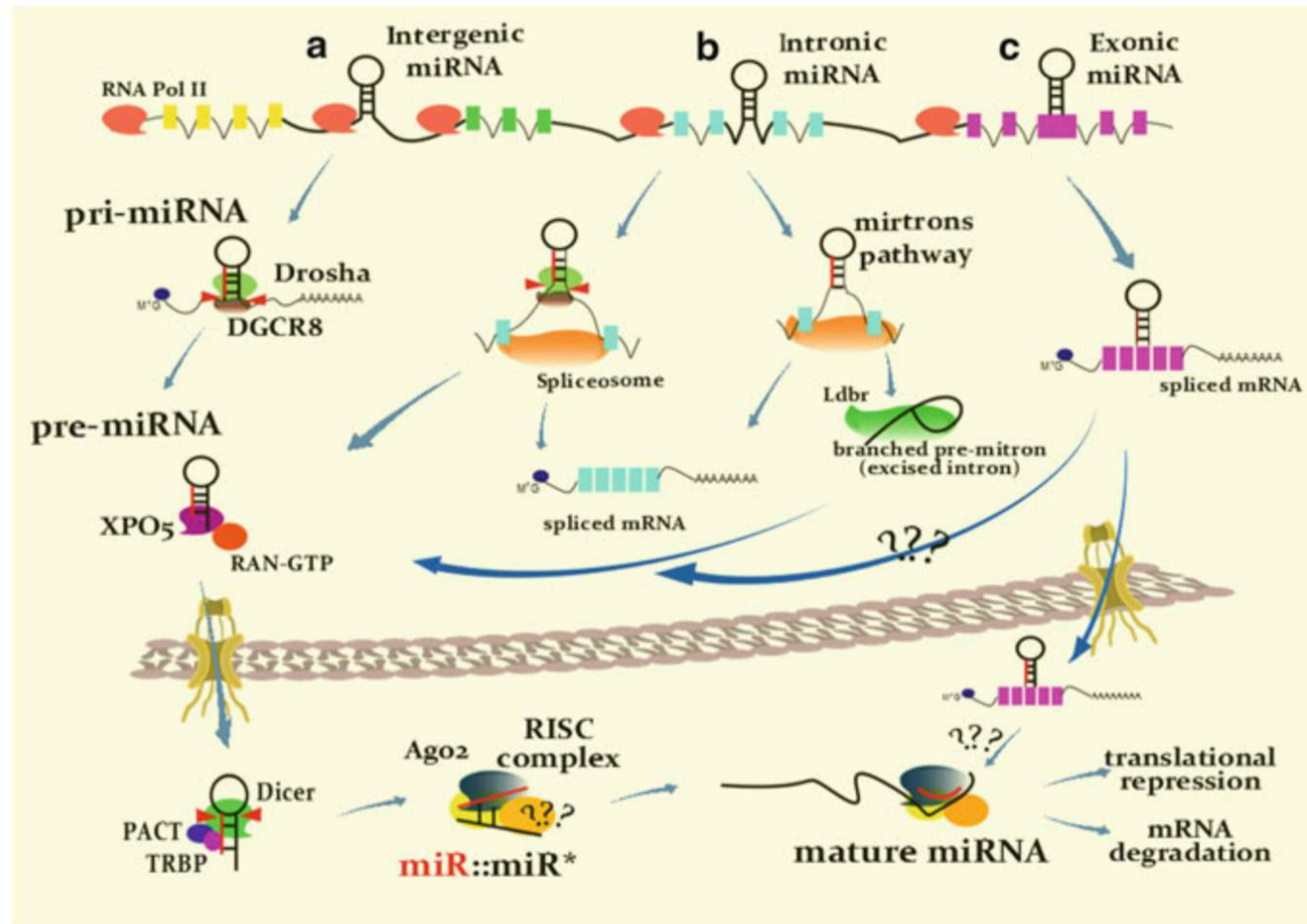


Intronic miRNAs often in antisense direction, made from own promoter

- Exonic miRNAs - non-coding (or in alternatively spliced exons)



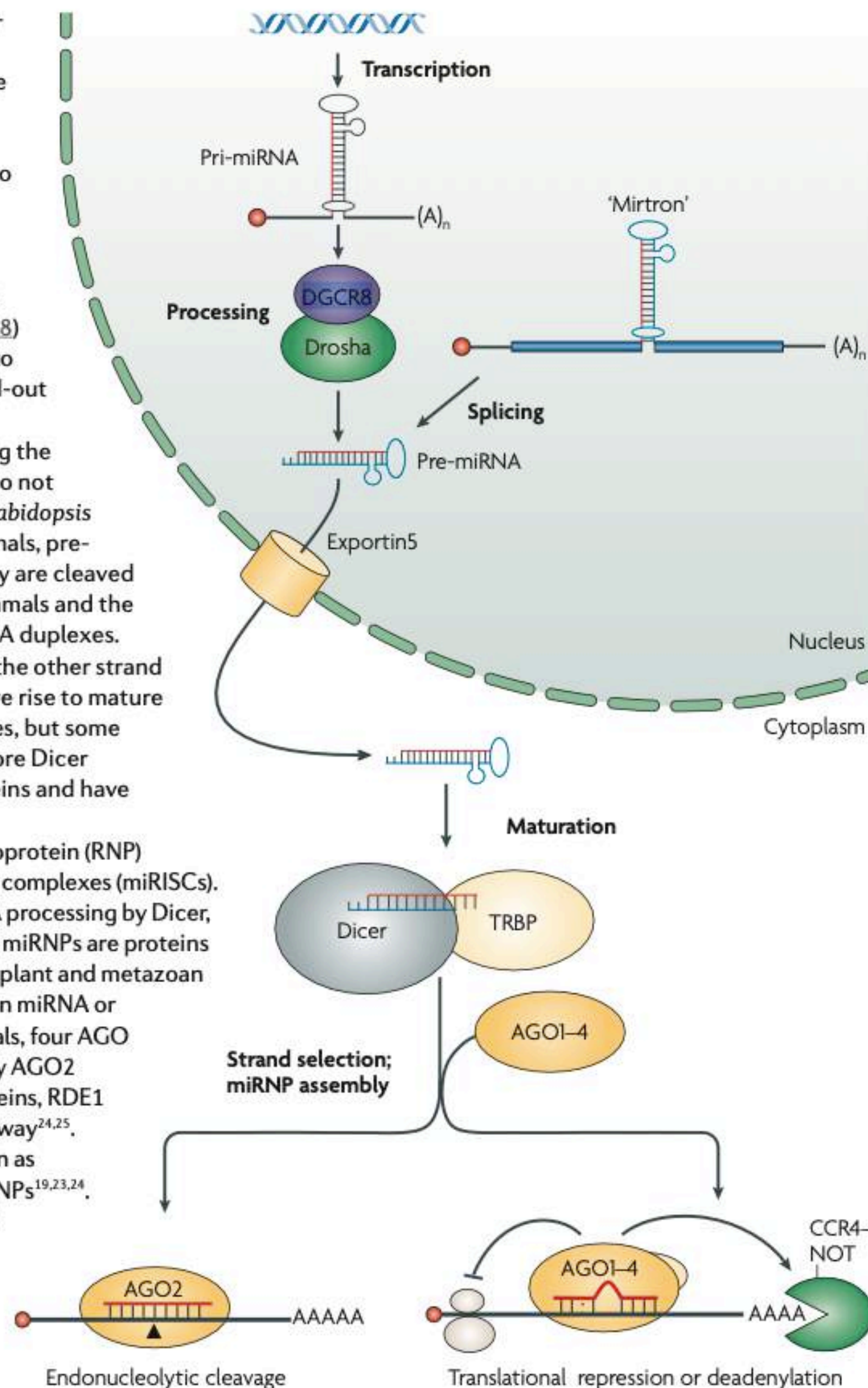
# Βιογένεση των μικροRNA



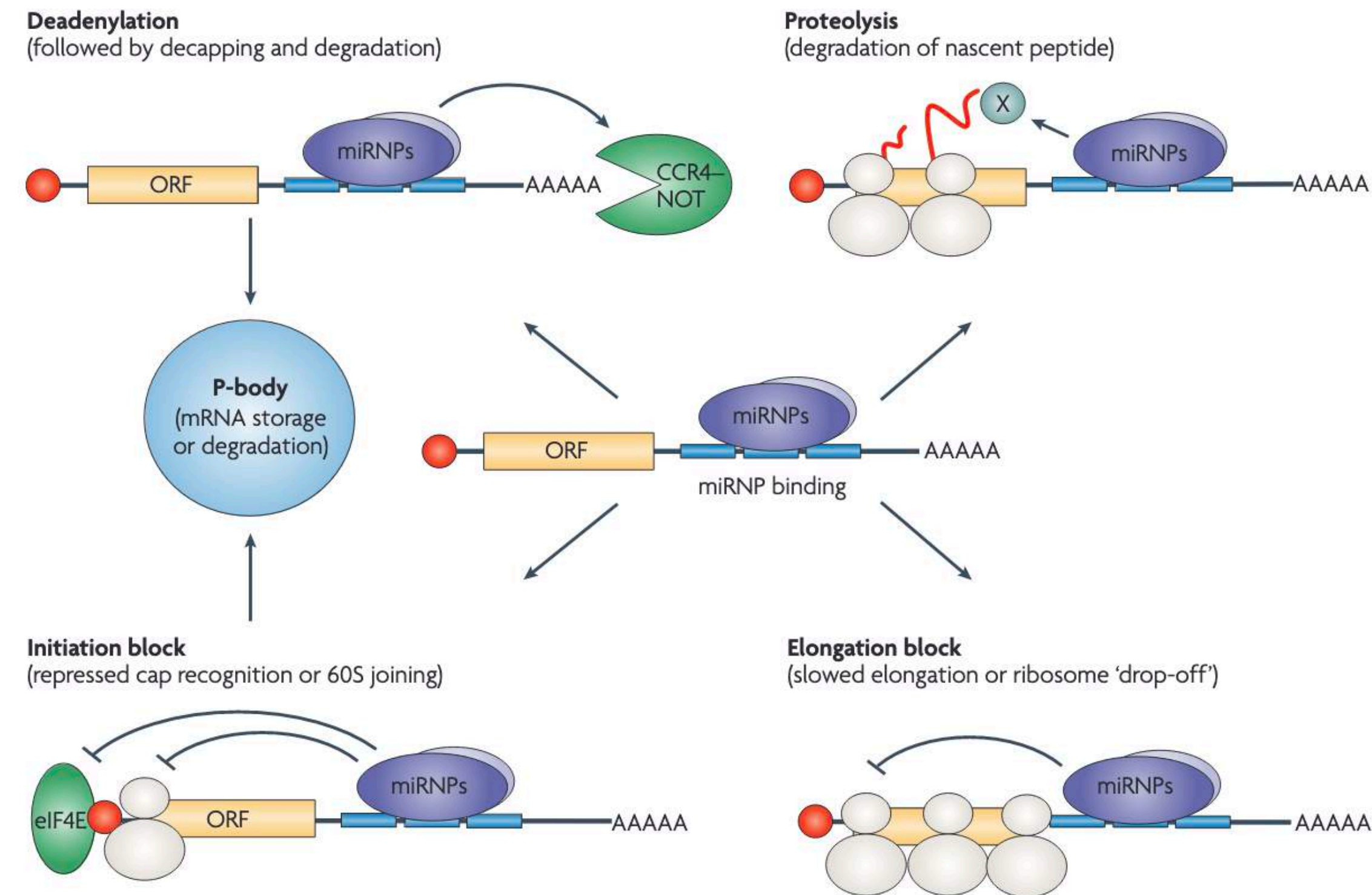
**Box 1 | Biogenesis of miRNAs and their assembly into microribonucleoproteins**

microRNAs (miRNAs) are processed from precursor molecules (pri-miRNAs), which are either transcribed from independent miRNA genes or are portions of introns of protein-coding RNA polymerase II transcripts. A single pri-miRNA often contains sequences for several different miRNAs. Pri-miRNAs fold into hairpin structures containing imperfectly base-paired stems and are processed in two steps, catalysed by the RNase III type endonucleases Droscha (also known as RN3) and Dicer. Both Droscha and Dicer function in complexes with proteins containing dsRNA-binding domains (dsRBDs). The Droscha partners are the *pasha* protein in *Drosophila melanogaster* or DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8) in mammals. The Droscha–DGCR8 complex processes pri-miRNAs to ~70-nucleotide hairpins known as pre-miRNAs<sup>1,3,21,24</sup>. Some spliced-out introns in *Caenorhabditis elegans*, *D. melanogaster* and mammals correspond precisely to pre-miRNAs (mirtrons), thus circumventing the requirement for Droscha–DGCR8 (REFS 125–127). Plant genomes do not encode Droscha homologues, and all miRNA biogenesis steps in *Arabidopsis thaliana* are carried out by one of four Dicer-like proteins<sup>29</sup>. In animals, pre-miRNAs are transported to the cytoplasm by *exportin5*, where they are cleaved by Dicer (complexed with TAR RNA binding protein (TRBP) in mammals and the *loquacious* gene product in *D. melanogaster*) to yield ~20-bp miRNA duplexes. One strand is then selected to function as a mature miRNA, while the other strand is degraded. Occasionally, both arms of the pre-miRNA hairpin give rise to mature miRNAs<sup>1,3,21,24</sup>. Vertebrates and *C. elegans* contain single *dicer* genes, but some other organisms like *D. melanogaster* and plants express two or more Dicer proteins that function as heterodimers with different dsRBD proteins and have specialized functions<sup>1,3,21,24</sup>.

Following their processing, miRNAs are assembled into ribonucleoprotein (RNP) complexes called micro-RNPs (miRNPs) or miRNA-induced silencing complexes (miRISCs). The assembly is a dynamic process, usually coupled with pre-miRNA processing by Dicer, but its details are not well understood<sup>1,3,21,24</sup>. The key components of miRNPs are proteins of the Argonaute (AGO) family. Of the many paralogues encoded in plant and metazoan genomes, usually only some — known as AGO proteins — function in miRNA or both miRNA and small interfering RNA (siRNA) pathways. In mammals, four AGO proteins (AGO1 to AGO4) function in the miRNA repression but only AGO2 functions in RNAi. In *C. elegans*, which expresses 27 Argonaute proteins, RDE1 is involved in RNAi and ALG1 and ALG2 function in the miRNA pathway<sup>24,25</sup>. Apart from AGOs, miRNPs can contain further proteins that function as regulatory factors or effectors mediating inhibitory function of miRNPs<sup>19,23,24</sup>. Examples are the fragile X mental retardation protein, FMRP, and its *D. melanogaster* orthologue, dFXR, which are RNA-binding proteins known to act as modulators of translation, particularly in neurons (reviewed in REF. 128). Some P-body components such as GW182 and RCK/p54 (see BOX 4) interact with miRNP AGO proteins and are essential for inducing repression<sup>78,92,104</sup>.



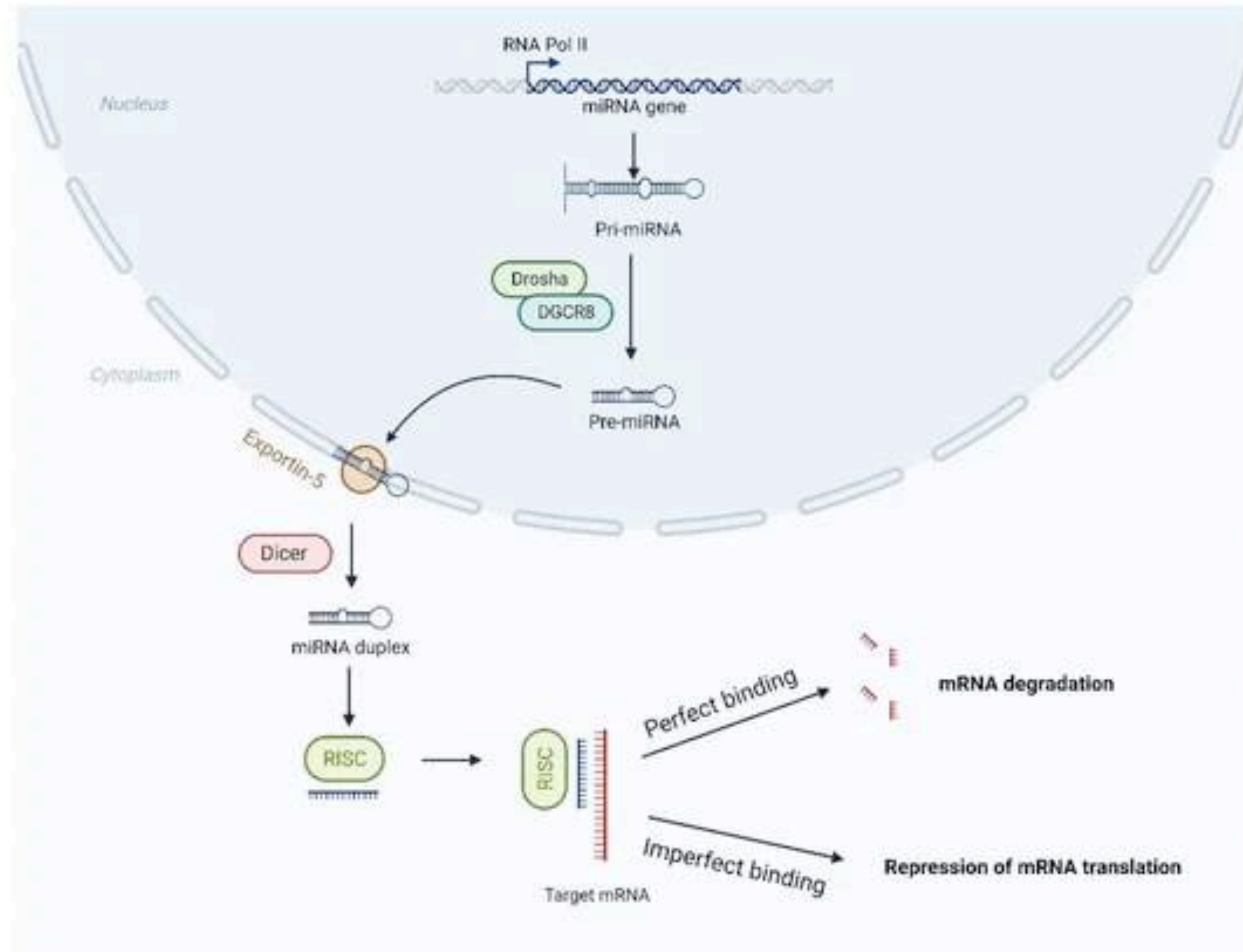
Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet.* 2008 Feb;9(2):102-14.



**Figure 3 | Possible mechanisms of the microRNA-mediated post-transcriptional gene repression in animal cells.** Binding of micro-ribonucleoproteins (miRNPs), possibly complexed with accessory factors, to mRNA 3' UTR can induce deadenylation and decay of target mRNAs<sup>56,78,79,83</sup> (upper left). Alternatively, miRNPs can repress translation initiation at either the cap-recognition stage<sup>43,44,53–55</sup> or the 60S subunit joining stage<sup>57</sup> (bottom left). mRNAs repressed by deadenylation or at the translation-initiation stage are moved to P-bodies for either degradation or storage. The repression can also occur at post-initiation phases of translation<sup>66–68</sup>, owing to either slowed elongation or ribosome 'drop-off' (bottom right). Proteolytic cleavage of nascent polypeptides was also proposed as a mechanism of the miRNA-induced repression of protein production<sup>67</sup> (upper-right). A protease (X) that might be involved in the process has not been identified. The 7-methylguanosine cap is represented by a red circle. eIF4E, eukaryotic initiation factor 4E.

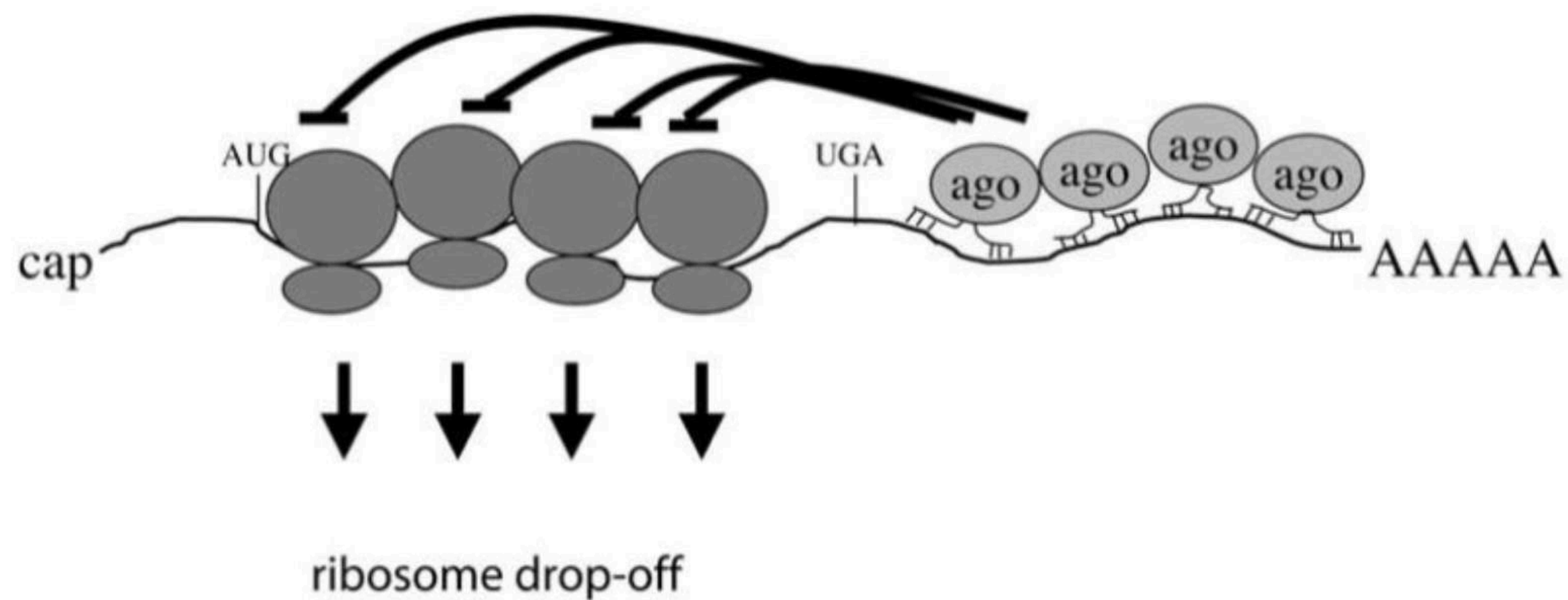
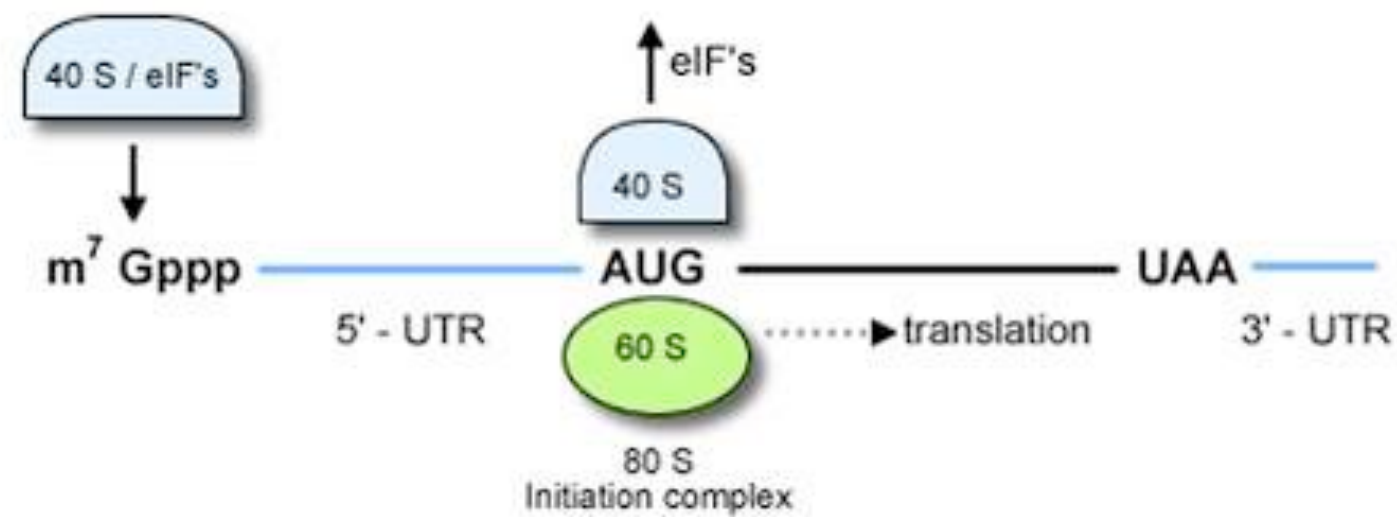
# A miRNA-mediated post-transcriptional silencing

- Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας βιοσύνθεσης του miRNA. Τα γονίδια που κωδικοποιούν τα miRNA μεταγράφονται σε pri-miRNA, το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε προ-miRNA. Το προ-miRNA μεταφέρεται στο κυτταρόπλασμα και μετατρέπεται σε δίκλωνο miRNA, τα οποία, μαζί με την πρωτεΐνη, δημιουργούν ένα σύμπλεγμα τελεστή, επαγόμενο από το RNA σύμπλοκο σίγησης. Εν τω μεταξύ, τα δίκλιωνα miRNA μετατρέπονται σε μονόκλιωνα, ένα από τα οποία παραμένει ως ώριμο miRNA. Επιτέλους, το ώριμο miRNA κάνει τον ρόλο του στη αποικοδόμηση ή την αναστολή της μετάφρασης του mRNA μέσω της δέσμευσης στις περιοχές-στόχους τους.

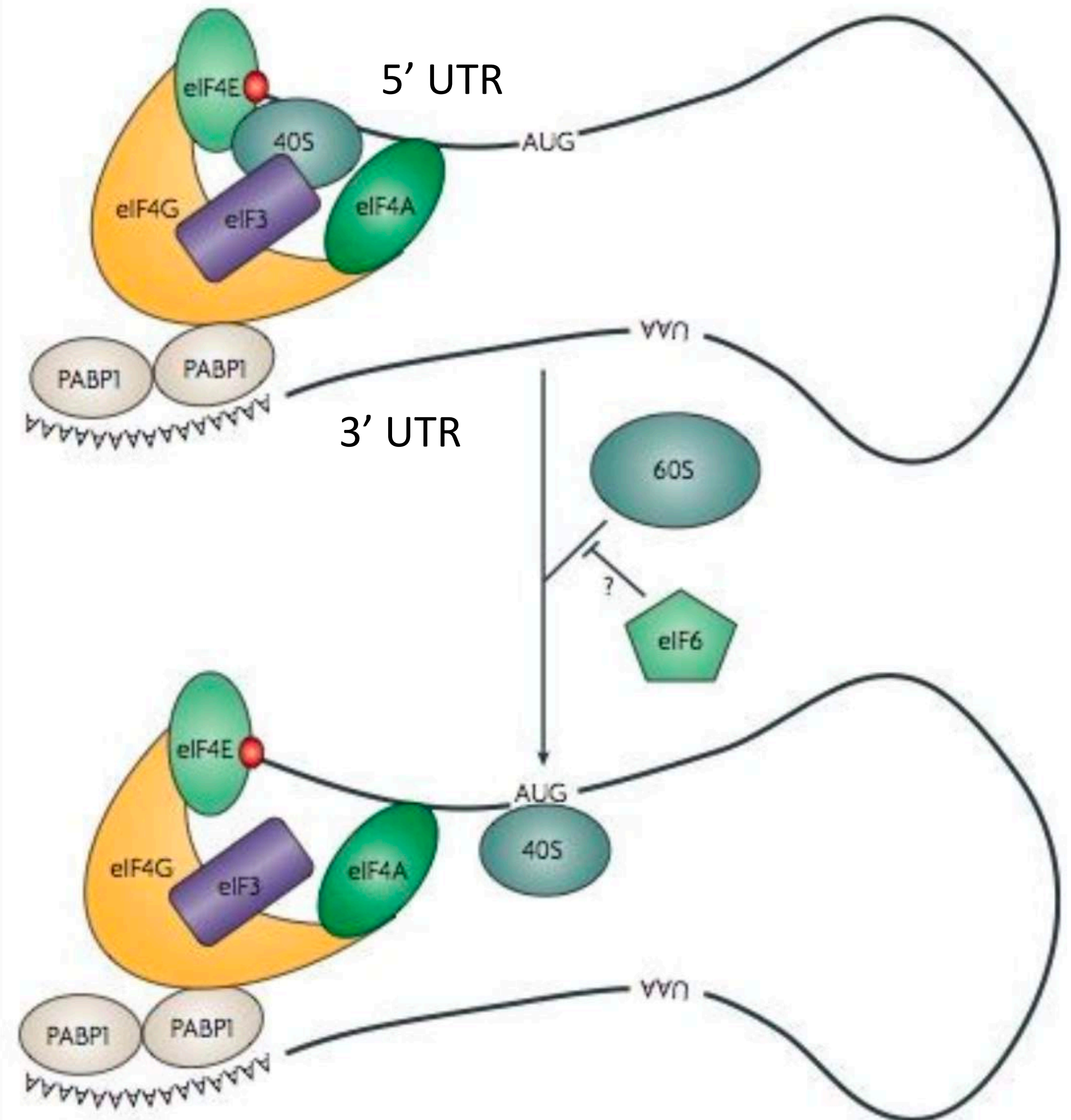


# miRNAs Inhibit Translation by Inducing Ribosome Drop-Off

## Translation initiation in Eukaryotes



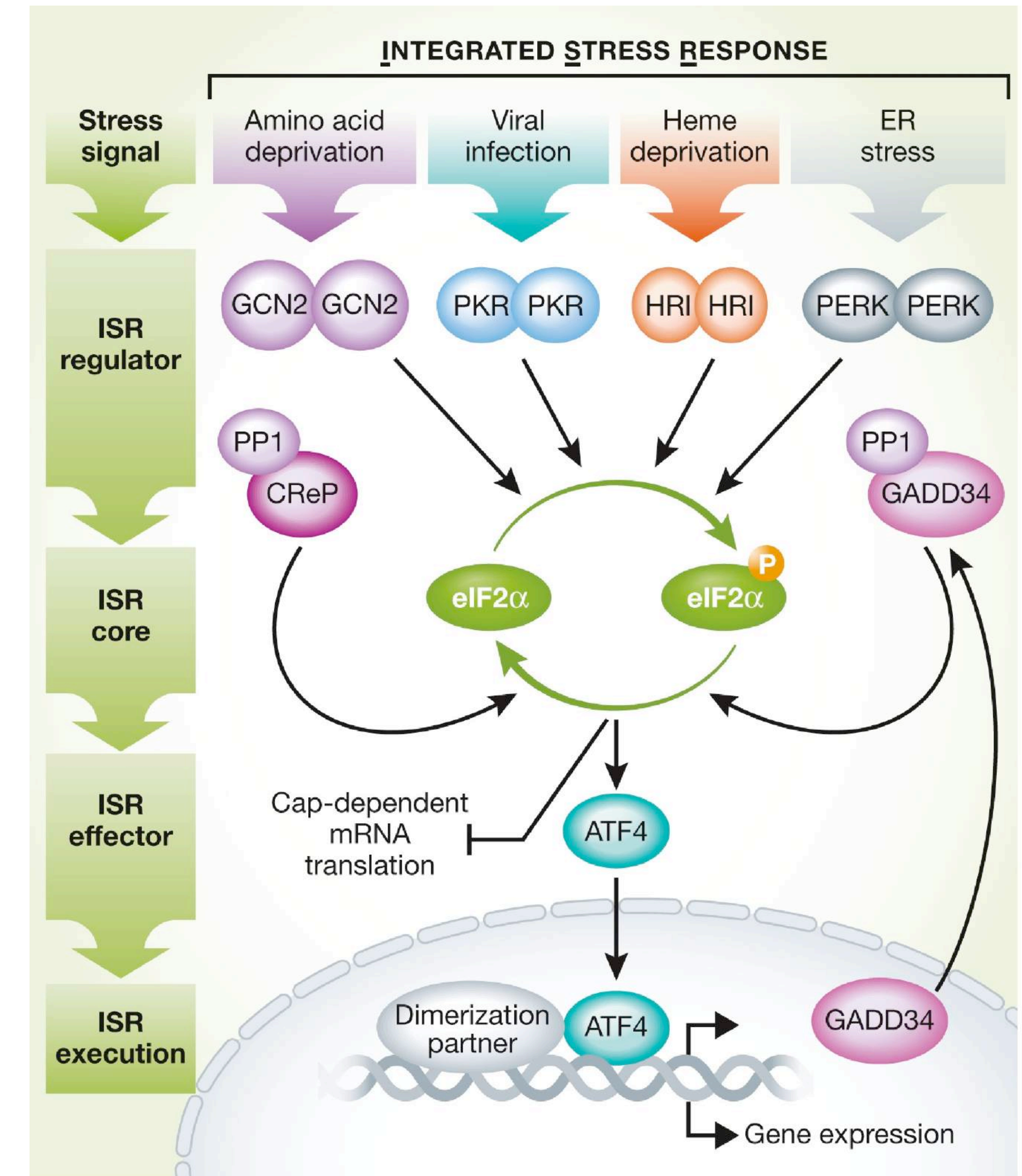
### Box 3 | Steps in eukaryotic translation



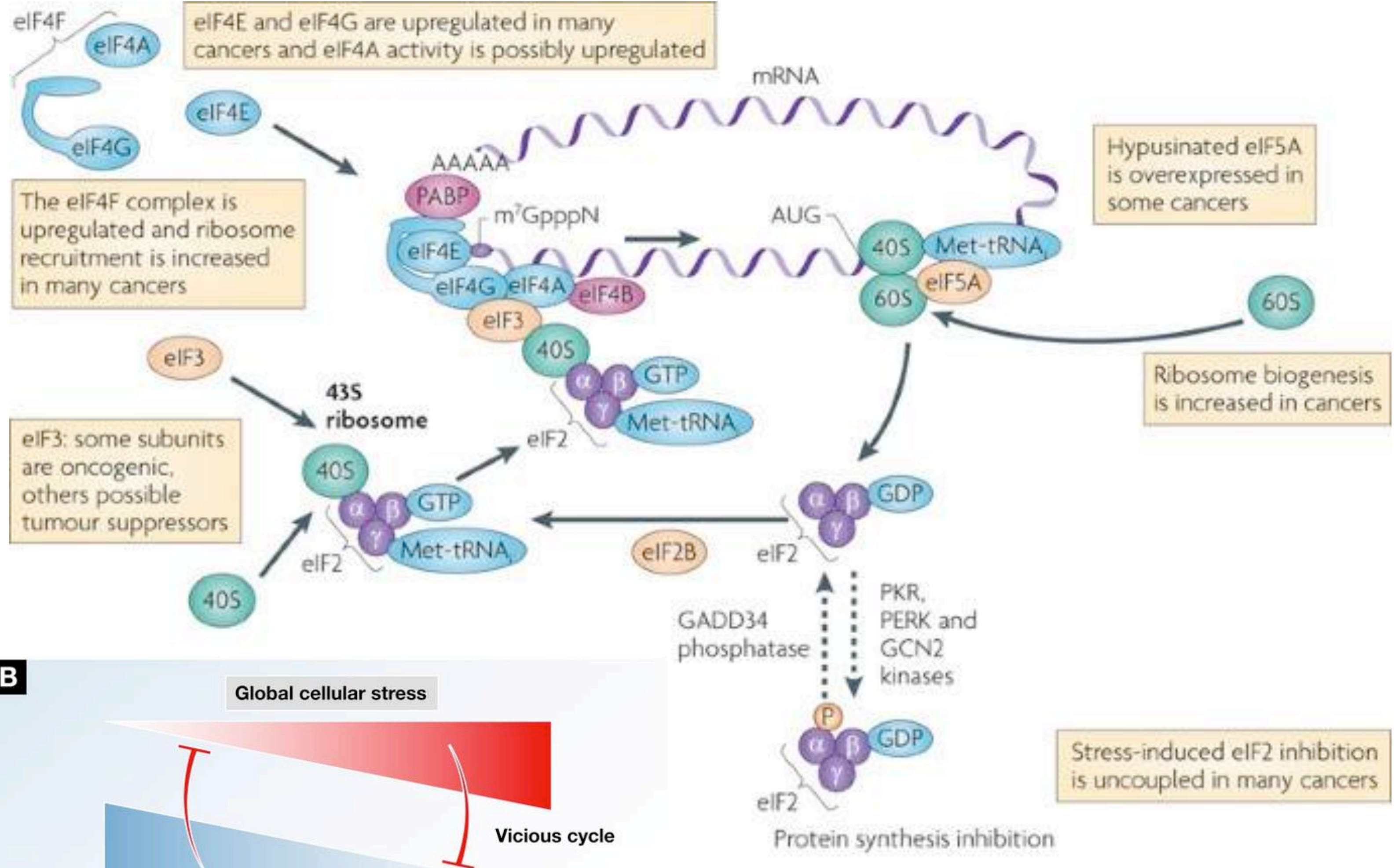
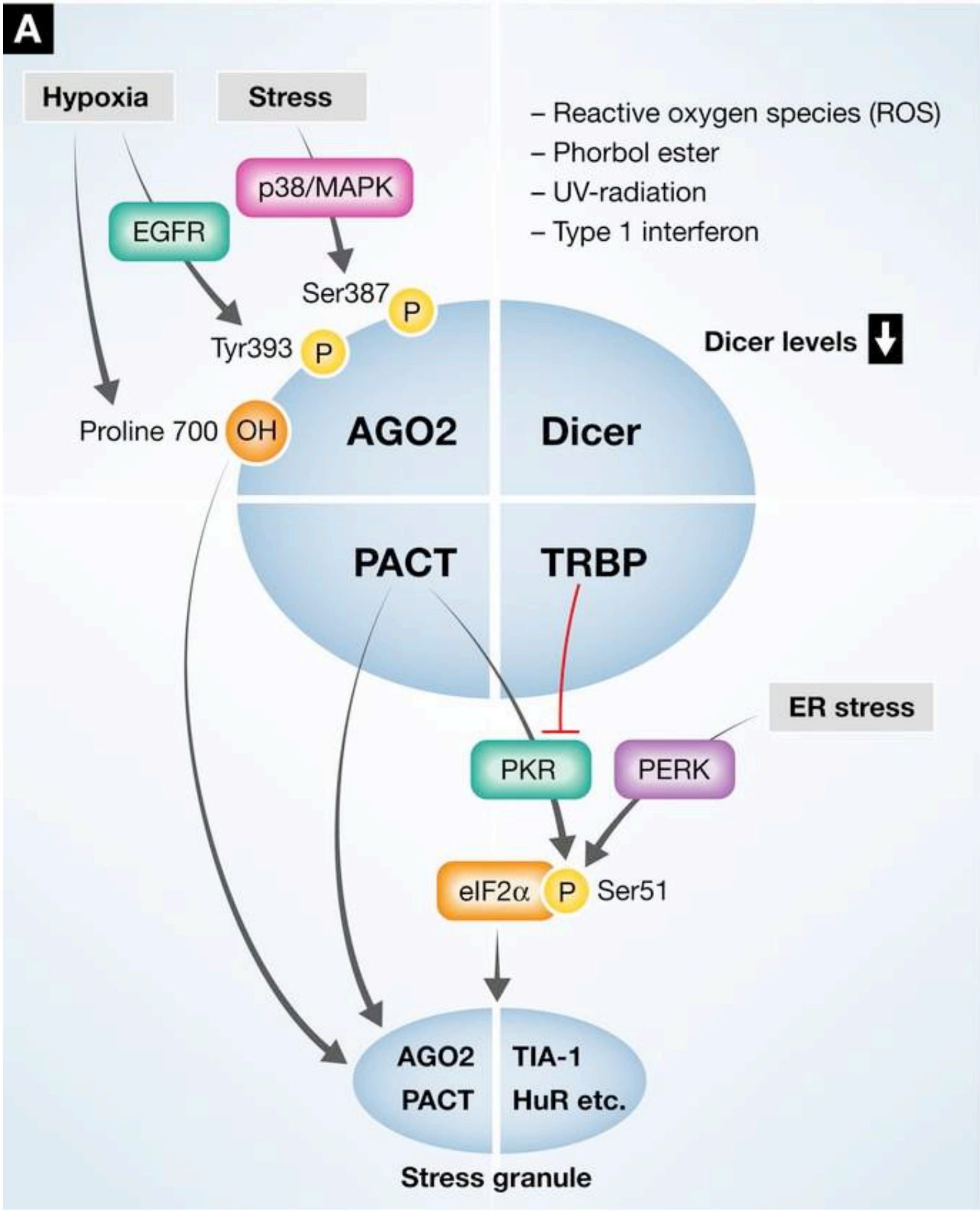
# The cellular stress response

- Autophagic cell death
- Necrosis
- The Heat-Shock response (HSR)
- Unfolded protein response (UPR)
- DNA damage and repair response (DDR/R)
- The Response to Oxidative Stress
- Switch from Prosurvival Signaling to Cell Death Signaling
- Stress Responses in Disease States

- The **integrated stress response (ISR)** is a conserved mechanism by which eukaryotic cells remodel gene expression to adapt to intrinsic and extrinsic stressors rapidly and reversibly. The ISR is initiated when stress-activated protein kinases phosphorylate the major translation initiation factor eukaryotic translation initiation factor 2 $\alpha$  (eIF2 $\alpha$ ), **which globally suppresses translation initiation activity and permits the selective translation of stress-induced genes including important transcription factors** such as activating transcription factor 4 (ATF4).
- **Translationally repressed messenger RNAs (mRNAs) and noncoding RNAs assemble into cytoplasmic RNA-protein granules and polyadenylated RNAs are concomitantly stabilized.**
- Thus, regulated changes in mRNA translation, stability, and localization to RNA-protein granules contribute to the reprogramming of gene expression that defines the ISR.



# Interrelations between the miRNA-bioprocessing machinery, stress and stress granules



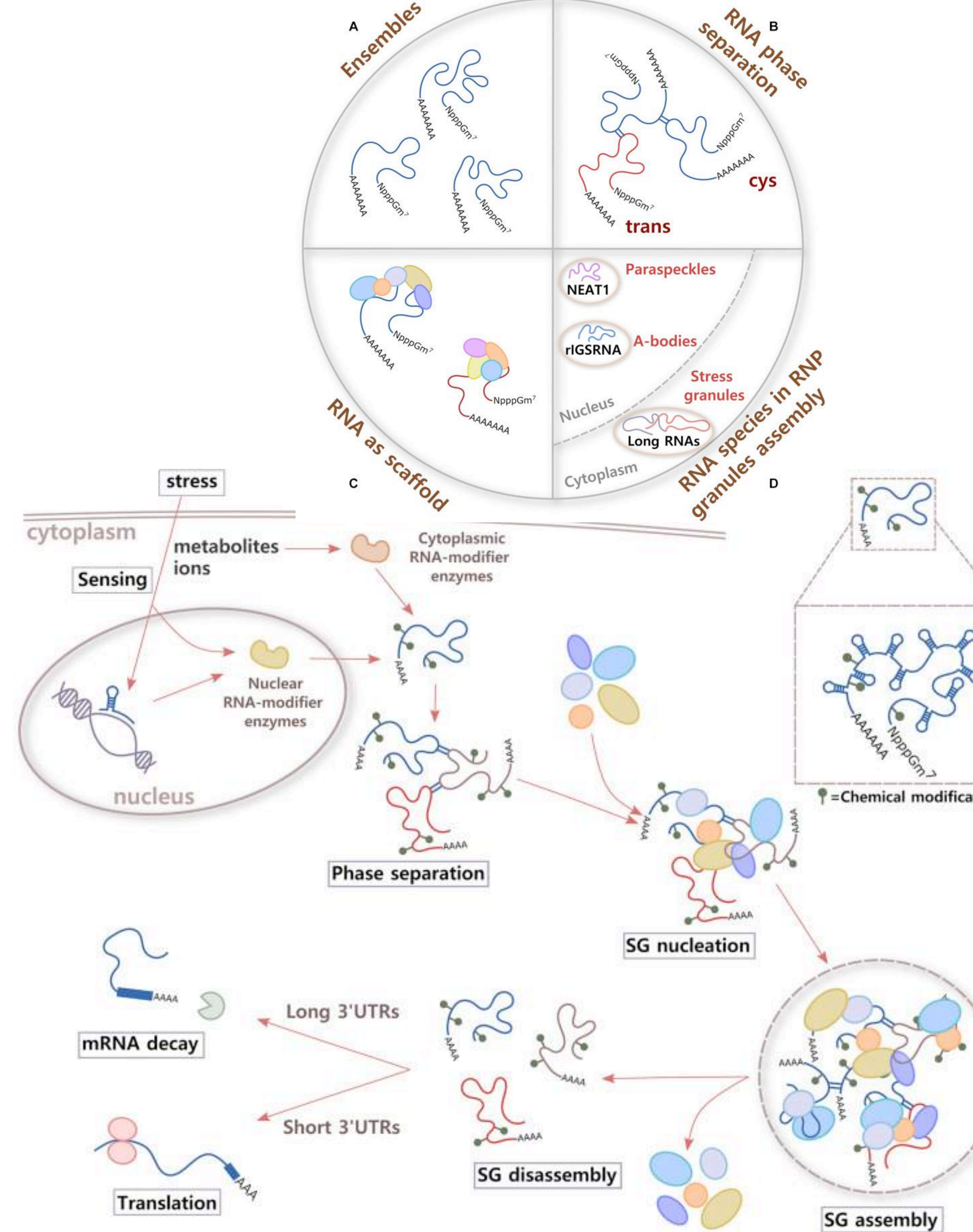
Nature Reviews | Cancer

Silvera, D., Formenti, S. & Schneider, R. Translational control in cancer. *Nat Rev Cancer* **10**, 254–266 (2010). <https://doi.org/10.1038/nrc2824>

# Stress Granules (SGs)

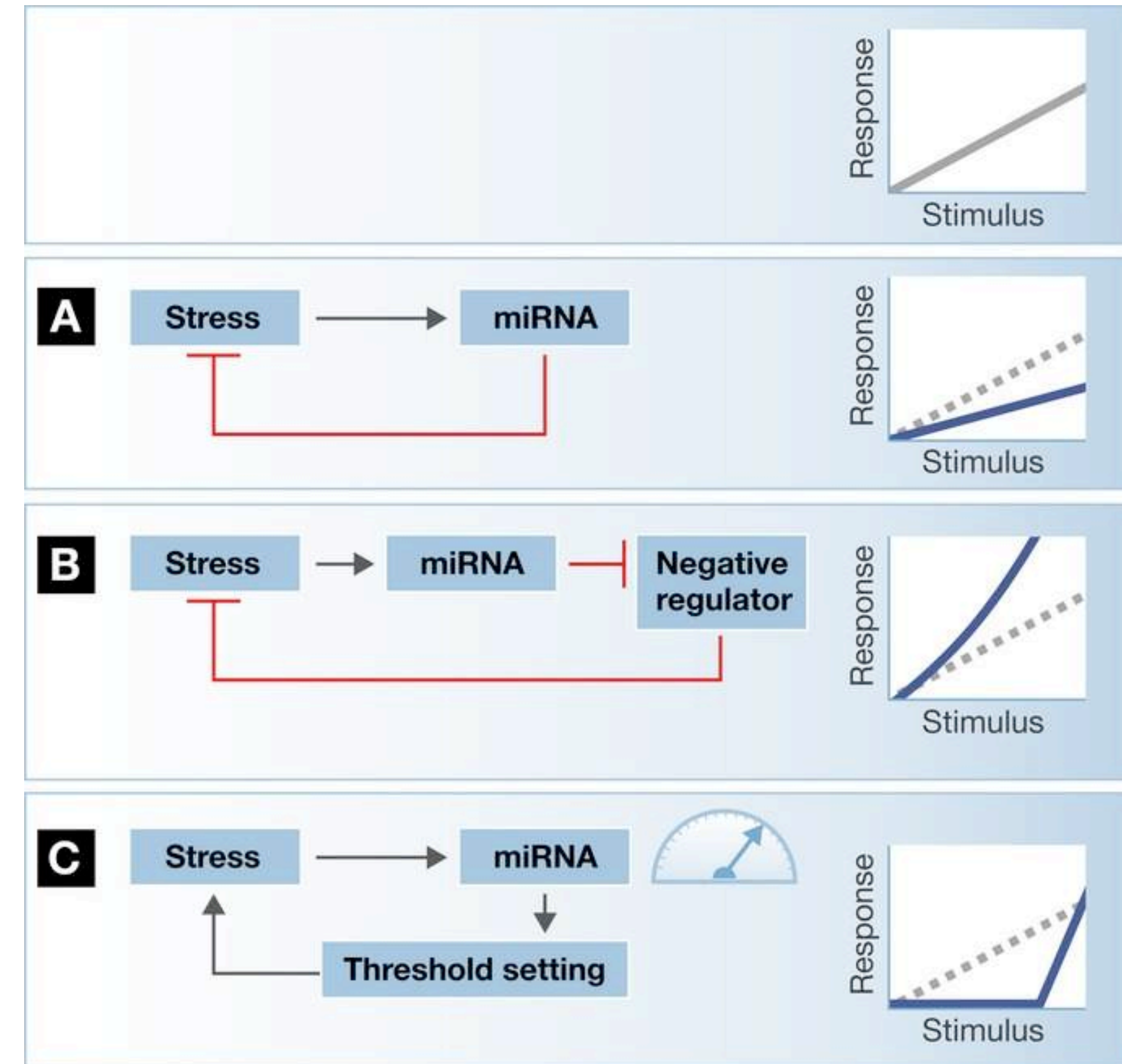
- the role of SGs in regulating genes not only involved in stress-specific needs but as well as compartmental needs (i.e., the axon of a neuron) during periods of stress.
- Canonical SGs tend to contain pro-apoptotic factors to suppress their function and prevent apoptosis, while non-canonical SGs lack these apoptotic factors indicating that programmed death may be activated in these cells
- The formation of either canonical or non-canonical SGs can depend on both the length and type of stress.
- This knowledge of the breadth of SG protein composition has allowed researchers to characterize a major difference between SG subtypes based on differences in stress, stress duration, and canonical versus non-canonical. However, understanding that the majority of SG composition is RNA has opened up new avenues in understanding the genesis of these SG subtypes.

Campos-Melo D, Hawley ZCE, Droppelmann CA, Strong MJ. The Integral Role of RNA in Stress Granule Formation and Function. *Front Cell Dev Biol.* 2021 May 20;9:621779. doi: 10.3389/fcell.2021.621779. PMID: 34095105; PMCID: PMC8173143.



# Potential network architecture for miRNA influence on stress signals

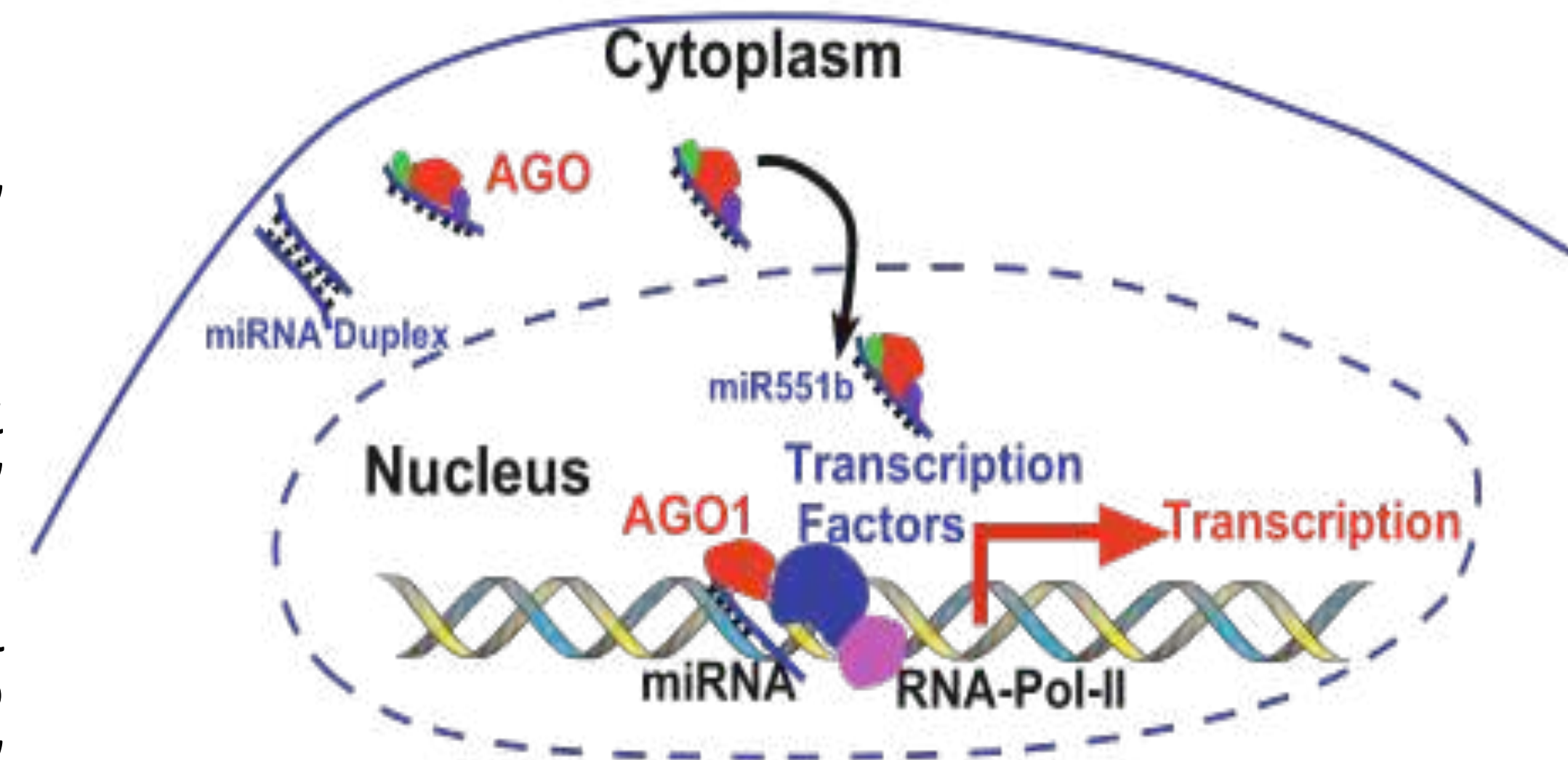
- The cellular response to stressful stimuli is modulated by miRNAs. (A) A miRNA may be wired in a negative-feedback loop, inhibiting the expression of a target that is involved in stress signaling. In this case, miRNA activity dampens the cellular stress cascade activity. (B) However, a miRNA may contribute to pathway activation via the inhibition of negative regulators, as part of a positive-feedback loop. (C) The relative levels of miRNAs and their cognate target mRNAs determine how much target protein is effectively produced. Therefore, if the miRNA is in excess, there is effective silencing of the target, which activates the stress cascade with defined threshold. However, either a continuous stress stimulus or a dynamic change in the levels of the miRNA may enable adaptation or sensitization of the cellular stress response. See also reviews by Mendell & Olson (2012) and Leung & Sharp (2007, 2010).



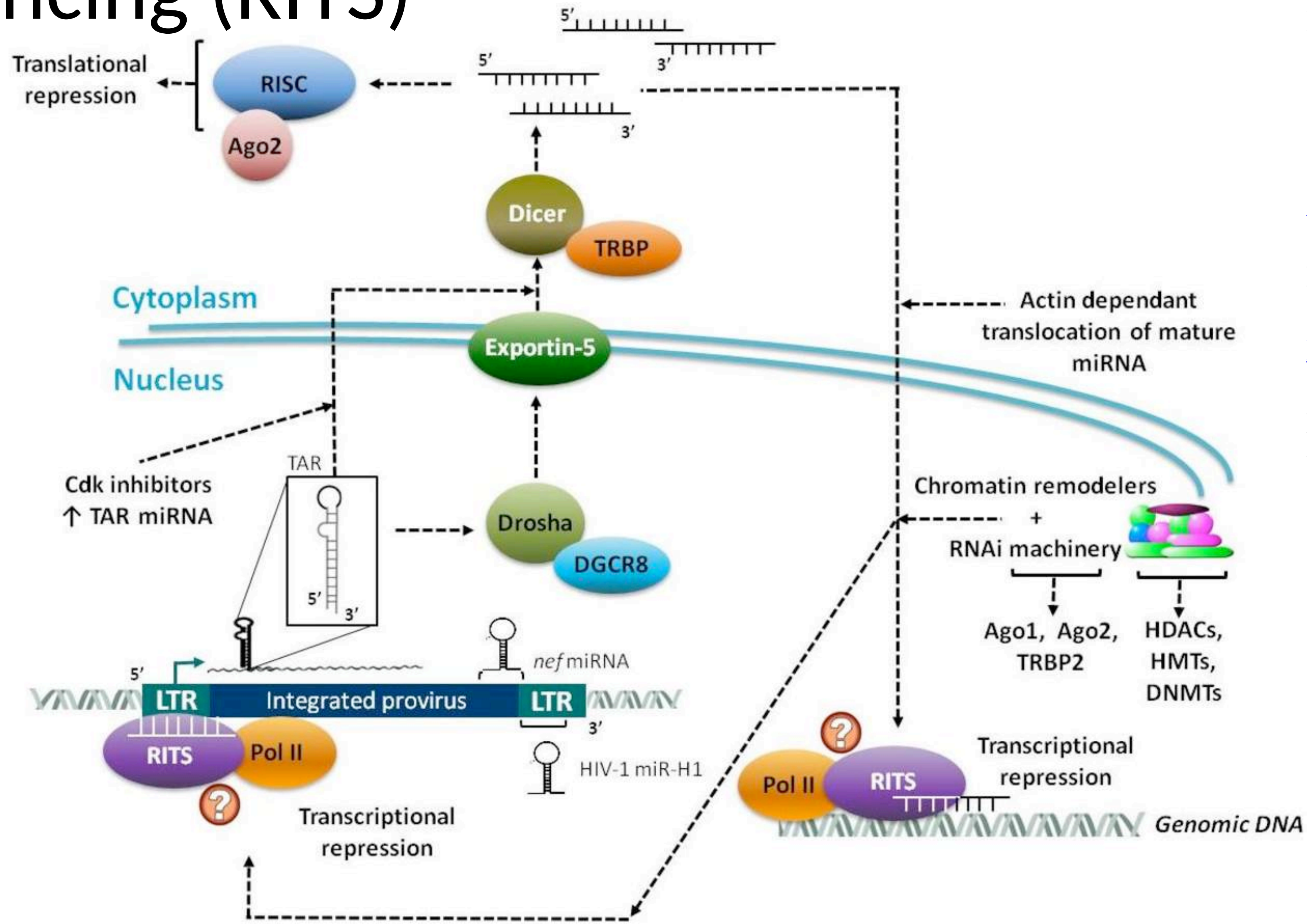


# ΜικροRNA-διαμεσολαβούμενη ενεργοποίηση της μεταγραφής

- Τα miRNAs μπορούν να προσδένουν σε περιοχές γύρω από τη θέση έναρξης της μεταγραφής (TSSs) ή 200-1200 βάσεις ανοδικά της TSS και να ενεργοποιήσουν τη γονιδιακή έκφραση.
- Το φαινόμενο αυτό, ονομάζεται ενεργοποίηση RNA (RNA activation, RNAa) και περιγράφει τη στρατολόγηση μεταγραφικών παραγόντων και RNA-πολυμεράσης II στους υποκινητές ύστερα από άμεση πρόσδεση στην περιοχή ενός miRNAs για την ενεργοποίηση της
- Εφόσον οι κύρια διαδικασία ωρίμανσης των miRNA λαμβάνει χώρα στο κυτταρόπλασμα, τα miRNAs χρειάζεται να μετατοπιστούν στον πυρήνα για τη διαδικασία του RNAa.
- Για τη μετατόπιση από το κυτταρόπλασμα στον πυρήνα χρειάζονται οι πρωτεΐνες AGO proteins και μια οικογένεια πρωτεϊνών με το όνομα καρυοφερίνες (karyopherin) με προεξέχοντα ρόλο την ιμπορτίνη (importin8, IPO8).
- Παράδειγμα: το miR551b-3p προσδένει σε αλληλουχίες στόχους στον υποκινητή του γονιδίου STAT3 και ενεργοποιεί τη μεταγραφή του STAT3.



# RNA-induced initiation of transcriptional silencing (RITS)



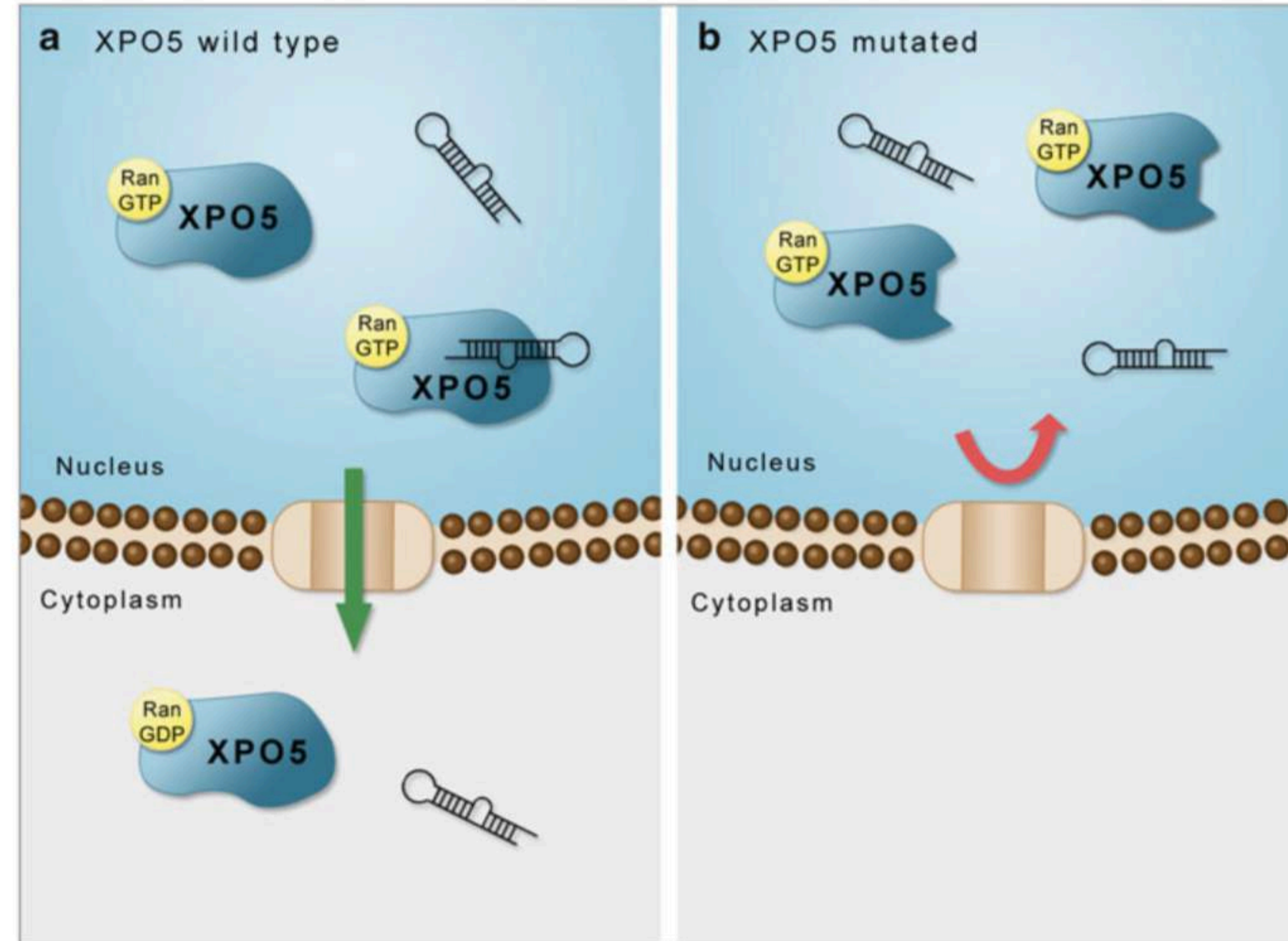
In a recent report, Moazed, Grewal, and colleagues ([Verdel et al., 2004](#)) characterize the RITS (RNA-induced initiation of transcriptional silencing) [protein complex](#) in [fission yeast](#). They provide a sought-for link between the small RNA produced by the RNA interference machinery and [heterochromatin](#) components, suggesting a mechanism for how heterochromatin formation can be targeted *in trans* to specific chromosomal regions.

# Τρόποι Μεταβολής Έκφρασης miRNAs

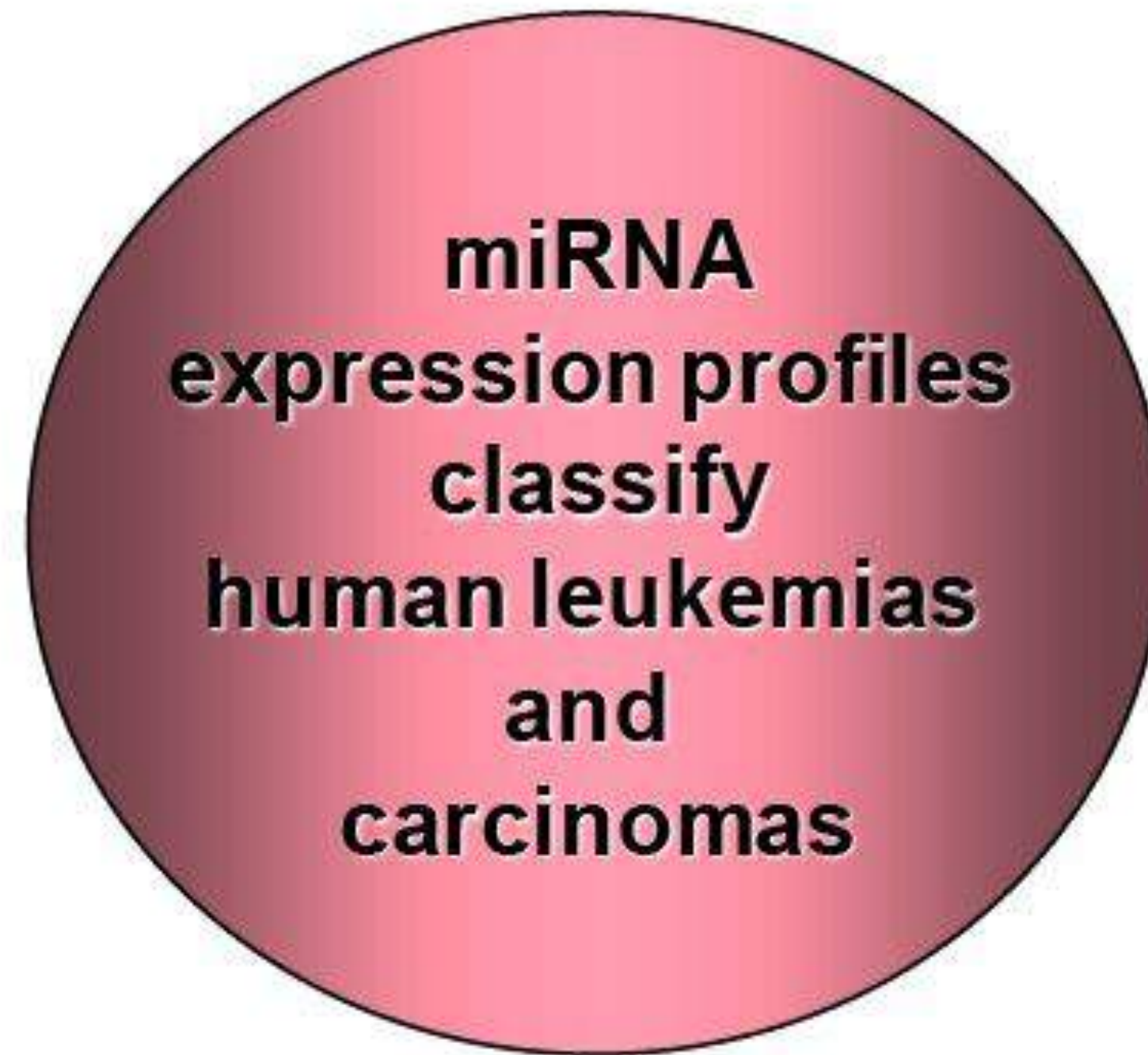
- Γενετικές τροποποιήσεις- γονιδιωματικές ενισχύσεις ή απαλοιφές, χρωμοσωμικές αναδιατάξεις ή μεταλλάξεις επιδρούν στα επίπεδα έκφρασης των miRNAs όπως και τα πρωτεϊνικά γονίδια.
- Ελαττώματα στο μηχανισμό βιογένεσης των miRNAs – Μεταπτώσεις στην έκφραση γονιδίων γ παρουσία μεταλλάξεων σε γονίδια που ενέχονται στη βιογένεση των miRNAs οδηγούν σε γενικευμένη αποσταθεροποίηση των επιπέδων miRNAs.
- Τροποποίηση του RNA (RNA editing). Το RNA editing είναι εάν κυτταρικός μηχανισμός με τον οποίο συγκεκριμένες αλληλουχίες μέσα σε ένα μετάγραφο RNA υπόκειται σε διάφορες τροποποιήσεις. Στα ζώα, η τροποποίηση A-σε-I (A-to-I editing) είναι η πιο συνηθισμένη και περιλαμβάνει υδρολυτική απαμίνωση αδενίνης σε ινοσίνη που διαμεσολαβείται από αποαμινάσες ινοσίνης που δρουν στο RNA (ADARs)
- Επιγενετικές τροποποιήσεις. Περίπου τα μισά γονίδια miRNAs βρίσκονται σε νησίδες CpG και επομένως είναι πιθανόν να επηρεάζονται από μεθυλίωση του DNA.
- Μεταπτώσεις των επιπέδων έκφρασης ή της ικανότητας πρόσδεσης μεταγραφικών παραγόντων που προσδένουν σε υποκινητές γονιδίων miRNAs. Εξωγενή και ενδογενή ερεθίσματα μπορούν να επηρεάσουν την πρόσδεση μεταγραφικών παραγόντων.

# Αναστολή της βιογένεσης των miRNA στον καρκίνο στο βήμα της exportin-5.

(a) Σε φυσιολογικές συνθήκες ο σχηματισμός του ετεροτετραμερούς συμπλόκου XPO5/Ran/GTP/pre-miRNA προκαλεί την εξαγωγή του pre-miRNA από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα για την περαιτέρω επεξεργασία του. (b) Στο καρκίνο, σημειακές μεταλλάξεις στο γονίδιο XPO5 προκαλούν σε μια κομμένη μορφή της πρωτεΐνης XPO5 η οποία δεν αναγνωρίζει/προσδένει το πρόδρομο μόριο pre-miRNA και επομένως αποτρέπει το σχηματισμό λειτουργικού συμπλόκου XPO5/Ran/GTP/pre-miRNA και αναστέλει τη μετατόπισή του από το πυρήνα στο κυτταρόπλασμα.



***ALTERATIONS OF MICRORNAS ARE FOUND IN EVERY  
TYPE OF HUMAN CANCER***



(Calin et al, PNAS 2002; Lu et al, Nature, 2005; Volinia & Calin et al, PNAS 2006; Landgraf et al, Cell 2007)

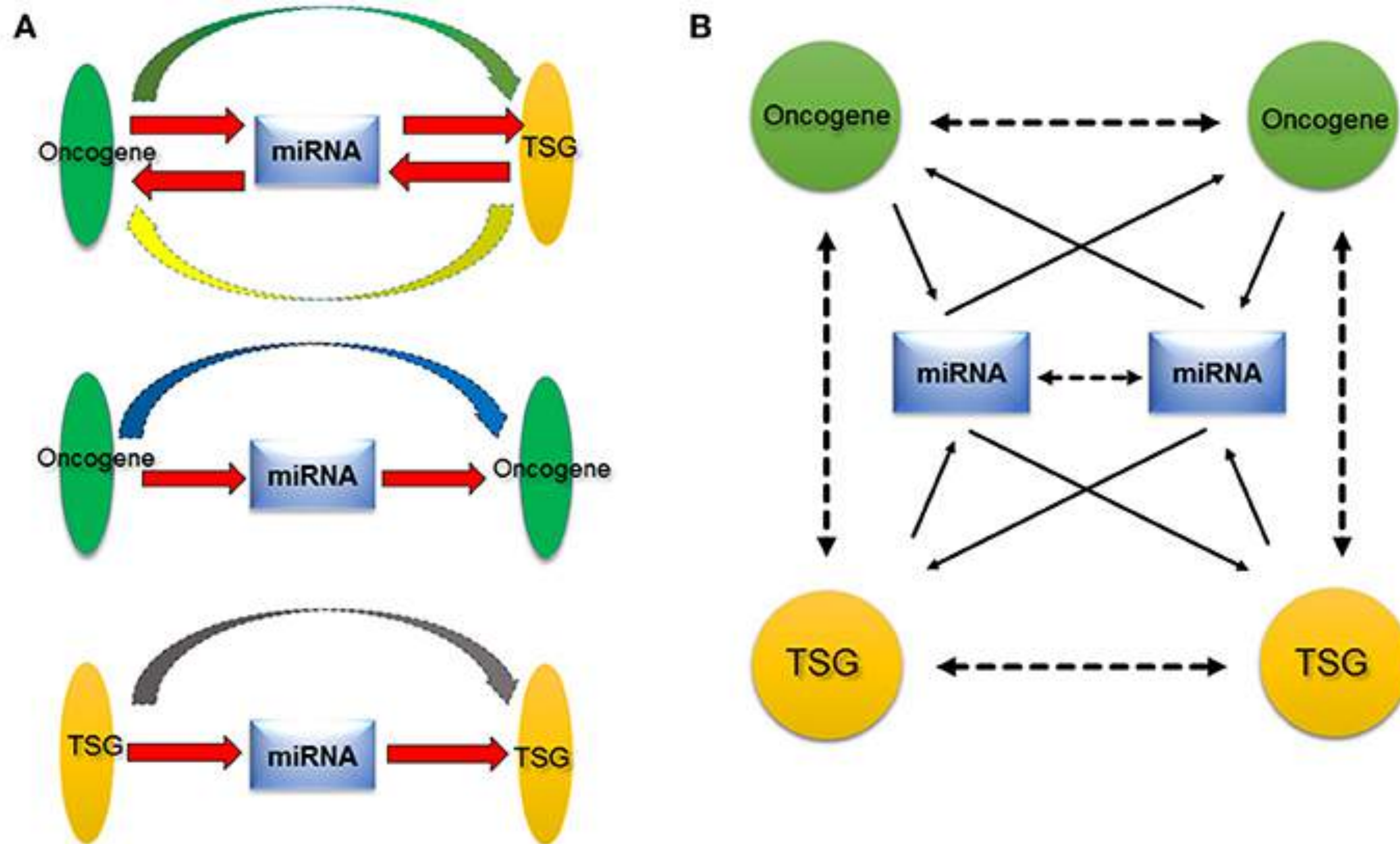
© George Calin

# miRNAs and Cancer – A Summary

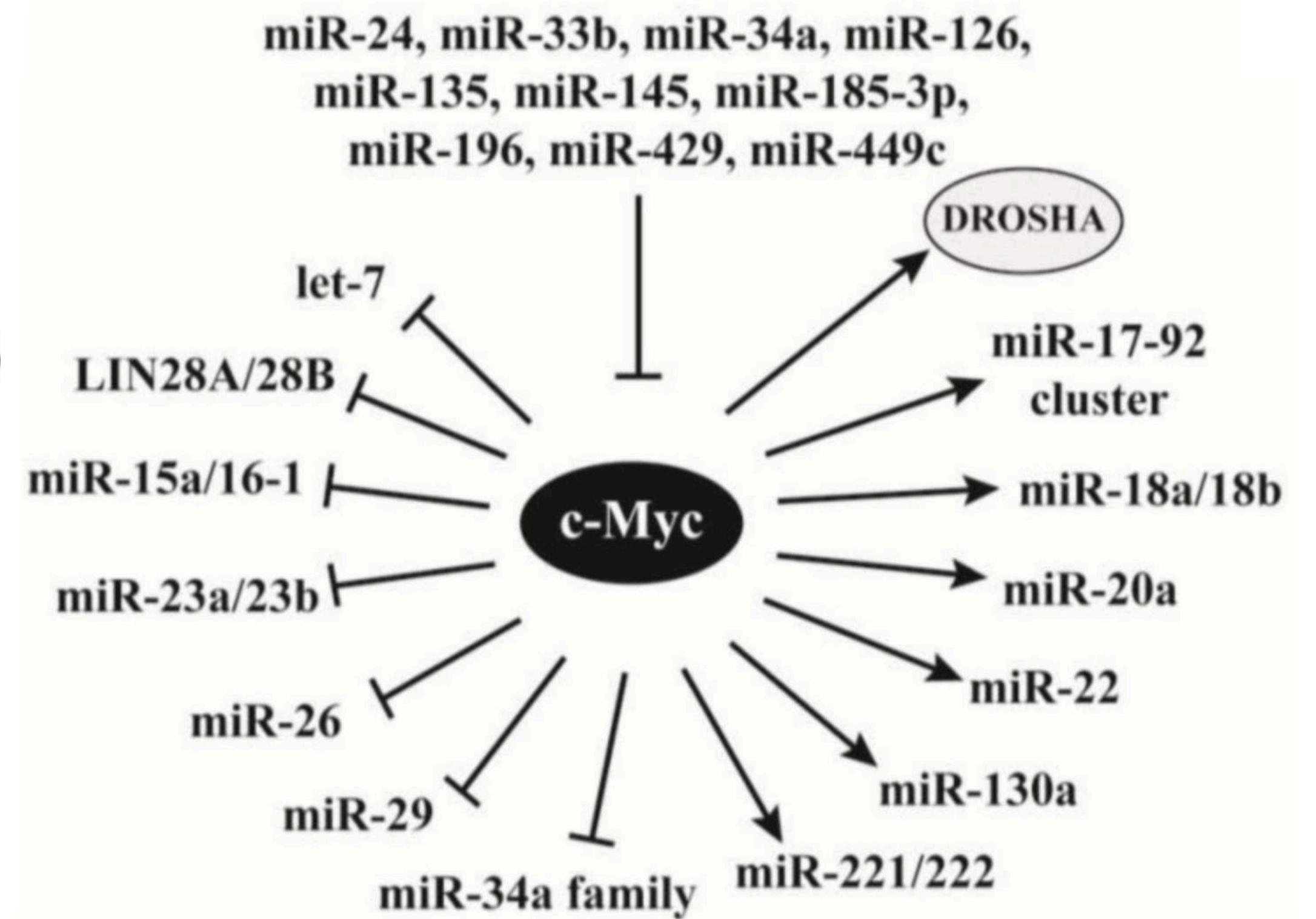
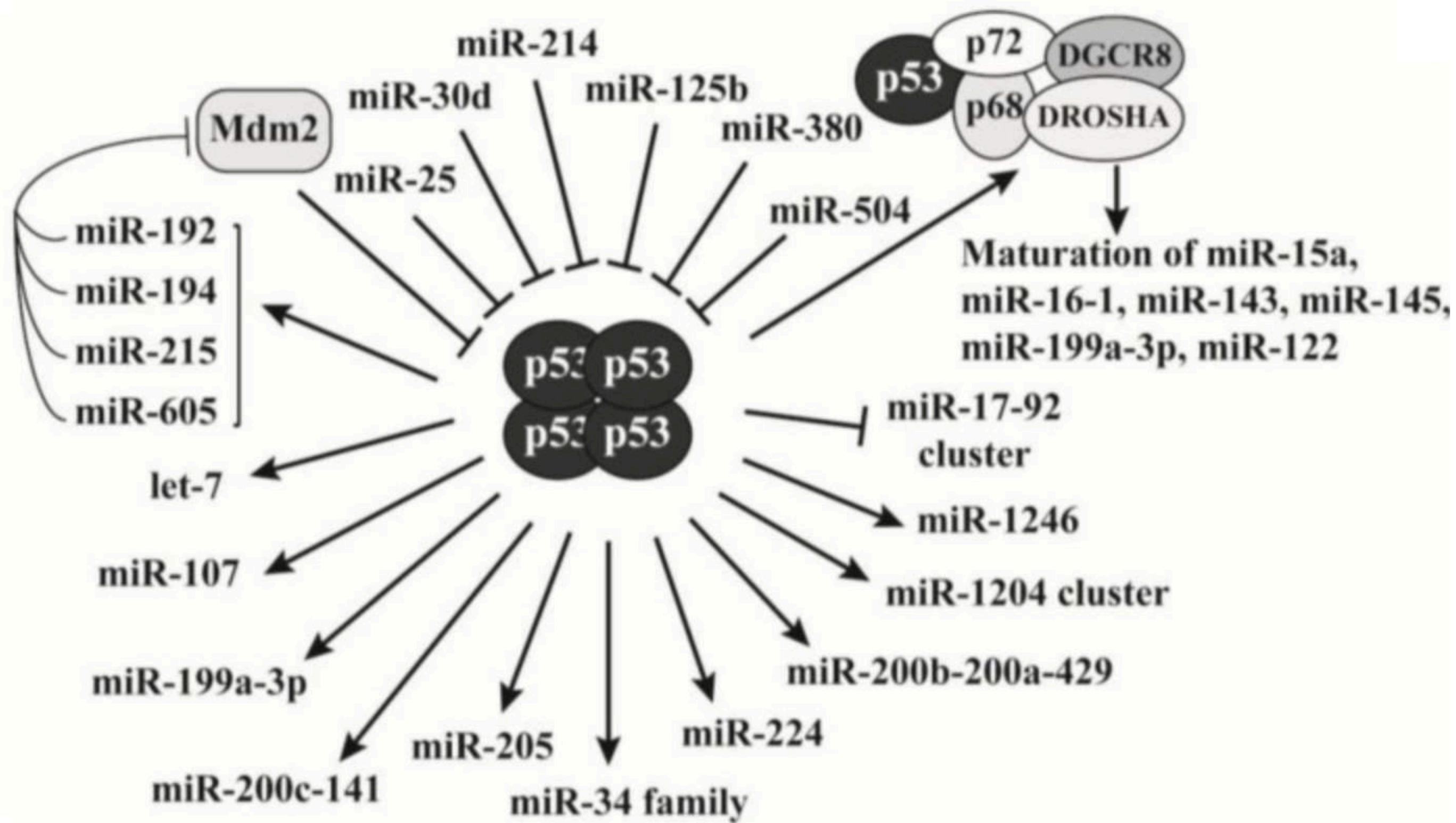
---

- miRNAs control cell cycle, cell differentiation and apoptosis by regulating oncogenes and tumor suppressor genes
- •miRNAs are misexpressed in cancer and are therefore excellent diagnostic / prognostic markers in cancer
- •Some miRNAs e.g. *mir-155*, can cause cancer and oncogenic miRNAs may be therapeutic targets in cancer
- •Other miRNAs like *let-7*, may prevent cancer and may be therapeutic molecules themselves.
- •MicroRNAs could augment current cancer therapies.

# Τα miRNAs ως ογκογονίδια (oncogenes) και γονίδια ογκο-καταστολείς (Tumor-suppressor Gene, TSGs)



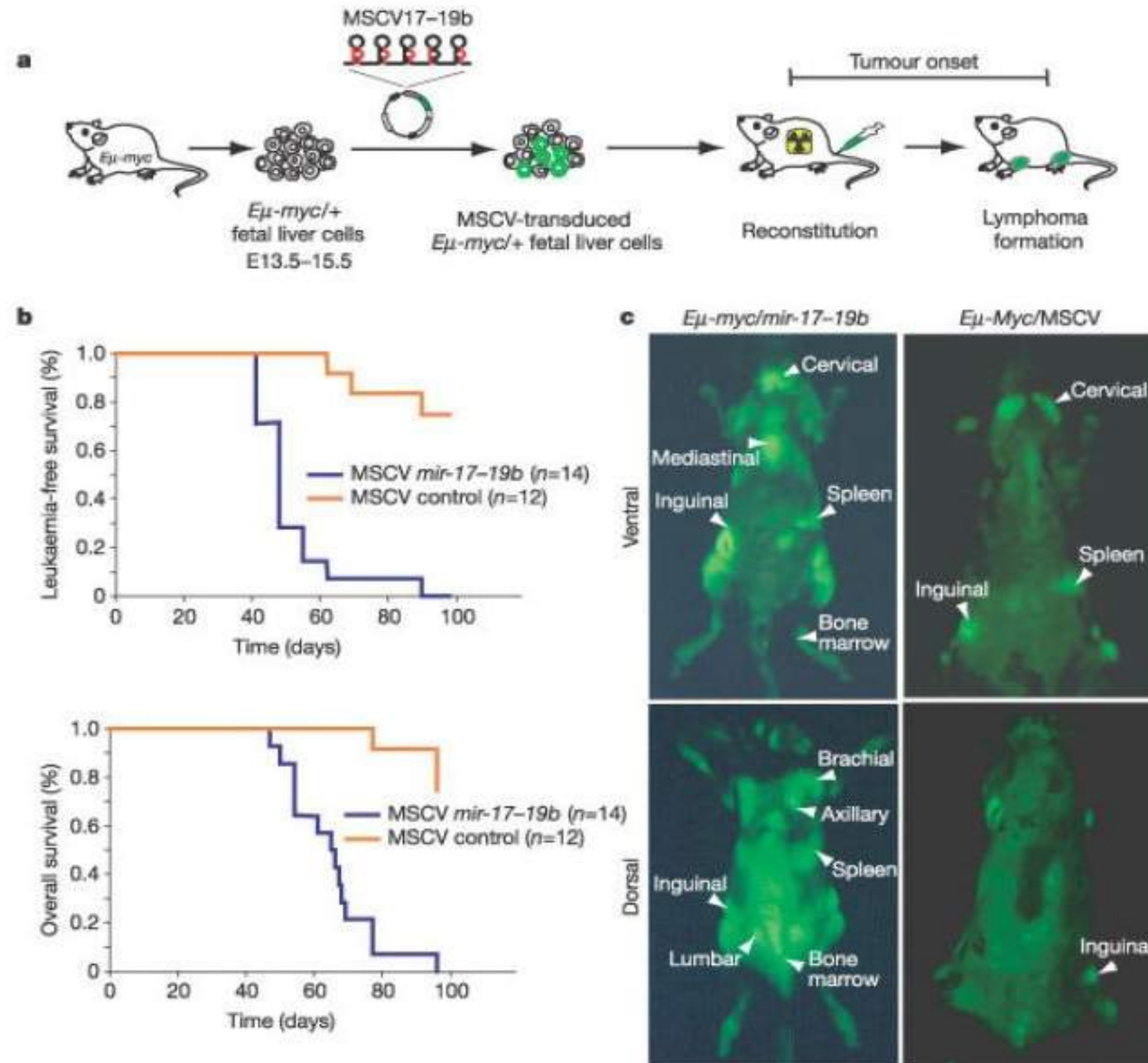
# Αλληλεπίδραση των MiRNAs με ογκογονίδια και γονίδια ογκοκαταστολείς



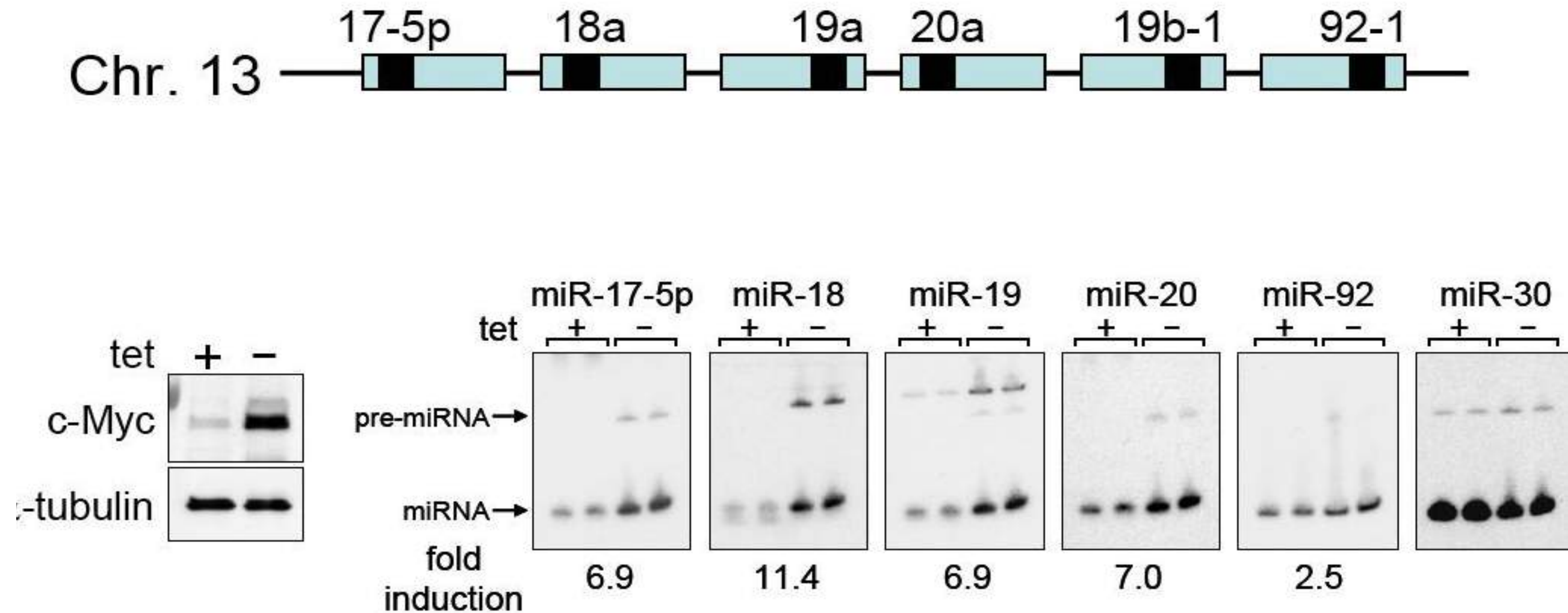




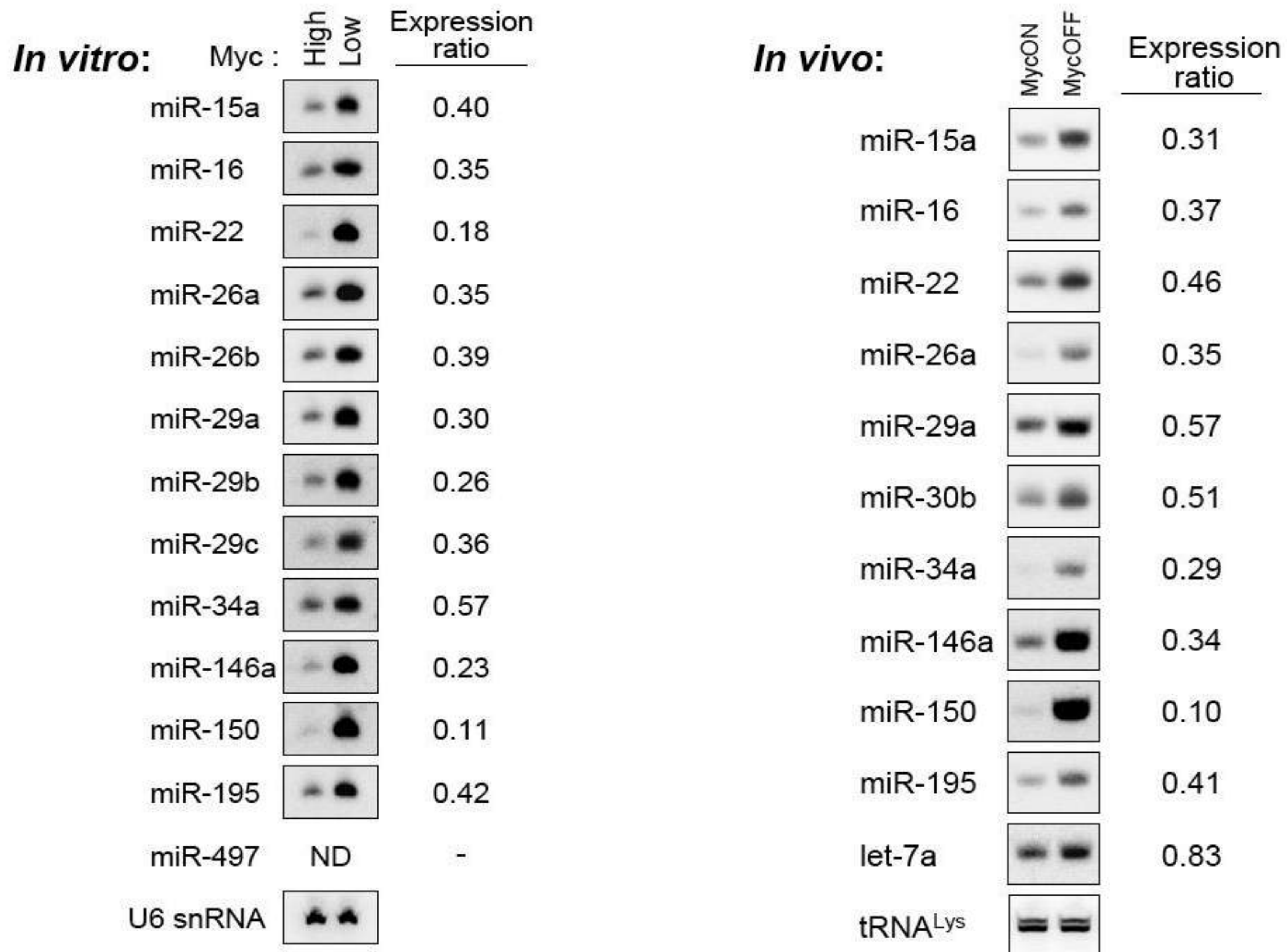
# The miR-17-92 cluster accelerates Myc-induced lymphomagenesis

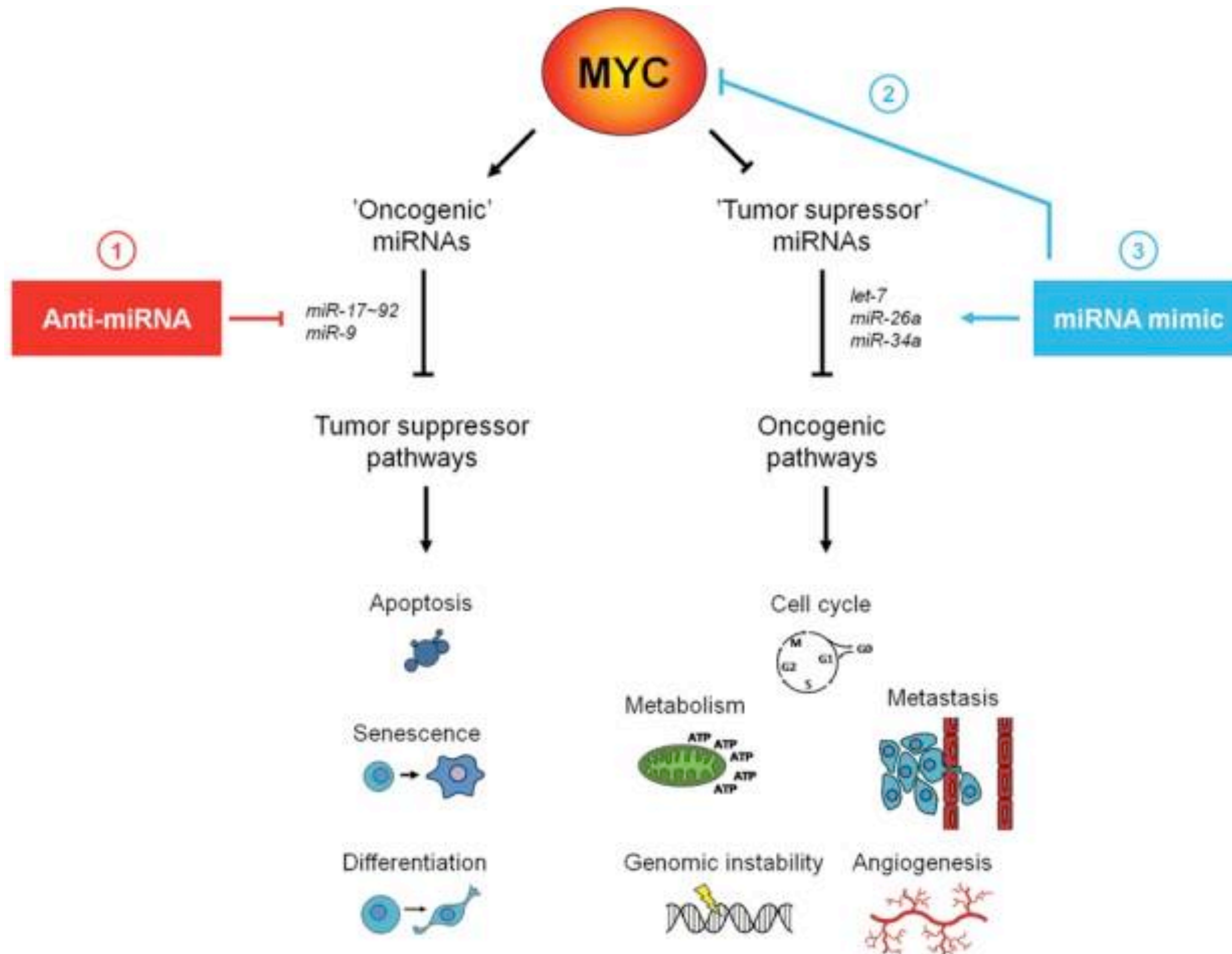


# The miR-17-92 cluster is activated by Myc

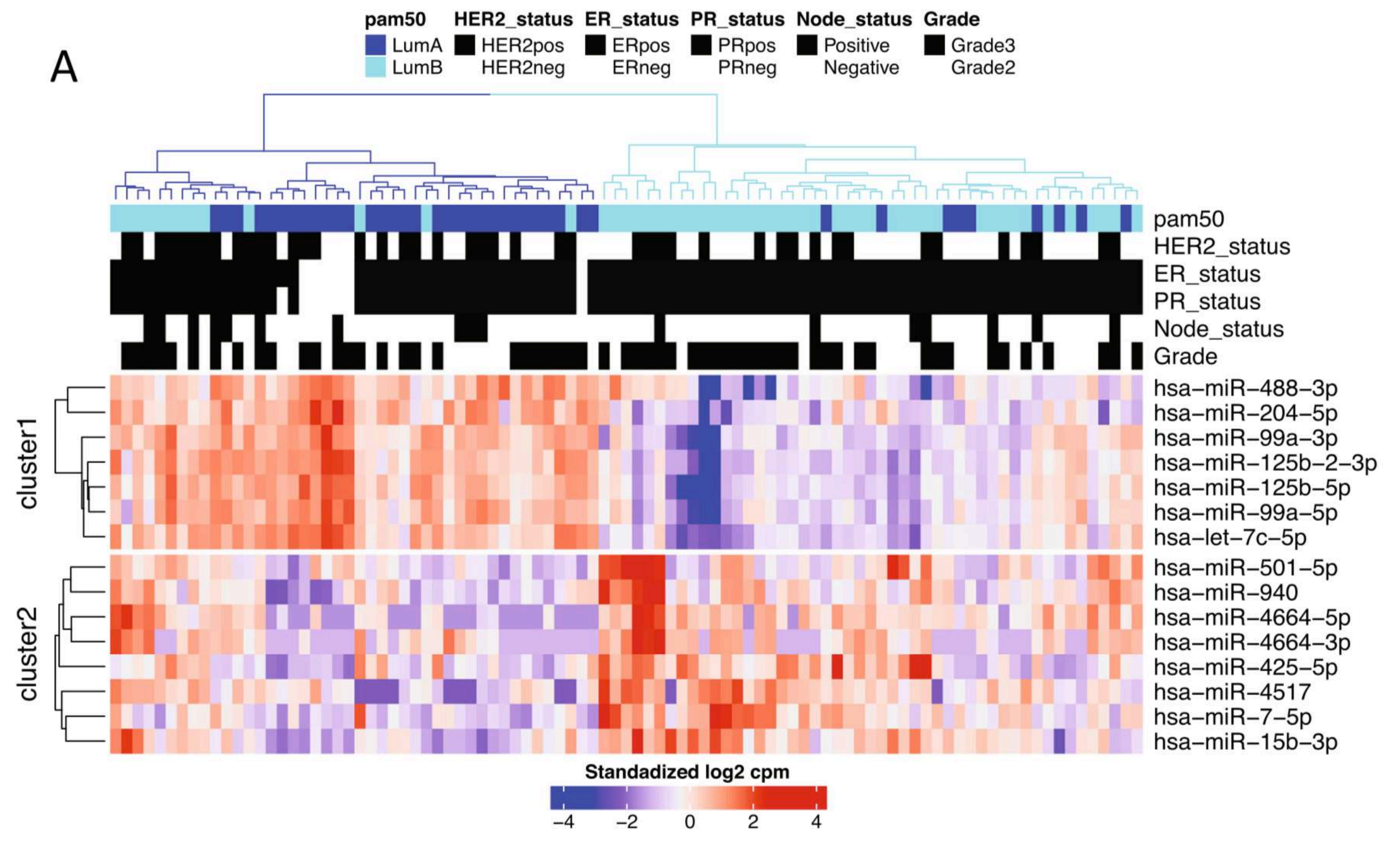
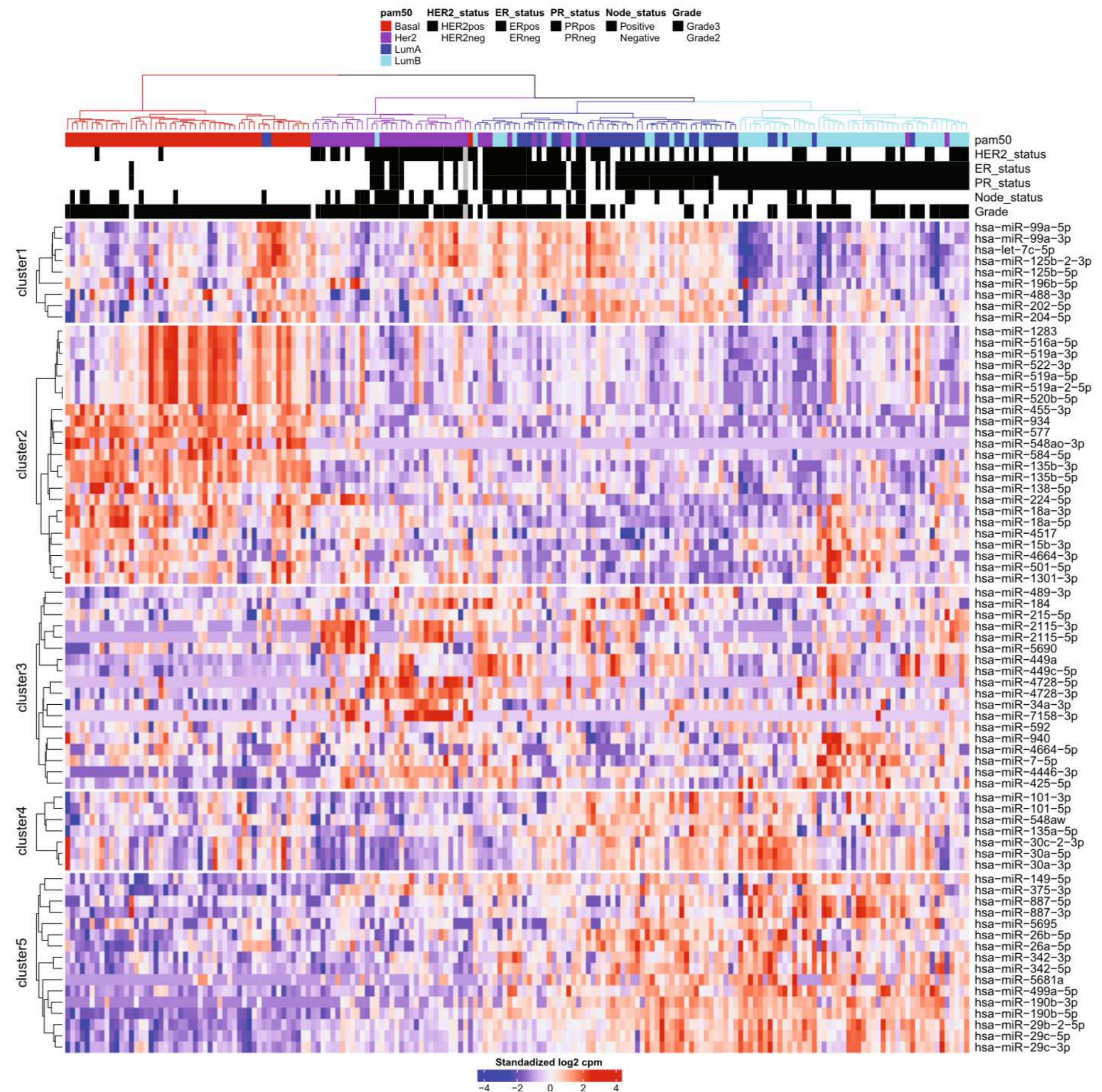


# Myc represses the expression of many miRNAs





# miRNAs είναι πιο ειδικοί και ευαίσθητοι βιοδείκτες κατηγοριοποίησης υπο-τύπων καρκίνου

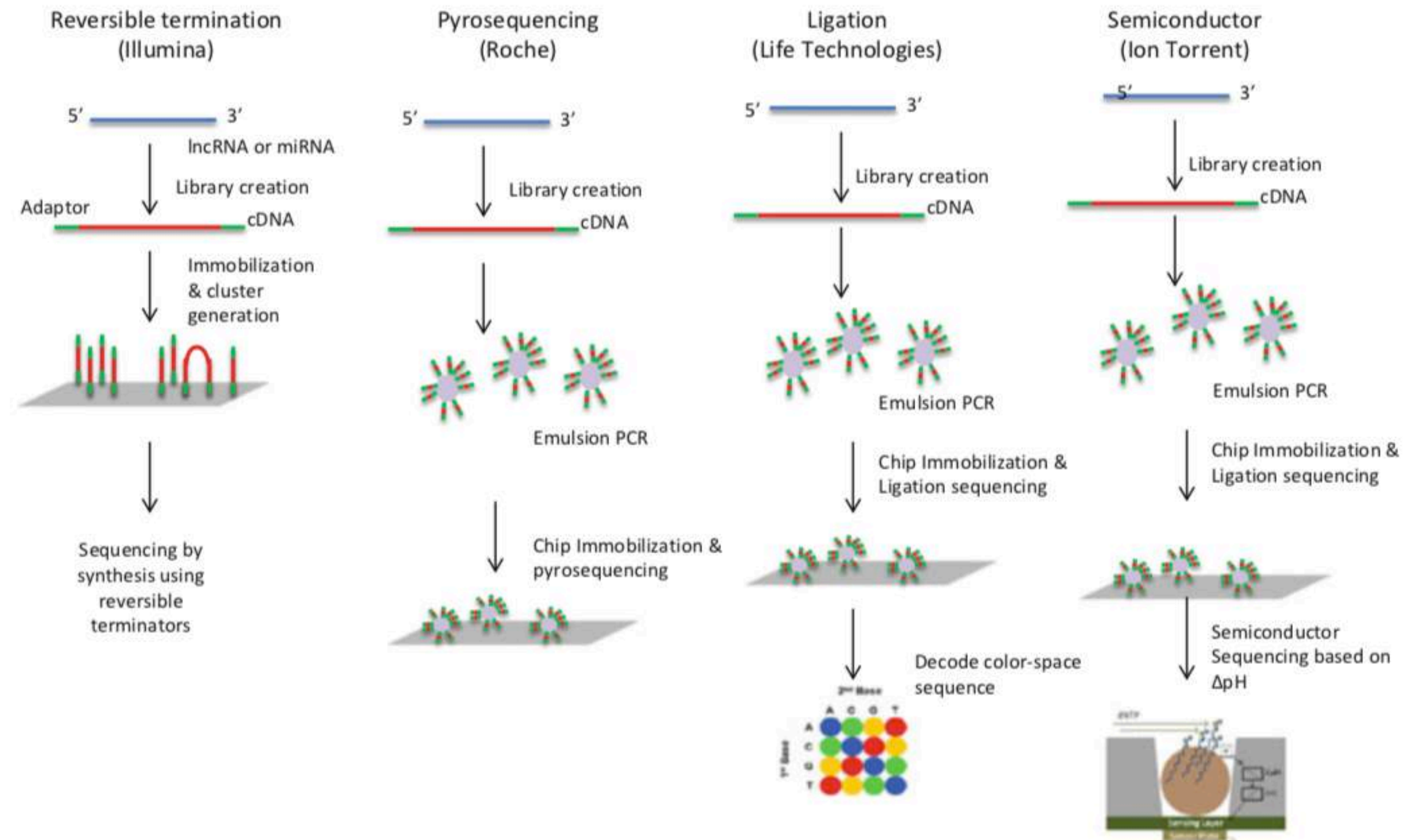


# Μέθοδοι αναγνώρισης των miRNAs

- Δημιουργία βιβλιοθηκών από μικρά RNA
  - Απομόνωση μικρών RNA σε πηκτώματα πολυακρυλαμίδης
  - Δημιουργία βιβλιοθήκης cDNA (τυχαίοι εκκινητές)
  - Αλληλούχιση επόμενης γενιάς (μεγάλης κλίμακας)
- Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
  - + Ανακάλυψη νέων miRNAs
  - - Τεχνικά ίσως δύσκολη για κάποιον μη ειδικό και ίσως ακριβή για ένα μικρό εργαστήριο Technically challenging and expensive procedure
  - -Ένα μέρος του πληθυσμού των μικρών RNAs είναι προϊόντα αποικοδόμησης

# Small RNA sequencing

Illustration of the four most common deep sequencing technologies all starting with library creation, followed by some form of clonal amplification, and lastly a variety of approaches to sequencing



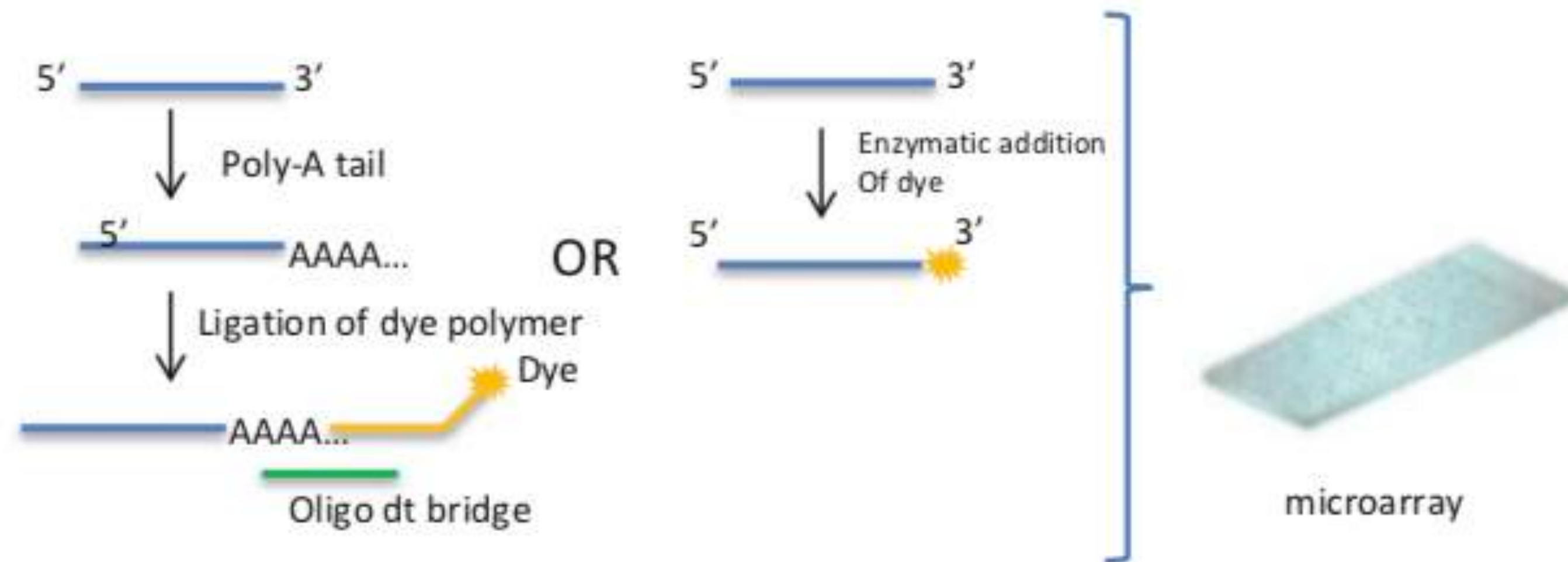


# Μέθοδοι αναγνώρισης των miRNAs II

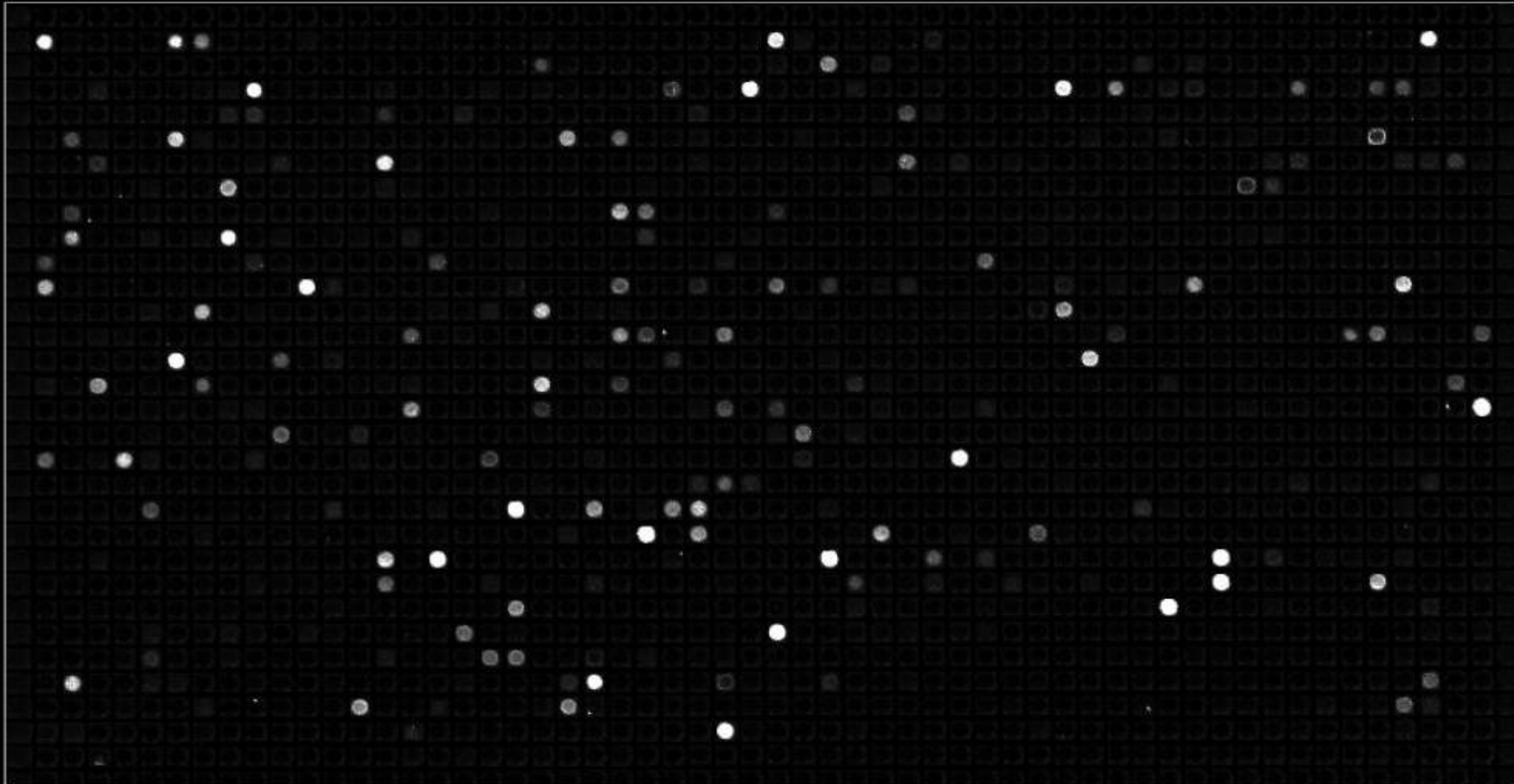
- Μέθοδοι βασισμένες στην υβριδοποίηση
  - Μικρο-συστοιχίες για miRNAs είναι εμπορικά διαθέσιμες
- Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
  - +Οι υπάρχουσες τεχνολογίες μειώνουν τη διακύμανση στην  $T_m$  και αυξάνουν της ειδικότητα των δεικτών
  - + Δεν απαιτεί εμπλουτισμό των μικρών RNAs
  - - Περιορισμός στα γνωστά miRNAs

# miRNA Microarrays

- Οι μέθοδοι που βασίζονται σε υβριδοποίηση για την άμεση ανίχνευση των microRNA είναι αρκετά ευαίσθητες ώστε να επιτρέψουν τη σήμανση των miRNA χωρίς ενίσχυση και την μετέπειτα υβριδοποίηση σε συμπληρωματικούς δείκτες σε μικροσυτοιχίες. probes on array

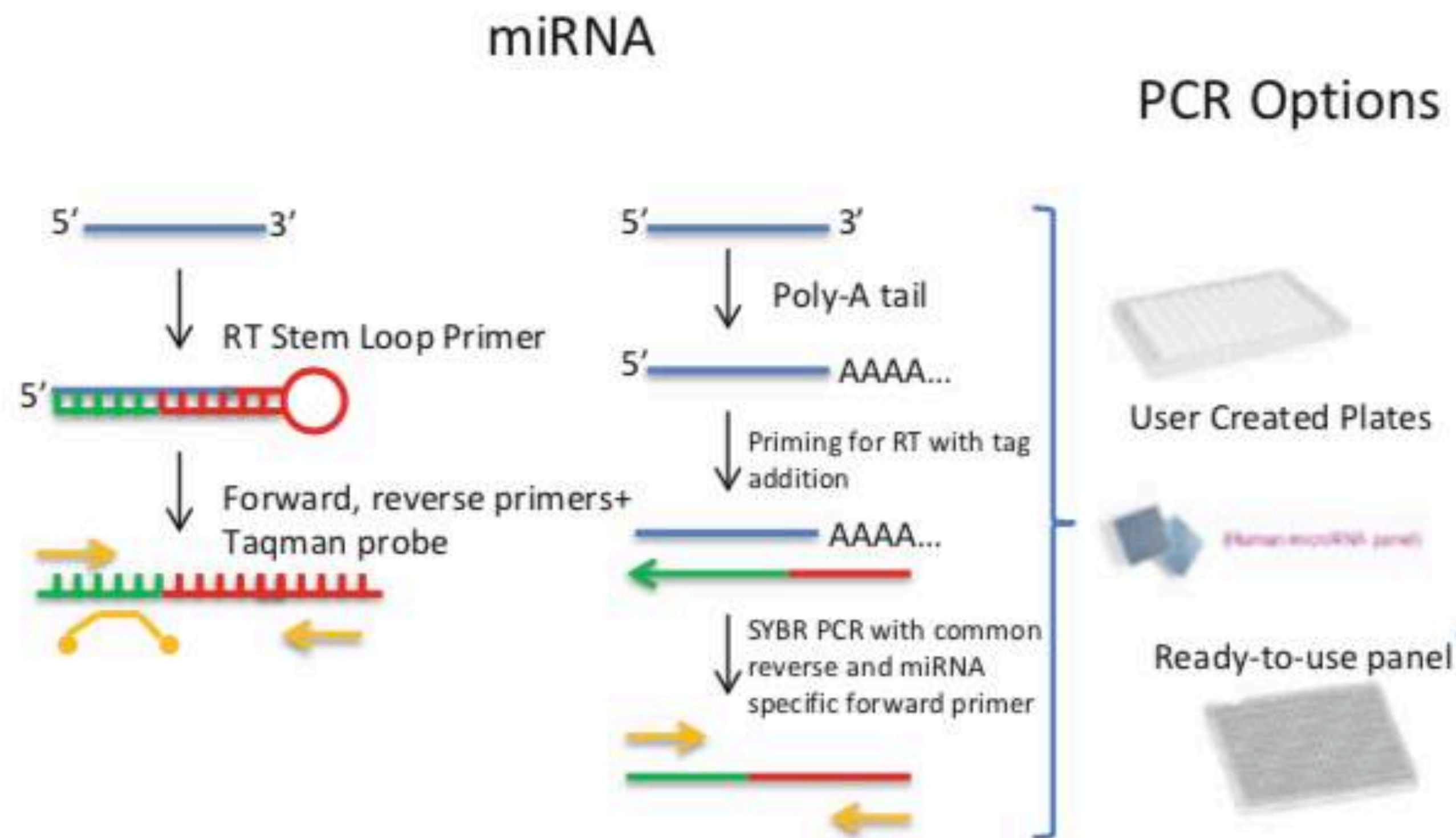


# Profiling miRNA expression using custom microarrays



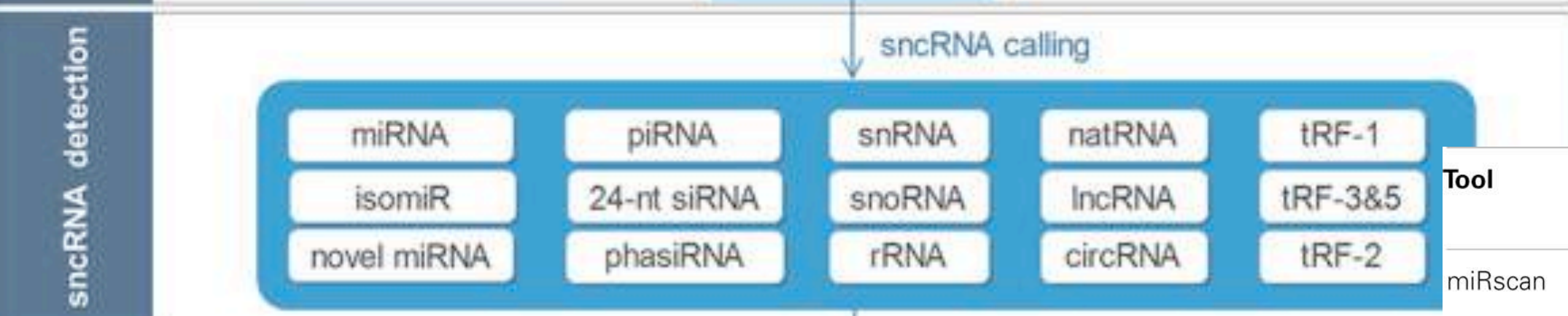
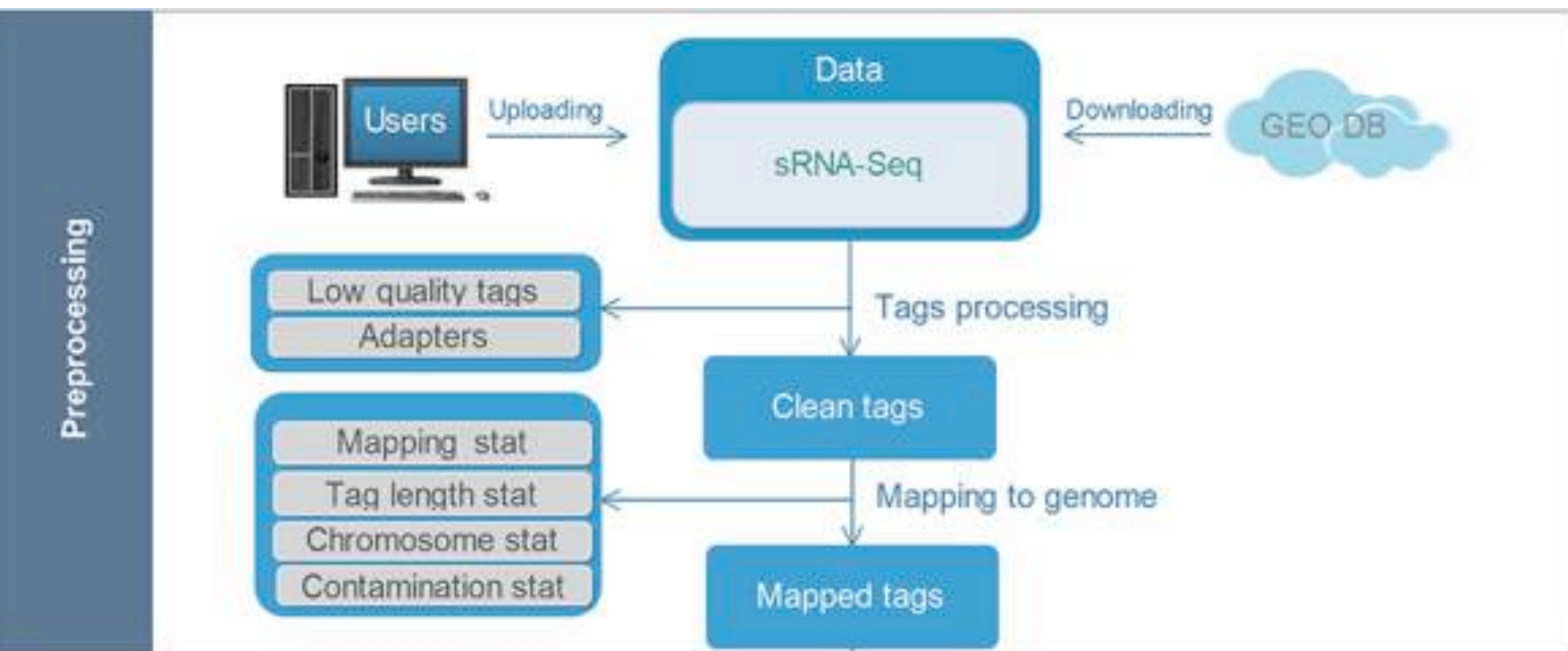
# miRNA RT-qPCR

- Οι μέθοδοι qRT-PCR για την ανίχνευση microRNA περιλαμβάνουν δοκιμές με TaqMan qRT-PCR και SYBR green. Οι δοκιμές TaqMan microRNA βασίζονται σε ένα εκκινήτη-φουρκέτα ειδικό για ένα μοναδικό miRNA και στη συνέχεια σε μια συνιθισμένη PCR. Η δοκιμή με SYBR περιλαμβάνει την προσθήκη μιας ουράς poly-A tail ή κάποια άλλης σήμανσης ώστε να μεγαλώσει το μήκος της αλληλουχίας τους ώριμου miRNAs ώστε να επιτρέψει την πρόσδεση του ειδικού εκκινήτη για αυτό το miRNA.



# Μέθοδοι αναγνώρισης των miRNAs III

- Υπολογιστική αναγνώριση γονιδίων miRNA
  - Χρησιμοποιούν ομολογία για την εύρεση miRNAs σε άλλα είδη
  - Αναγνώριση συντηρημένων μοτίβων στα 3'UTRs
  - Ξεχωριστά συντηρημένα πρότυπα
- Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
  - +Γρήγορη αλλά «βρώμικη» εύρεση καλή για προκαταρτικές μελέτες
  - -Απαιτεί εκτεταμένη πειραματική επικαιροποίηση
  - -Βασισμένες σε θεωρήματα συμπληρωματικότητας



Tool	Website	Year	Conservation	Structure	Sequence	Machine learning	NGS <sup>a</sup> application	Sensitivity (%)	Specificity (%)
miRscan	genes.mit.edu/mirscan	2003	X	X				74	40
miRSeeker	-	2003	X	X				75	
miRAlign	bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/miralign	2005		X	X			90	98
Phylogenetic shadowing	-	2005	X					55	77
ProMiR	bi.snu.ac.kr/ProMiR	2005	X	X	X	X		73	96
Triplet-SVM	bioinfo.au.tsinghua.edu.cn/software/mirnasvm	2005		X	X	X		93	88
miR-abela	www.mirz.unibas.ch/cgi/pred_miRNA_genes.cgi	2005		X	X	X		71	91
RNAmicro	www.bioinf.uni-leipzig.de/~jana/index.php/jana-hertel-software/65-jana-hertel-rnamicro	2006		X	X	X		90	99
miRFinder	www.bioinformatics.org/mirfinder	2007	X	X		X		90	
miPred	www.bioinf.seu.edu.cn/miRNA	2007		X		X		84	98
MiRRim	www.ncrna.org/software/miRRim	2007	X	X		X		70	90
miRDeep	www.mdc-berlin.de/en/research/research_teams/systems_biology_of_gene_regulatory_elements/projects/miRDeep	2008		X			X	89	-
miRanalyzer	web.bioinformatics.cicbiogune.es/microRNA/miRanalyser.php	2009				X	X	98	
SSCprofiler	mirna.imbb.forth.gr/SSCprofiler.html	2009	X	X	X	X	X	89	84
HHMMiR	http://www.benoslab.pitt.edu/kadriAPBC2009.html	2009		X	X	X		84	88

<sup>a</sup>NGS: Next-Generation sequencing.

# ΜικροRNAs-περίληψη

- Υπάρχει ένας πολύ μεγάλος αριθμός από «εν δυνάμει» στόχους για κάθε miRNA, και η διαδικασία πιστοποίησης ενός εν δυνάμει στόχου στο εργαστήριο είναι χρονοβόρα και κοστοβόρα.
- Μια υπολογιστική προσέγγιση για την πρόβλεψη miRNA στόχων διευκολύνει στον περιορισμό των «εν δυνάμει» στόχων για πειραματική επαλήθευση.
- Οι υπολογιστικές προσεγγίσεις μοντελοποιούν τον τρόπο που τα miRNAs στοχεύουν συγκεκριμένα mRNAs και ένας αυξανόμενος αριθμός από υπολογιστικά εργαλεία υπάρχουν, το καθένα με μια λίγο διαφορετική προσέγγιση.

# Υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης στόχων miRNAs

Name of the software	URL or availability	Supported organism(s)	Reference(s)
TargetScan, TargetScanS	<a href="http://genes.mit.edu/targetscan/">http://genes.mit.edu/targetscan/</a>	Vertebrates	[Lewis 2003] and [Lewis 2005]
miRanda	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>	Flies, vertebrates	[Enright 2003] and [John 2004]
DIANA-microT	<a href="http://diana.pcbi.upenn.edu/DIANA-microT/">http://diana.pcbi.upenn.edu/DIANA-microT/</a>	Vertebrates	Kiriakidou <i>et al.</i> , 2004
RNAhybrid	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/rnahybrid/</a>	Flies	Rehmsmeier <i>et al.</i> , 2004
GUUGle	<a href="http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/guugle/">http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/guugle/</a>	Flies	Gerlach <i>et al.</i> , 2006
PicTar	<a href="http://pictar.bio.nyu.edu/">http://pictar.bio.nyu.edu/</a>	Nematodes, flies, vertebrates	[Grun 2005], [Krek 2005] and [Lall 2006]
MicroInspector	<a href="http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/">http://mirna.imbb.forth.gr/microinspector/</a>	Any	Rusinov <i>et al.</i> , 2005
MovingTargets	Available by request on DVD	Flies	Burgler <i>et al.</i> , 2005
FastCompare	<a href="http://tavazoielab.princeton.edu/mirnas/">http://tavazoielab.princeton.edu/mirnas/</a>	Nematodes, flies	Chan <i>et al.</i> , 2005
miRU	<a href="http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm">http://bioinfo3.noble.org/miRNA/miRU.htm</a>	Plants	Zhang 2005
TargetBoost	<a href="https://demo1.interagon.com/demo/">https://demo1.interagon.com/demo/</a>	Nematodes, flies	Saetrom <i>et al.</i> , 2006
rna22	<a href="http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html">http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html</a>	Nematodes, flies, vertebrates	Miranda <i>et al.</i> , 2006
miTarget	<a href="http://cbit.snu.ac.kr/">http://cbit.snu.ac.kr/</a> miTarget/	Any	Kim <i>et al.</i> , 2006

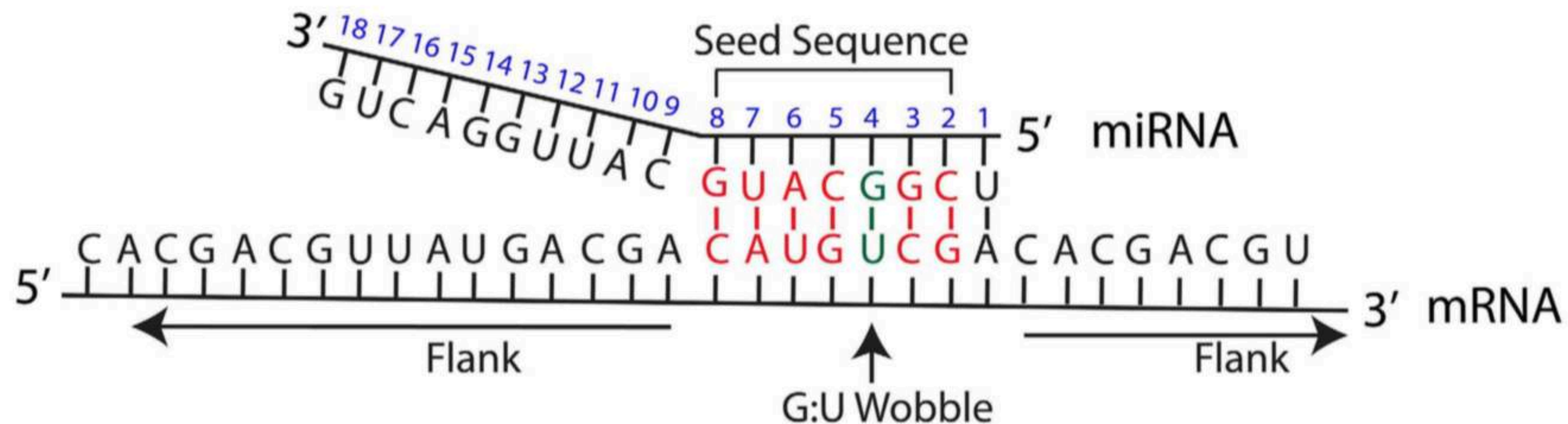


# Κοινά χαρακτηριστικά των εργαλείων αναγνώρισης στόχων miRNA

- «Πυρήνας» - SEED
- Συντήρηση - CONSERVATION
- Ελεύθερη Ενέργεια - FREE ENERGY
- Προσβασιμότητα θέσης-στόχου - SITE ACCESSIBILITY

# Ο κανόνας του πυρήνα – the seed “rule”

- Η πυρηνική αλληλουχία ενός miRNA ορίζεται ως τα πρώτα 2–8 νουκλεοτίδια ξεκινώντας το 5' άκρο και μετρώντας προς το 3' άκρο. Στα περισσότερα εργαλεία, ένα ταίριασμα στον πυρήνα είναι μέσω ζευγαρώματος Watson-Crick (WC) ανάμεσα σε ένα miRNA και του στόχου του στην πυρηνική αλληλουχία. Ένα ζευγάρι WC ανάμεσα σε ένα miRNA και ένα mRNA συμβαίνει όταν μια αδενοσίνη (A) ζευγαρώνει με μια ουρακίλη (U) και μία γουανίνη (G) ζευγαρώνει με μία κυτοσίνη (C). Ένα απόλυτο ζευγάρι δεν περιέχει κενά στην στοίχιση μέσα στο πυρήνα.

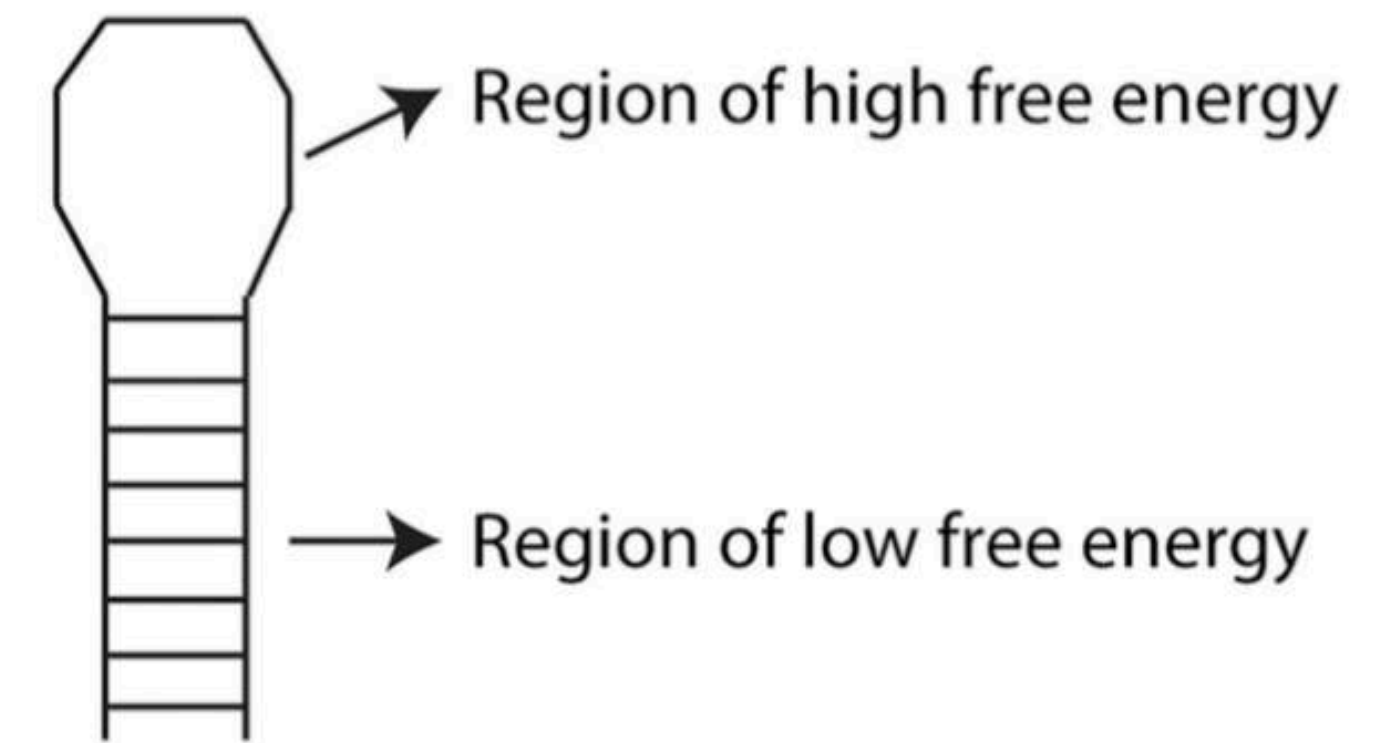


# Συντήρηση

- Η συντήρηση αναφέρεται στη διατήρηση μιας αλληλουχίας στα διάφορα είδη. Η ανάλυση συντήρησης μπορεί να εστιάζει στις 3' UTR, 5' UTR και την αλληλουχία του miRNA, ή οποιοδήποτε συνδυασμό από τα παραπάνω τρία. Γενικά, υπάρχει πολύ μεγαλύτερος βαθμός συντήρησης στην πυρηνική αλληλουχία από τις διπλανές περιοχές.
- Για ένα μικρό ποσοστό των miRNA:mRNA αλληλεπιδράσεων υπάρχει συντήρηση στο 3' άκρο του miRNA που ισοφαρίζει για μη ζευγαρωμένες βάσεις στην πυρηνική αλληλουχία και αυτές οι περιοχές ονομάζονται 3' συμπληρωματικές περιοχές (3' compensatory sites).
- Επίσης, υπάρχει ενδιαφέρον για την συντήρηση των περιοχών που περιβάλλουν το γονίδιο miRNA gene και τα γονίδια-στόχους τους (υποκινητές, σήματα εντοπισμού τους)

# Ελεύθερη Ενέργεια Free Energy

- Η ελεύθερη ενέργεια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση της σταθερότητας ενός βιολογικού συστήματος
- Εάν η πρόσδεση ενός miRNA σε ένα υποψήφιο στόχο mRNA προβλέπεται να είναι σταθερή, τότε θεωρείται ότι είναι πιθανότερο να αντιστοιχεί σε αληθινό στόχο του miRNA
- Δεδομένου της δυσκολίας υπολογισμού της ελεύθερης ενέργειας, συνήθως χρησιμοποιείται η διαφορά ελεύθερης ενέργειας ( $\Delta G$ ).
- Επειδή η αρνητική  $\Delta G$  σημαίνει λιγότερη ενέργεια για να μπορεί να αντιδράσει στο μέλλον, αντιστοιχεί σε συστήματα με αυξημένη σταθερότητα .
- Προβλέποντας πως ένας miRNA και οι υποψήφιοι στόχοι του υβριδίζονται, περιοχές υψηλής και χαμηλής ελεύθερης ενέργειας συνάγονται. Έτσι η ολική  $\Delta G$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως δείκτης ισχύς πρόσδεσης.



**FIGURE 2 | Schematic overview of free energy ( $\Delta G$ ) analysis of predicted RNA hybridization structure.** A hairpin loop is shown with the loop corresponding to a region of high free energy (a positive  $\Delta G$ ) and the stem corresponding to a region of low free energy (a negative  $\Delta G$ ).

# Προσβασιμότητα θέσης πρόσδεσης

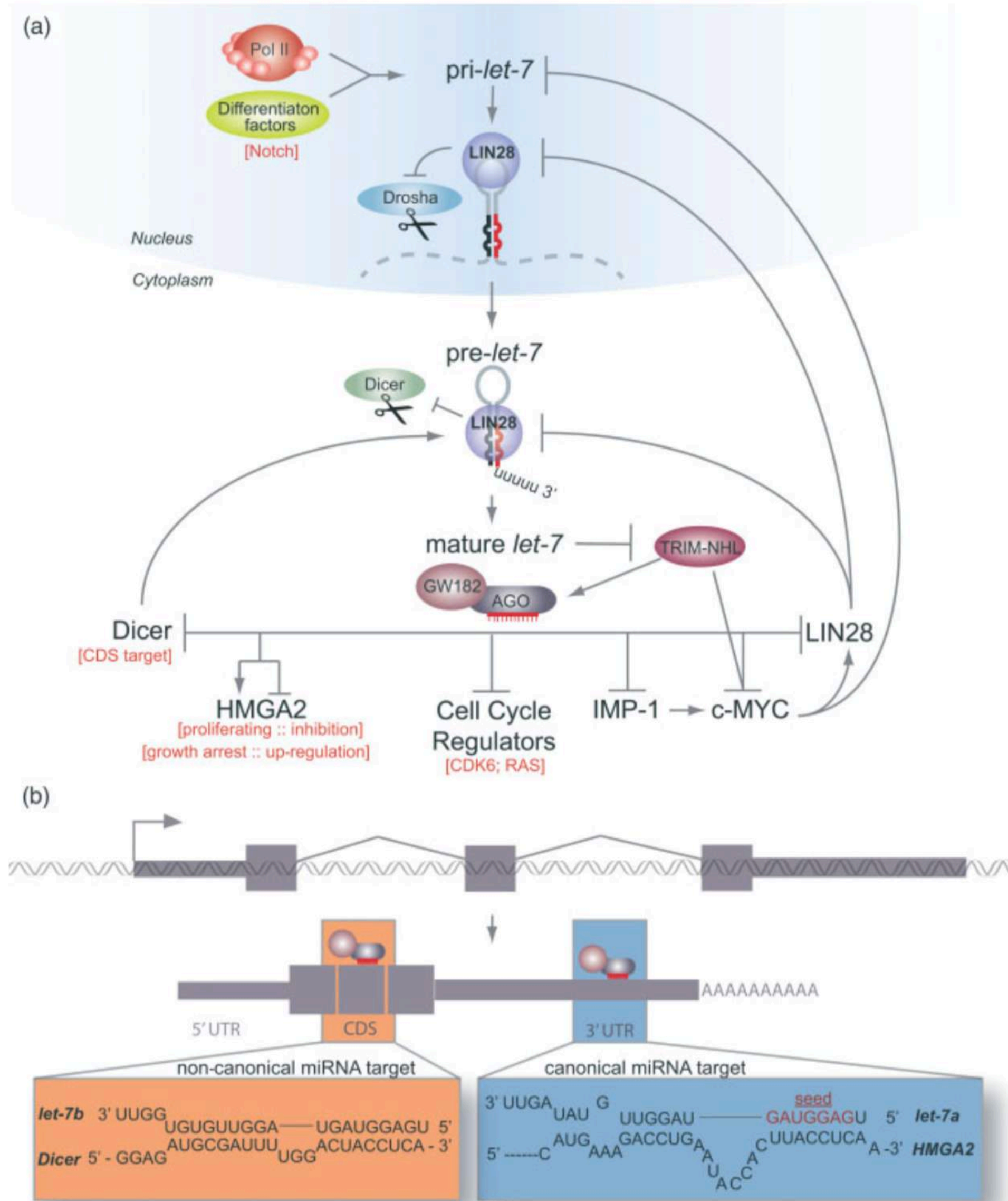
- Η προσβασιμότητα της θέσης είναι ένας δείκτης της ευκολίας με την οποία ένα miRNA μπορεί να τοποθετηθεί και να υβριδοποιηθεί με ένα mRNA-στόχο.
- Μετά τη μεταγραφή, το mRNA λαμβάνει δευτεροταγής δομή η οποία μπορεί να εμπλακεί με την δυνατότητα του miRNA να προσδέσει στη θέση-στόχο.
- Η υβριδοποίηση miRNA:mRNA ενέχει μια διαδικασία δύο βημάτων στην οποία ένα miRNA προσδένει πρώτα σε μια μικρή και προσβάσιμη περιοχή του mRNA.
- Στην συνέχεια, η δευτεροταγής δομή του mRNA ξεδιπλώνει καθώς το miRNA ολοκληρώνει την πρόσδεσή του με τον στόχο. Επομένως, για την αξιολόγηση της πιθανότητας ένα mRNA να είναι στόχος κάποιου miRNA, η προβλεπόμενη ποσότητα ενέργειας που απαιτείται για να επιτραπεί η πρόσβαση στη θέση-στόχος, μπορεί να υπολογιστεί.

# Λιγότερο κοινά χαρακτηριστικά των εργαλείων αναγνώρισης στόχων miRNA

- Καθώς κατανοούμε περισσότερο τους κανόνες πρόσδεσης των miRNAs καινούργια στοιχεία ενσωματώνονται στην υπολογιστική πρόβλεψη, όπως:
  - Αριθμός των θέσεων-στόχων πρόσδεσης.
  - Ζεύγη ταλάντωσης GU (GU wobble) στον πυρήνα που επιτρέπουν την υπολογιστική πρόβλεψη ζευγαρώματος ενός G με ένα U αντί για ένα C
  - Οι 3' συμπληρωματικές περιοχές που προβλέπουν ζευγάρωμα του στόχου με τα νουκλεοτίδια 12–17 του miRNA



Το παράδειγμα του *let-7* για το πως τα *miRNAs* ρυθμίζουν με ένα πολύπλοκο τρόπο την ίδια τη βιογένεση τους κι ένα εύρος κυτταρικών διεργασιών



- LIN28 inhibits post-transcriptionally *let-7a* biogenesis
- Mature *let-7a* targets among others TRIM-NHL, DICER, cMYC and LIN28 proteins



# Σημαντικά υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης στόχων miRNAs

**Table 1 | Profile of miRanda.**

Website	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a> (source code)
Version	Current version is 3.3a, last updated 8/2010
Input	User-supplied miRNA sequence and UTR sequence for command line
Organisms	Any
User adjustability	Free energy threshold, alignment threshold, weight of seed region, and gap penalty
Features	Seed match, conservation, and free energy

**Table 2 | Profile of miRanda-mirSVR.**

Website	<a href="http://www.microrna.org/">http://www.microrna.org/</a>
Version	Current version is 3.3a, last updated 8/2010, uses miRBase version 15
Input	miRNA identifier or gene name
Organisms	Humans, rats, mice, flies, and worms
User adjustability	None
Features	Seed match, conservation, free energy, site accessibility, and others

**Table 3 | Profile of TargetScan.**

Website	<a href="http://www.targetscan.org">http://www.targetscan.org</a>
Version	Current version is 6.2, last updated 6/2012
Input	miRNA name, gene name or miRNA family
Organism	Mammals, flies, and worms
User adjustability	No
Features	Seed match and conservation

**Table 4 | Profile of DIANA-microT-CDS.**

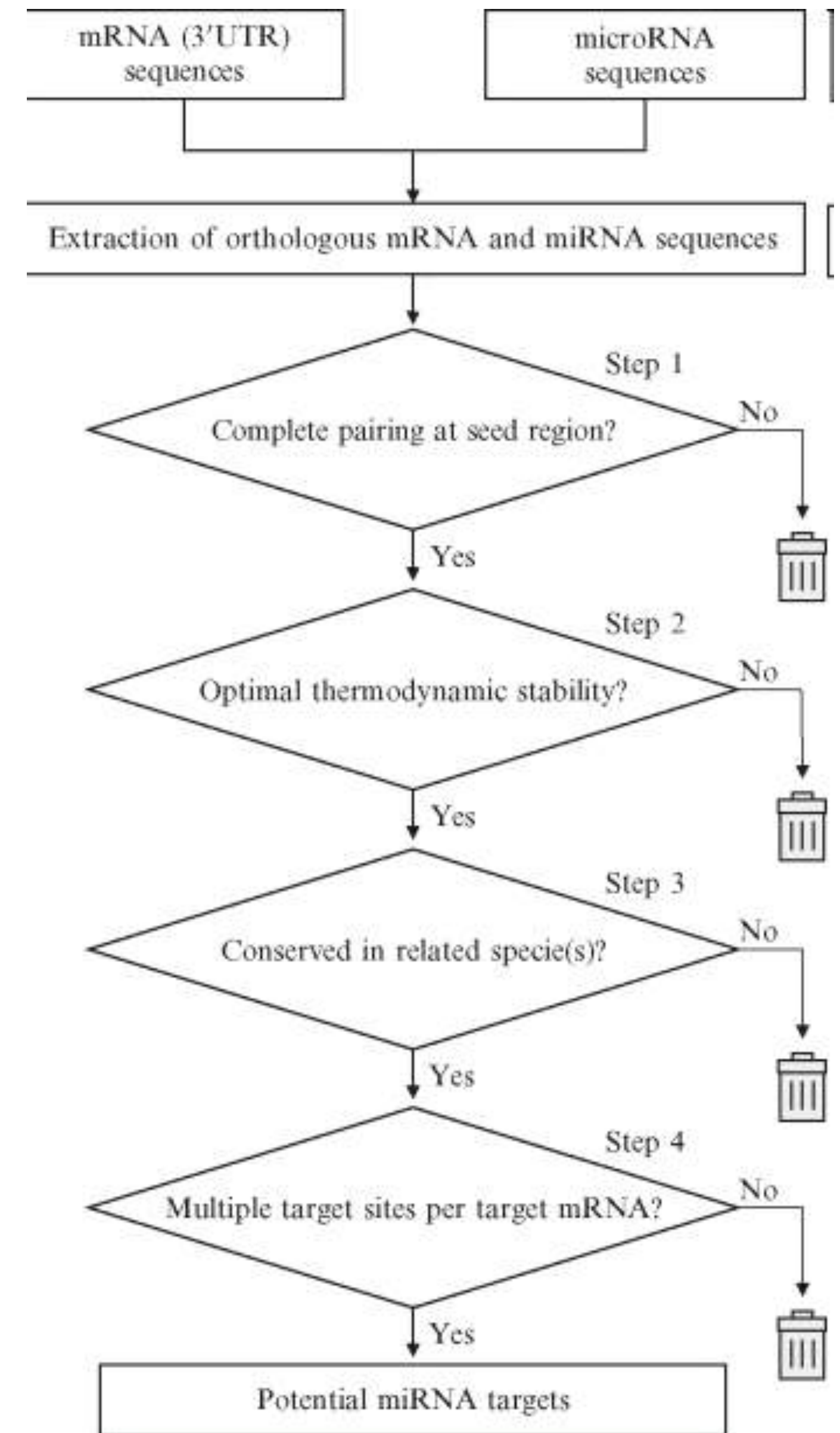
Website	<a href="http://www.microrna.gr/microT-CDS">http://www.microrna.gr/microT-CDS</a>
Version	Current version is 5.0, last updated 7/2012, uses miRBase version 18
Input	miRNA name, gene name, Ensembl ID, KEGG description, or some combination of these
Organisms	Humans, mice, flies, and worms
User adjustability	None
Features	Seed match, conservation, free energy, site accessibility and target-site abundance

# Συγκεντρωτικά χαρακτηριστικά υπολογιστικών εργαλείων πρόβλεψης στόχων miRNAs

FEATURES USED IN miRNA TARGET PREDICTION							
Tool name	Seed match	Conservation	Free energy	Site accessibility	Target-site abundance	Machine learning	References
miRanda	X	X	X				Enright et al., 2003; John et al., 2004
miRanda-mirSVR	X	X	X	X		X	Betel et al., 2010
TargetScan	X	X					Lewis et al., 2005; Grimson et al., 2007; Friedman et al., 2009; Garcia et al., 2011
DIANA-microT-CDS	X	X	X	X	X	X	Maragkakis et al., 2009; Reczko et al., 2012; Paraskevopoulou et al., 2013
MirTarget2	X	X	X	X		X	Wang, 2008; Wang and El Naqa, 2008
RNA22-GUI	X		X				Hofacker et al., 1994; Miranda et al., 2006; Loher and Rigoutsos, 2012
TargetMiner	X	X	X	X	X	X	Bandyopadhyay and Mitra, 2009
SVMicrO	X	X	X	X	X	X	Liu et al., 2010
PITA	X	X	X	X	X		Kertesz et al., 2007
RNAhybrid	X		X		X		Rehmsmeier et al., 2004; Kruger and Rehmsmeier, 2006

# A pipeline for miRNA target prediction

- Τα κύρια βήματα που απεικονίζονται είναι: Με το παρέχονται αλληλουχίες miRNA and mRNA (3'UTR) κατασκευάζονται βάσεις με παρόμοιες αλληλουχίες από συγγενή είδη (εν δυνάμει ορθόλογες).
- Οι θέσεις πρόσδεσης των miRNA αναγνωρίζονται αναλύοντας το πρότυπο ζευγαρώματος βάσεων των miRNAs και mRNAs σύμφωνα με τη συμπληρωματικότητα του στις προκαθορισμένες περιοχές (**Βήμα 1**); Καθορίζεται η ισχύς πρόσδεσης του δίκλωνου miRNA-mRNA υπολογίζοντας την ελεύθερη ενέργεια (**Βήμα 2**); Φυλογενετική σύγκριση των αλληλουχιών (**Βήμα 3**); Τέλος υπολογίζεται ο αριθμός των θέσεων πρόσδεσης στόχων για κάθε μετάγραφο mRNA (**Βήμα 4**).

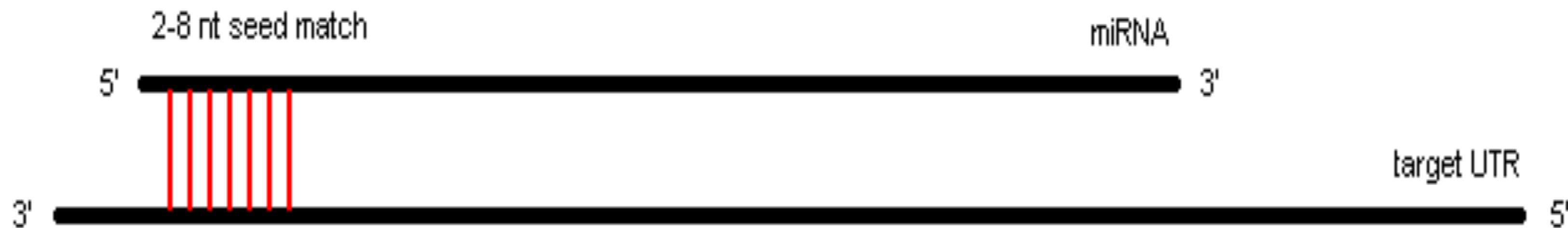


Ο αλγόριθμος TargetScan (Lewis et al 2003)

Στόχος είναι η κατασκευή μιας αξιολογημένης λίστας υποψήφιων γονιδίων στόχων.

### **Βήμα 1: Εύρεση UTRs σε ένα οργανισμό**

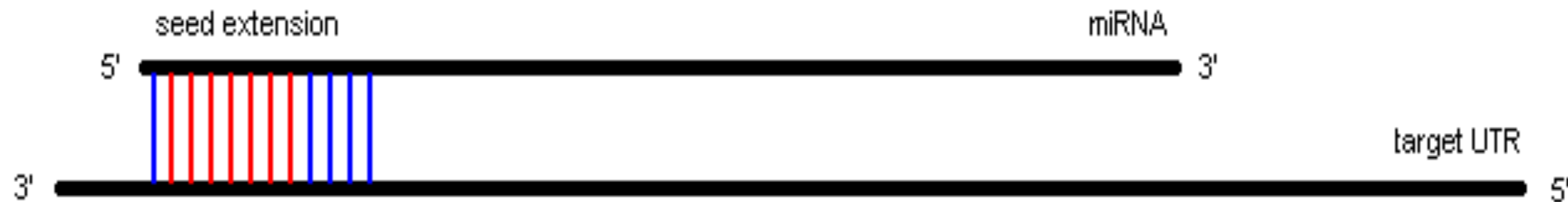
- Βάσεις 2-8 της πυρηνικής αλληλουχίας του miRNA = “miRNA seed”
- Συμπληρωματικότητα Watson-Crick
- Όχι ζεύγη ταλαντώσεως βάσεων (wobble pairs; G-U)
- 7nt ζευγάρισμα = “ζευγάρισμα πυρήνα”



# TargetScan Algorithm

## Βήμα 2: Επέκταση του ζευγαρώματος πυρήνα

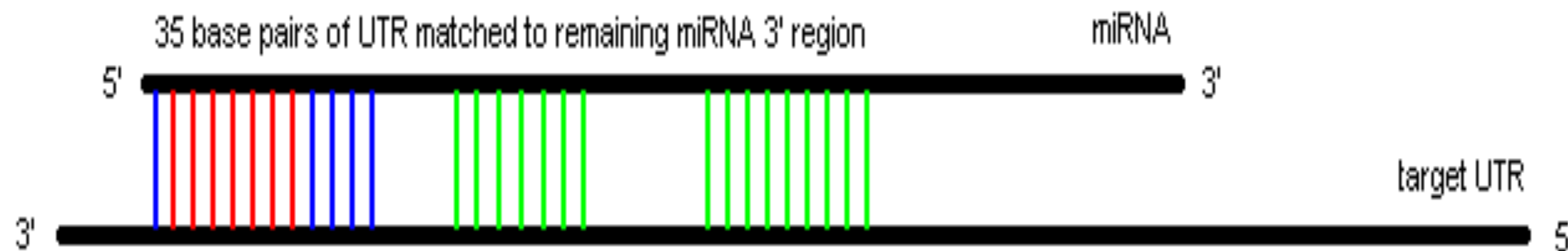
- Επιτρέπει τα ζεύγη ταλαντώσεως βάσεων G-U (wobble pairs)
- Και προς τα δύο άκρα
- Σταματάει όταν βρεθεί μια αναντιστοιχία βάσεων



# TargetScan Algorithm

## Βήμα 3: Βελτιστοποίηση ζευγαρώματος βάσεων

- Ανάλυση της περιοχής 3' άκρου που έχει απομείνει
- 35 βάσεις περιοχών UTR από το 5' άκρο κάθε ζευγαρώματος πυρήνα
- Εφαρμογή του προγράμματος RNAfold (Hofacker et al 1994)



# TargetScan Algorithm

## **Βήμα 4: Ελεύθερη ενέργεια (G) αναδίπλωσης για κάθε πρόβλεψη miRNA:στόχου**

- Αξιολόγηση κάθε περιοχής UTR
- Επανάληψη της διαδικασίας για κάθε άλλο είδος οργανισμού για το οποίο υπάρχουν αλληλουχίες UTR

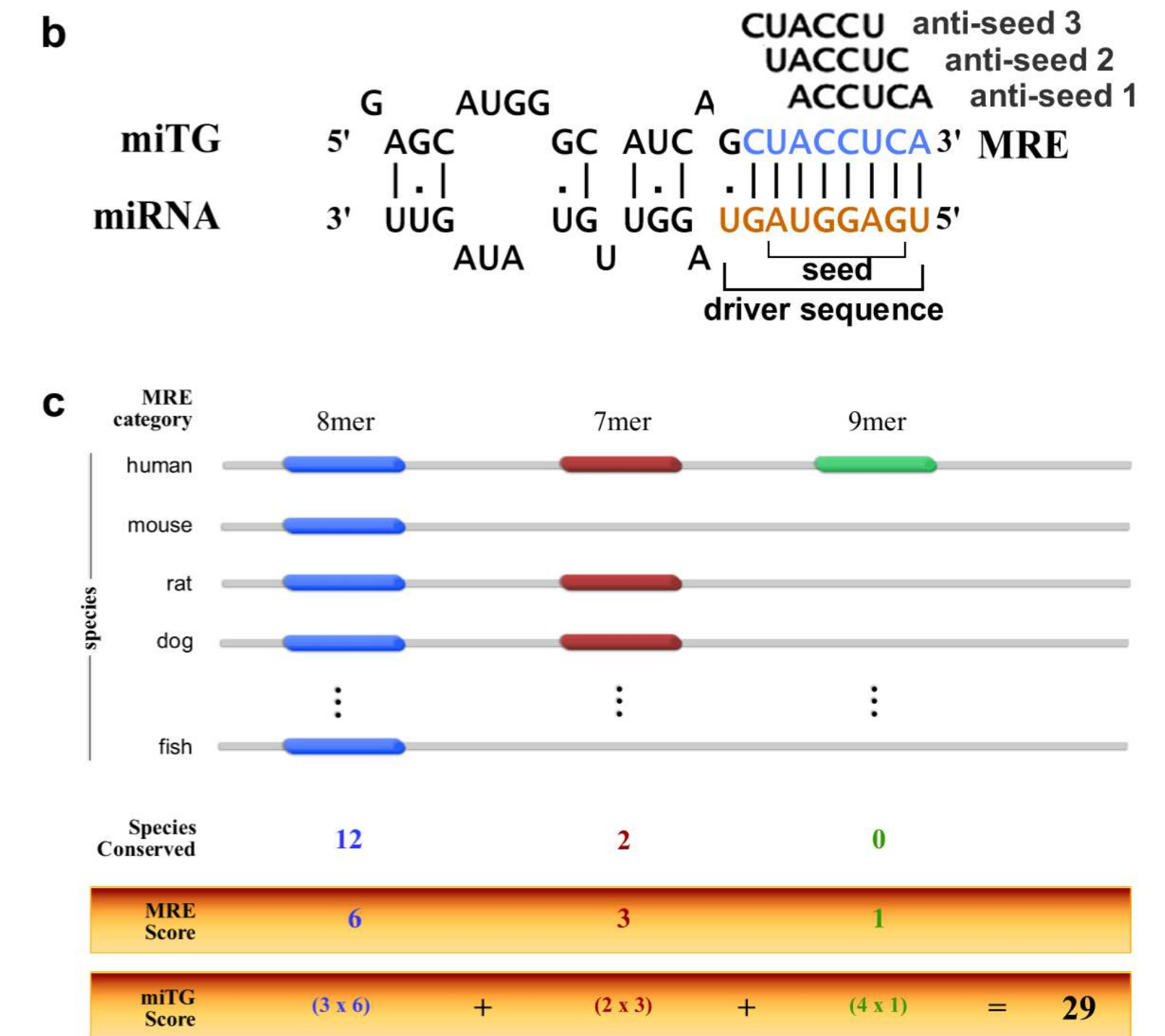
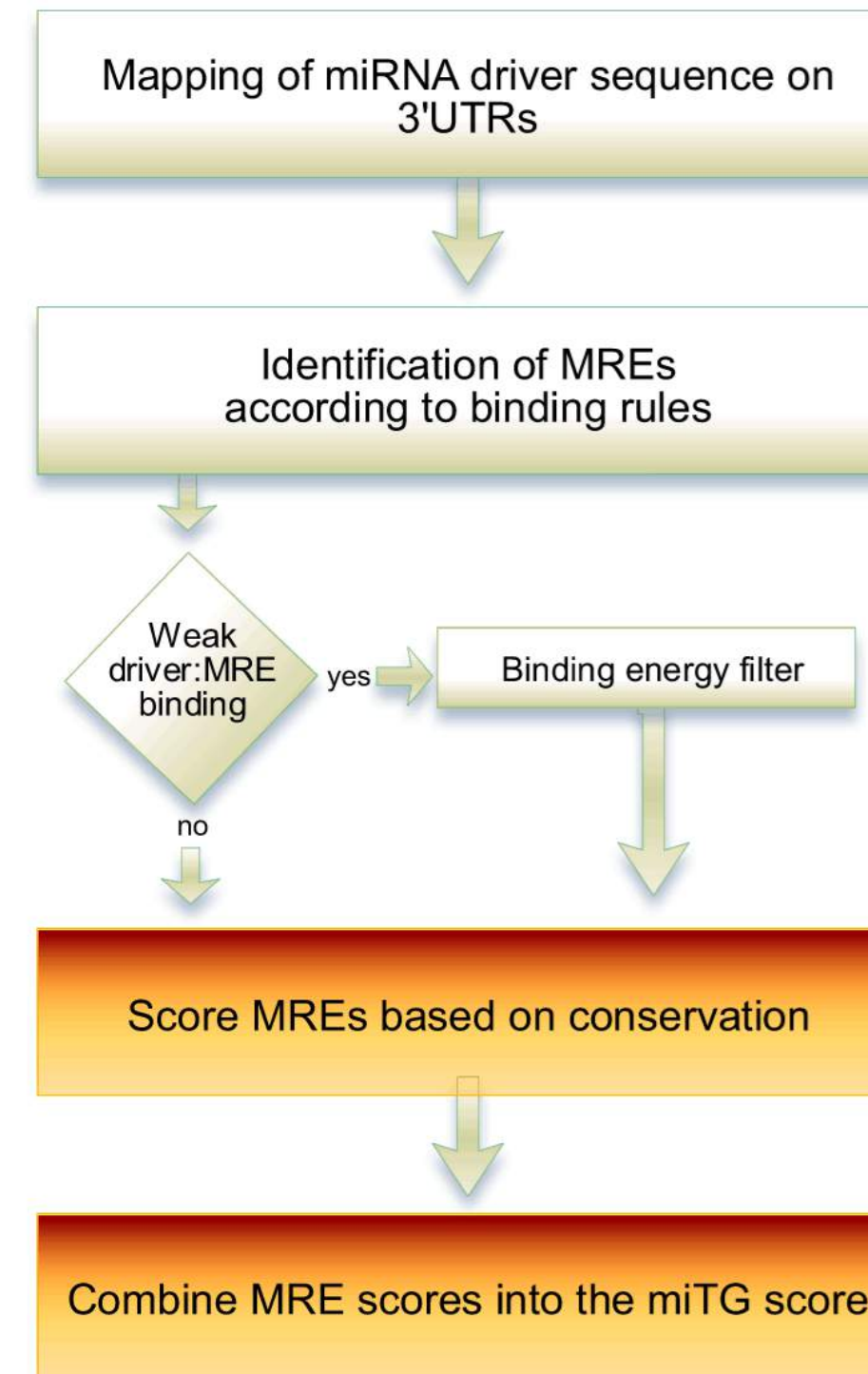
# Ο αλγόριθμος DIANA-microT (Hatzigeorgiou Lab)

(A) Σχηματική Απεικόνιση του αλγόριθμου. Η αλληλουχία οδηγός χαρτογραφείται σε ένα κυλιόμενο παράθυρο μήκους 9 νουκλεοτιδίων κατά μήκος της αλληλουχίας 3'UTR. Η αξιολόγηση της αλληλεπίδρασης αλληλουχίας οδηγού: στοιχείο απόκρισης στο miRNA (miRNA Response Element, MRE) καθορίζεται από τον αριθμό ζευγαρώματος βάσεων ανάμεσα στις δύο αλληλουχίες.

- Ζευγάριμα βάσεων ταλάντωσης G:U ή λιγότερο από 7 συνεχόμενα ζευγαρώματα βάσεων WC επιτρέπονται μόνο εάν η ελεύθερη ενέργεια του προβλεπόμενου ετεροδίκλωνου miRNA:MRE είναι κάτω από το κατώφλι προβλεπόμενης ελεύθερης ενέργειας. Τα MREs βαθμολογούνται σύμφωνα με τον τρόπο που προσδέονται, το βαθμό ελεύθερης ενέργειας και το βαθμό συντήρησής τους σε άλλα είδη. Το τελικό σκορ miTG είναι το σταθμισμένο άθροισμα όλων των MREs στο γονίδιο-στόχο του miRNA (miTG).

(B) Η κορυφαία αλληλουχία (MRE) είναι μέρος του 3'UTR του miTG. Η αλληλουχία των 9 nts κοντά στο 5' άκρο του miRNA (αλληλουχία-οδηγός). Οι αλληλουχίες που αντιστοιχούν στις θέσεις 1-6, 2-7 και 3-8 από το 5' άκρο του miRNA ονομάζονται αντι-πυρηνικές αλληλουχίες anti-seed 1, anti-seed 2 και anti-seed 3 αντίστοιχα.

(Γ) Ένα παράδειγμα υπολογισμού σκορ miTG. Η άνω γραμμή αντιστοιχεί στην αλληλουχία 3'UTR ενός γονιδίου του ανθρώπου που περιέχει MREs με διαφορετικούς βαθμούς συντήρησης. Μεμονωμένα σκορ MRE υπολογίζονται με βάση το βαθμό συντήρησης, το βαθμό. Το άθροισμα όλων των σταθμισμένων σκορ MRE καθορίζουν το τελικό σκορ miTG score.

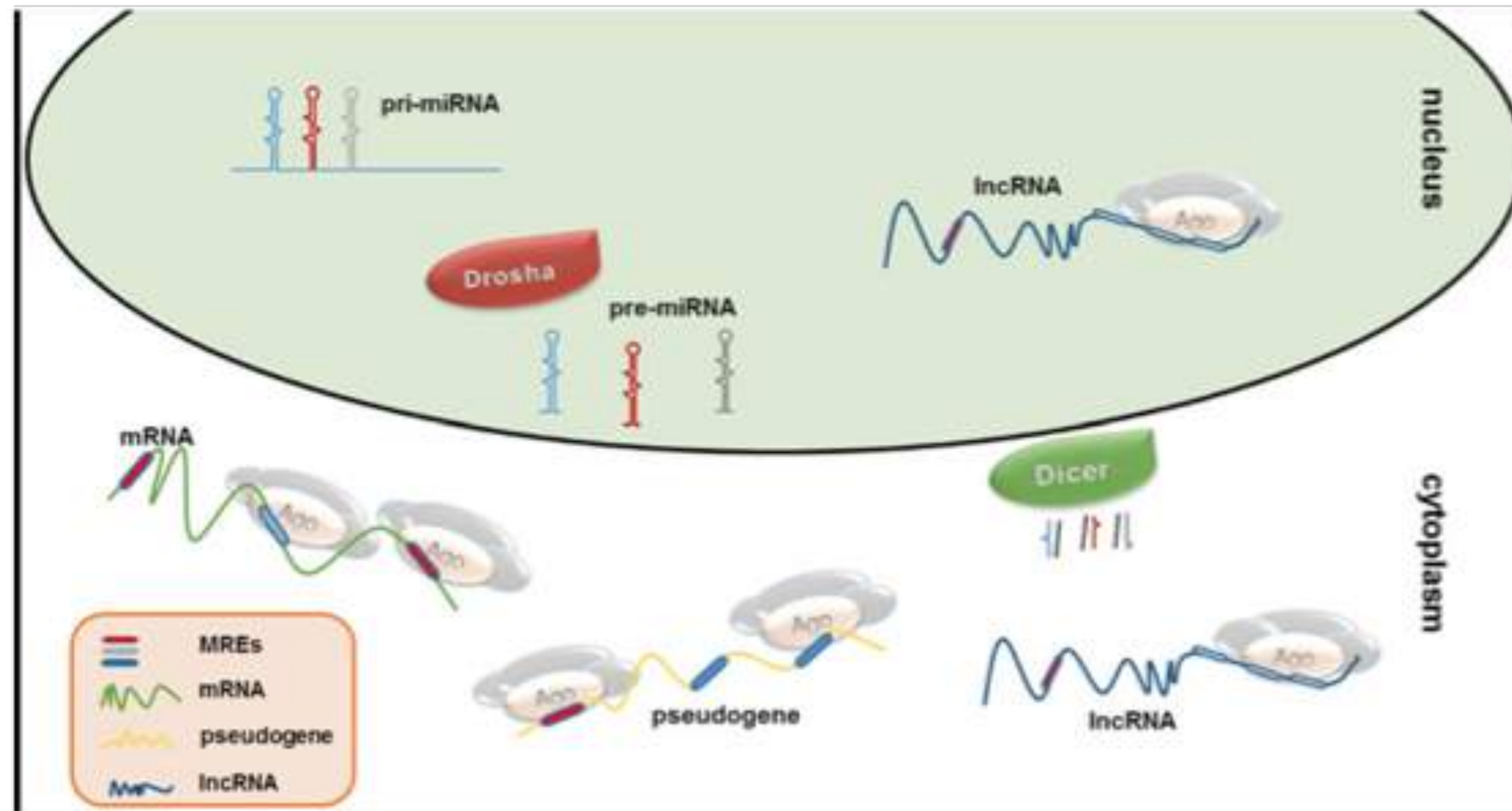


Το άθροισμα όλων των σταθμισμένων σκορ MRE καθορίζουν το τελικό σκορ miTG score.



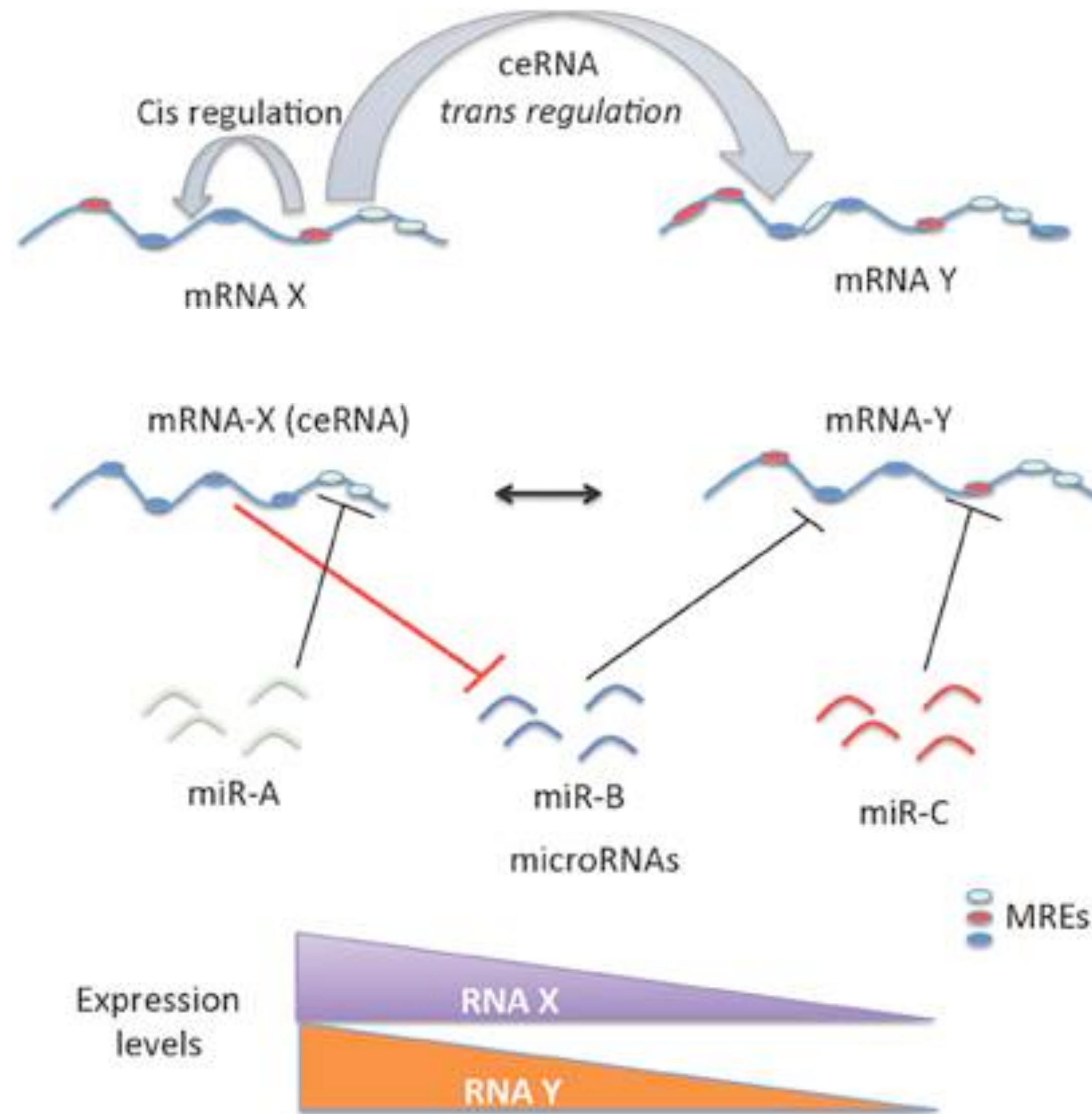
# Μακρά μη-κωδικοποιά RNAs ως σπόγγοι μικροRNA

- Μακρά μη-κωδικοποιά RNAs (lncRNAs) μπορούν να λειτουργούν ως σφουγγάρια ή δολώματα για την πρόσδεση του από miRNAs και επομένως μπορούν να ρυθμίσουν τον διαθέσιμο αριθμό αντιγράφων miRNAs που μπορούν να στοχεύσουν mRNAs. Αυτός ο πρόσφατα μετα-μεταγραφικός μηχανισμός μεταβάλλει τα συστατικά ενδογενών ρυθμιστικών δικτύων. ncRNAs που μοιράζονται miRNA response elements (MREs) με mRNAs ενέχονται σε αυτό το μηχανισμό που περιγράφεται ως ανταγωνιστικός σε ενδογενή RNA (competing endogenous RNA, ceRNA)



**Fig. 1** Overview of the ceRNA activity in nucleus and cytoplasm. miRNAs loaded in the RISC complex post-transcriptionally regulate protein coding genes through mRNA cleavage, direct translational repression and/or mRNA destabilization in the cytoplasm. lncRNAs compete with mRNAs for miRNA binding by acting as "sponge" molecules in both cell compartments

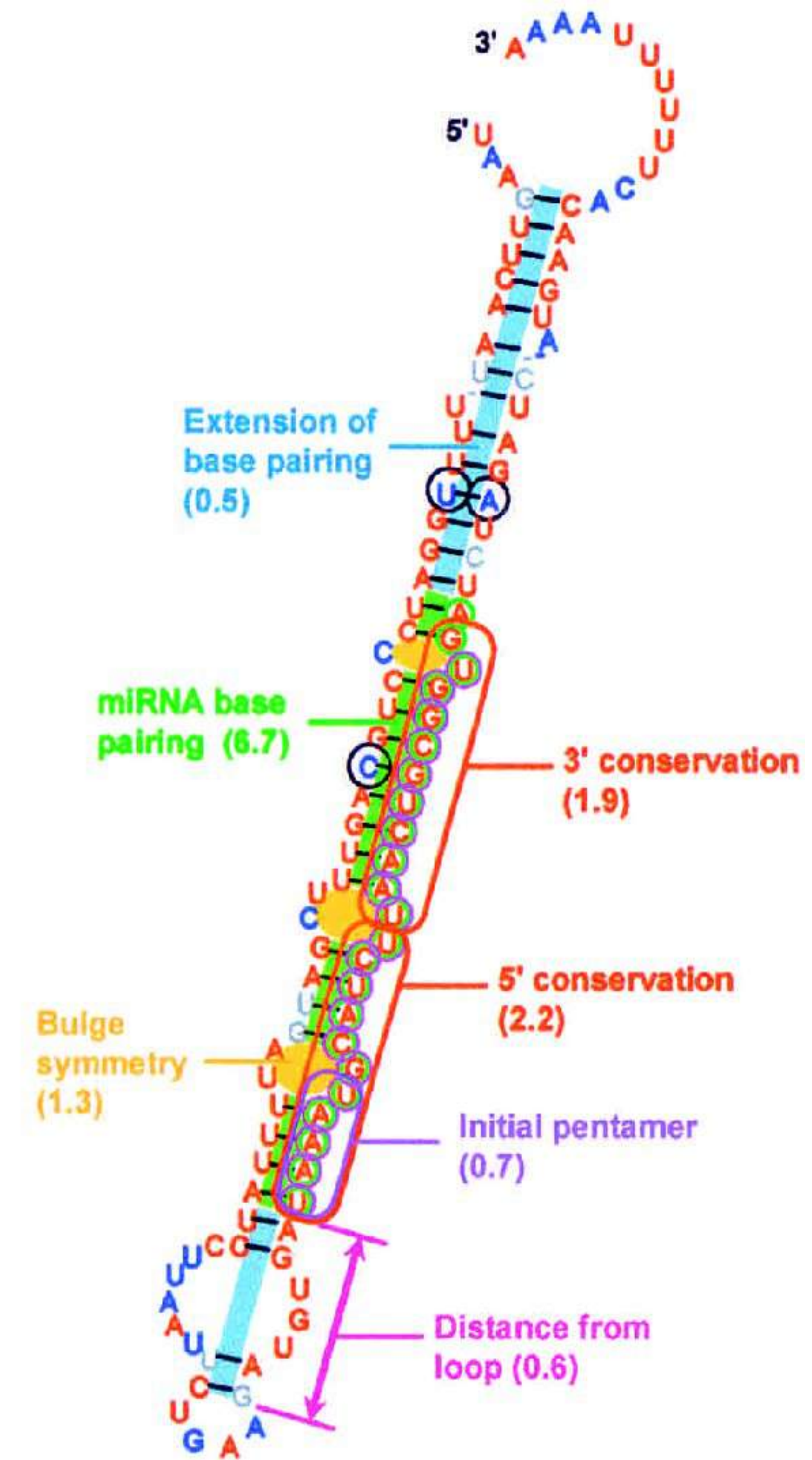
# Competing endogenous RNAs (ceRNAs): new entrants to the intricacies of gene regulation



mRNAs  
Pseudogenes  
Long non-coding RNAs  
Circular RNAs are involved in  
ceRNA networks

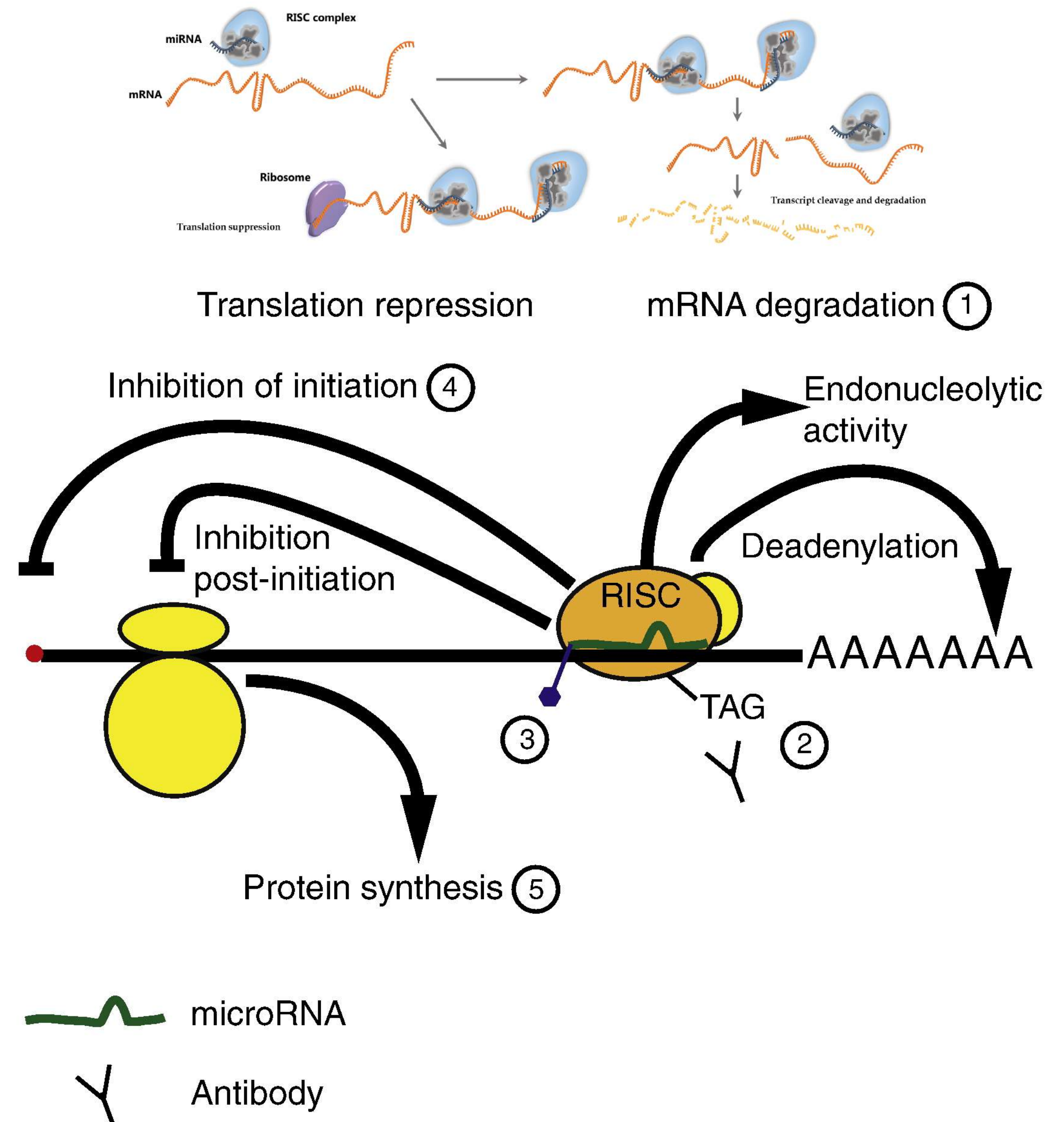
# Ο αλγόριθμος MiRscan

- Ο αλγόριθμος MiRscan αναλύει γνωρίσματα της φουρκέτας
- Το συνολικό σκορ υπολογίζεται αθροίζοντας τα σκορς από το κάθε χαρακτηριστικό
- Το σκορ για κάθε γνώρισμα υπολογίζεται διαιρώντας τη συχνότητα εμφάνισής του στην ομάδα εκπαίδευσης με τη συνολική του εμφάνιση

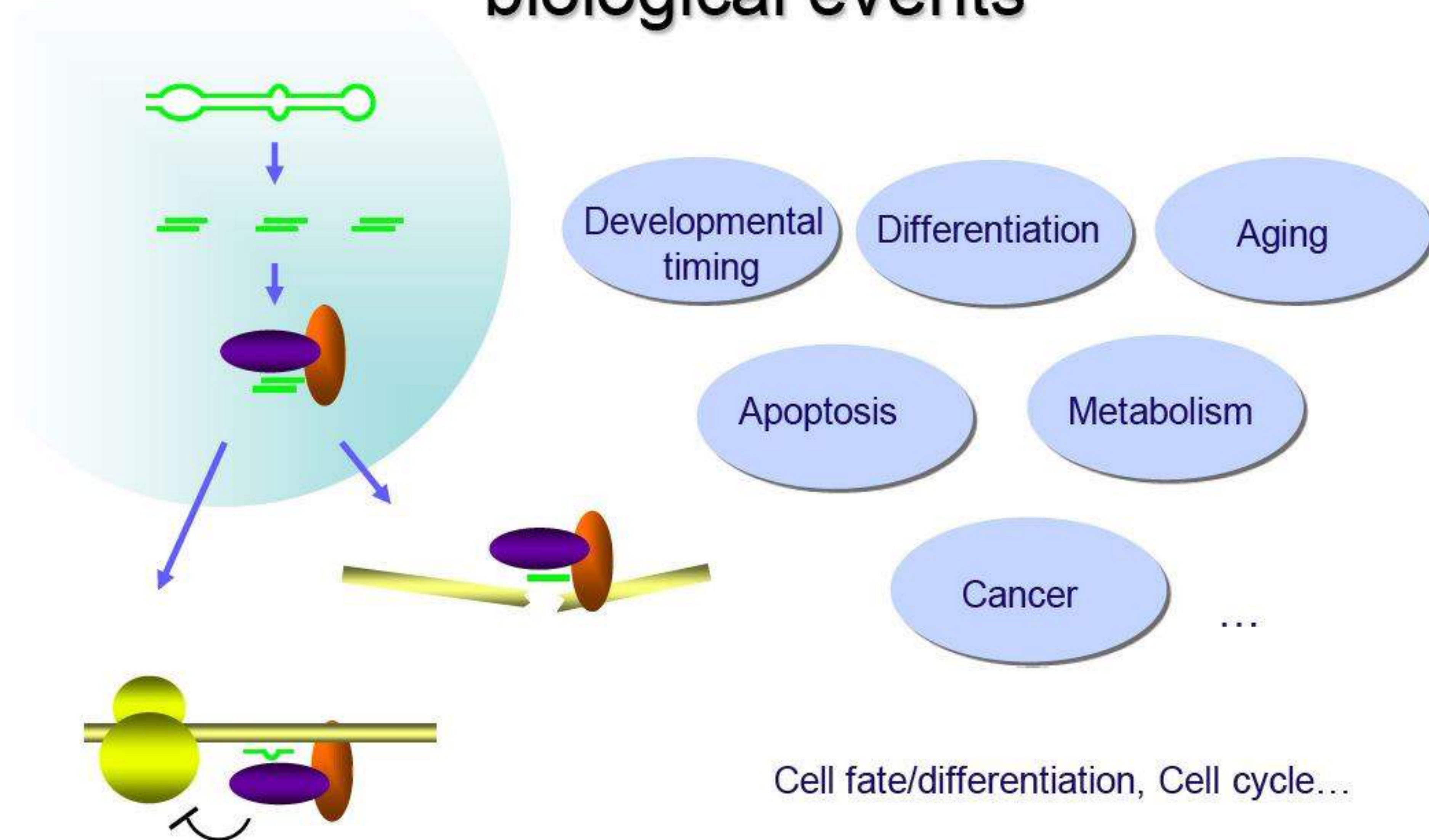


# Περίληψη μεθοδολογιών πειραματικής αναγνώρισης στόχων miRNAs

- Σχηματική περίληψη των μεθοδολογιών πειραματικής αναγνώρισης στόχων miRNAs. Η ρύθμιση της μετάφρασης από τα miRNAs είναι πολύ-επίπεδη: (1) Ανάλυση των mRNAs που αποδομούνται ως αποτέλεσμα υπερ-έκφρασης του miRNA και ανάλυση των μοτίβων αλληλουχιών, (2) Ανοσοκατακρίμνηση σημασμένου συμπλόκου RISC και ανάλυση των συσχετισμένων mRNAs, (3) Απομόνωση με κολώνα συγγένειας σημασμένων microRNAs και ανάλυση των συσχετισμένων mRNAs με μικροσυστοιχίες, (4) με βάση το γεγονός ότι ορισμένοι στόχοι των miRNAs αλλάζουν τα επίπεδα κατανομή τους στα κλάσματα πολυσωμάτων και αναλύοντας διαφορές στην κατανομή των επιπέδων mRNAs σε κλάσματα πολυσωμάτων με ή χωρίς το miRNA, (5) αναλύοντας την έκφραση πρωτεϊνών με εφαρμογή τεχνικών σήμανσης πρωτεϊνών και φασματογραφία μάζας.



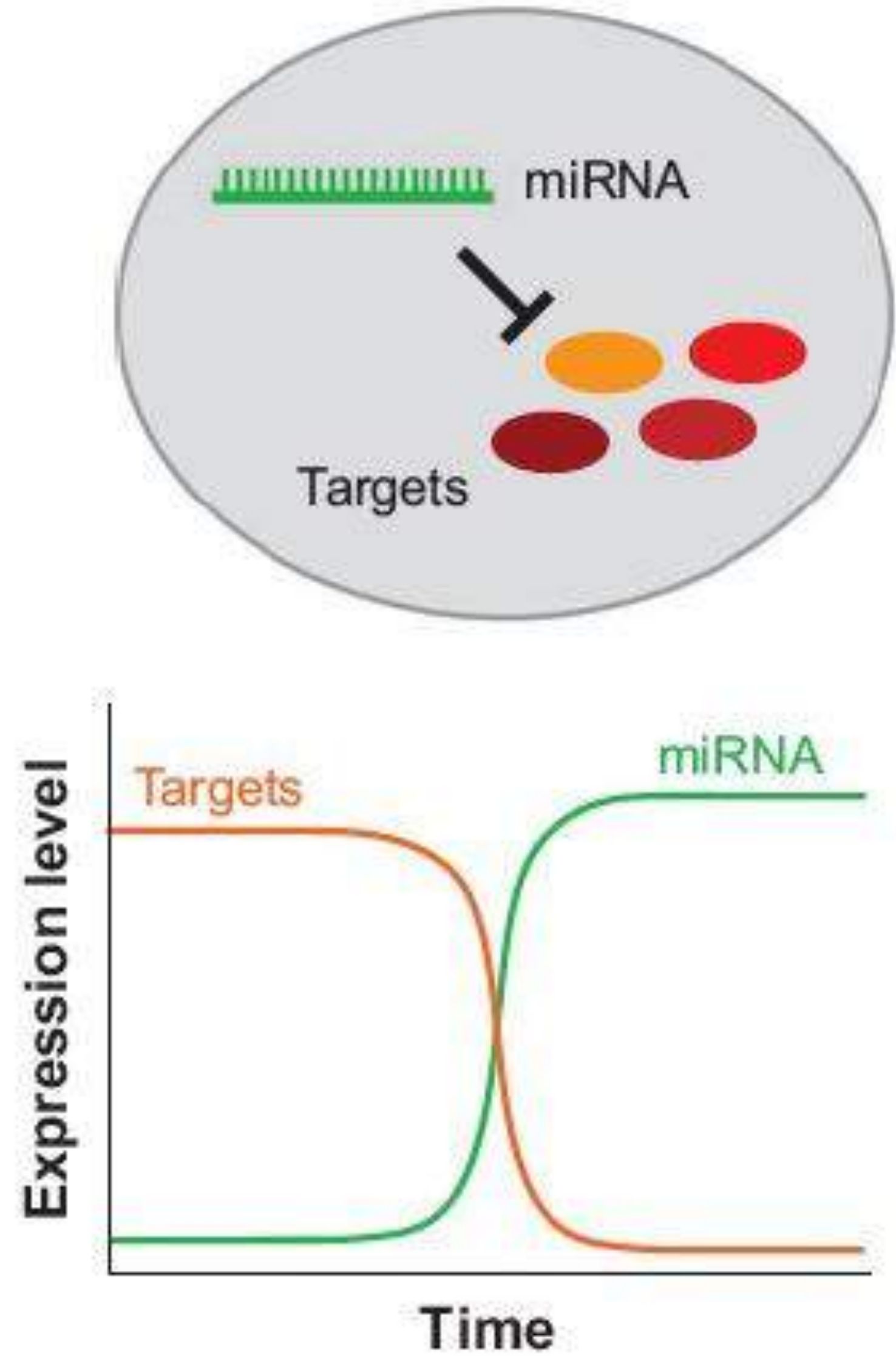
# Thousands of microRNAs act in multiple biological events



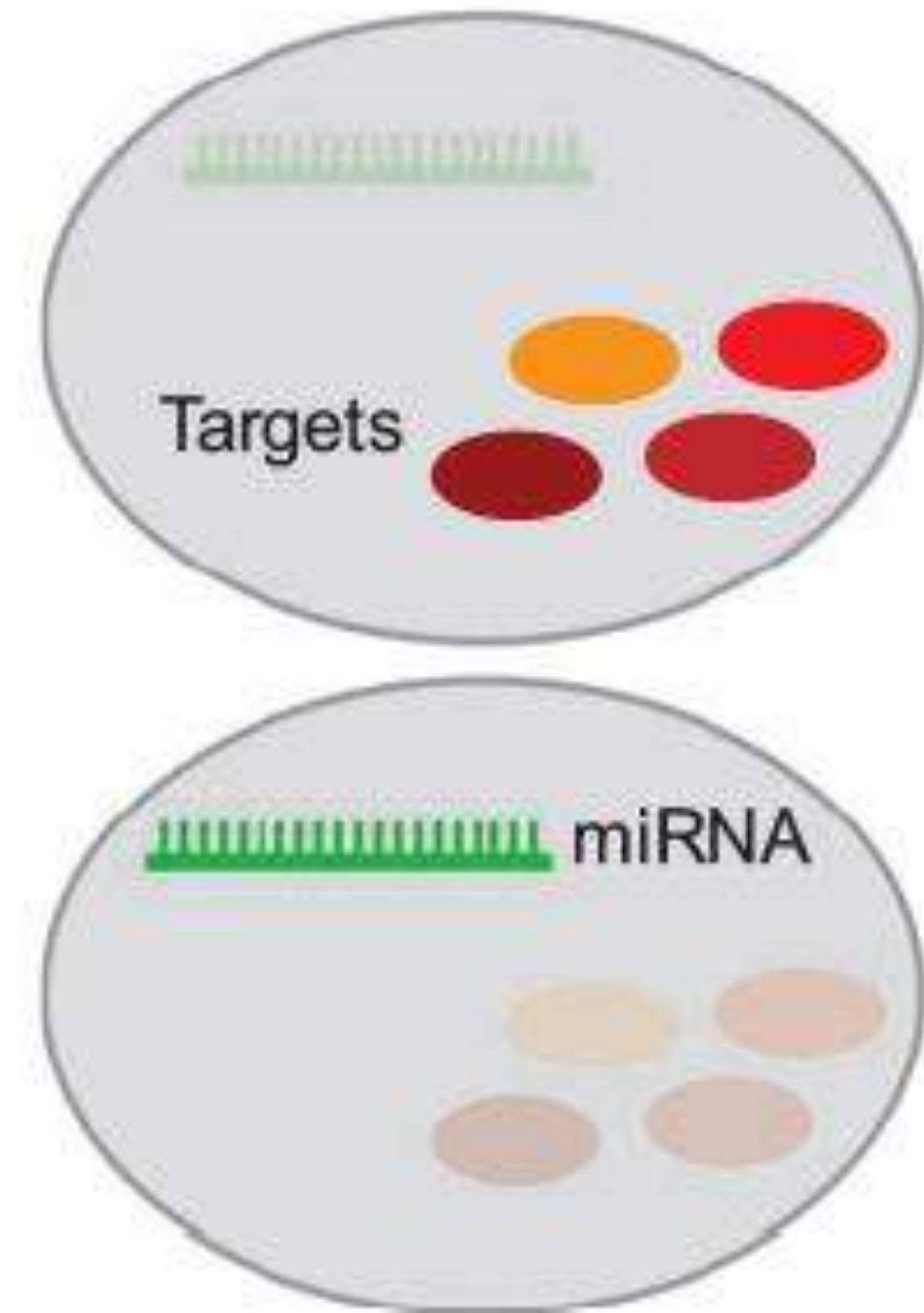
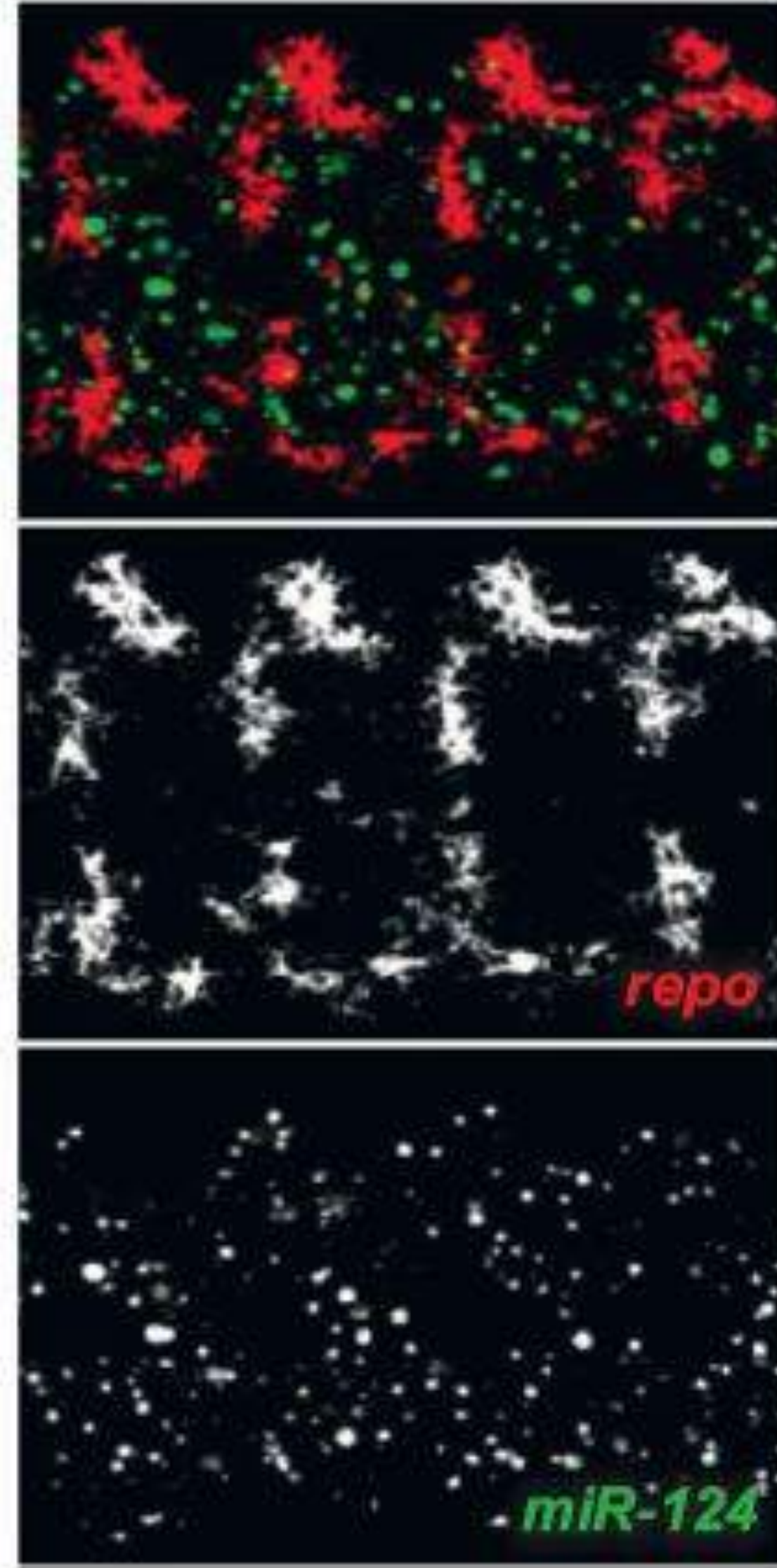
# Ιστο-ειδική ή σταδιο-ειδική έκφραση miRNA

- Τα γονιδιώματα των θηλαστικών φέρουν χιλιάδες γονίδια miRNA, αλλά αυτά χαρακτηρίζονται από διαφορετικά ιστο-ειδικά ή σταδιο-ειδικά πρότυπα έκφρασης.
- Έτσι μόνο μια υπο-ομάδα γονιδίων miRNA εκφράζεται σε βιολογικά σημαντικά επίπεδα. Σε μελέτες ρύθμισης των miRNA αυτό είναι κάτι σημαντικό να ληφθεί υπ' όψη.
- Οι πληθώρα συνδυασμών ανάμεσα στα πρότυπα έκφρασης των miRNA και των στόχων τους (τόπος και αριθμός των πυρηνικών αλληλουχιών) επιτρέπει ένα ειδικό και ευαίσθητο ρυθμιστικό έλεγχο σε ένα ιστό ή σε μια κατάσταση. Υπολογίζεται ότι περίπου 1/3 του συνόλου των πρωτεϊνικών γονιδίων ρυθμίζεται από τα miRNAs.

**a** Temporal reciprocity

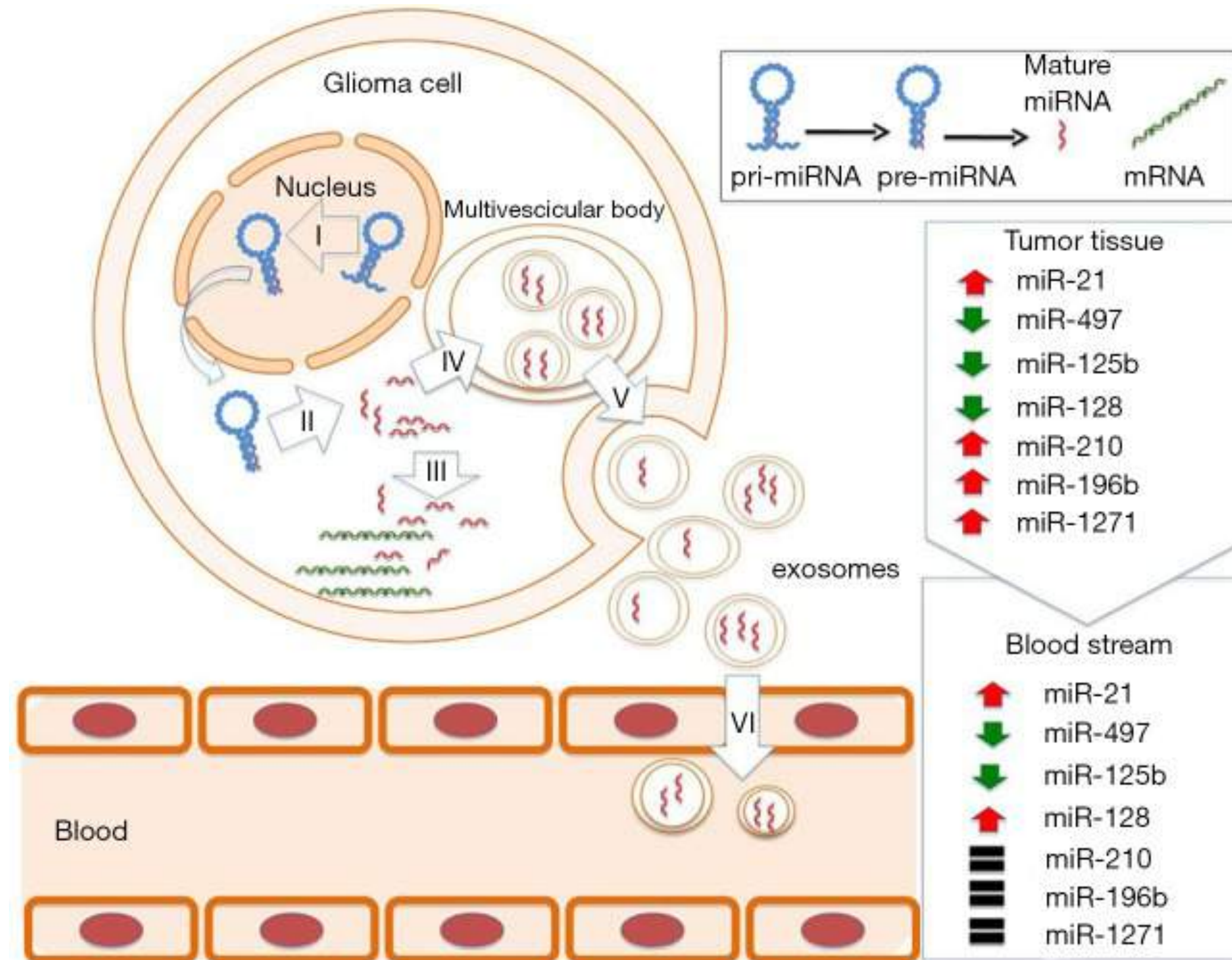


**b** Spatial reciprocity



# Τα miRNAs ως μη-επεμβατικοί βιοδείκτες

- Έχουν τόσο σταθερή δομή που κυκλοφορούν εκτός κυττάρου από μόνα τους ή μέσα σε εξωσώματα.





# Journal Club

[Cancer Biology & Therapy 7:2, 255-264; February 2008]; ©2008 Landes Bioscience

Research Paper

## miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer

---

Antonis Giannakakis,<sup>1,5</sup> Raphael Sandaltzopoulos,<sup>5</sup> Joel Greshock,<sup>3,†</sup> Shun Liang,<sup>1</sup> Jia Huang,<sup>3</sup> Kosei Hasegawa,<sup>1</sup> Chunsheng Li,<sup>1</sup> Ann O'Brien-Jenkins,<sup>1</sup> Dionyssios Katsaros,<sup>4</sup> Barbara L. Weber,<sup>3,†</sup> Celeste Simon,<sup>3</sup> George Coukos<sup>1-3</sup> and Lin Zhang<sup>1,2</sup>

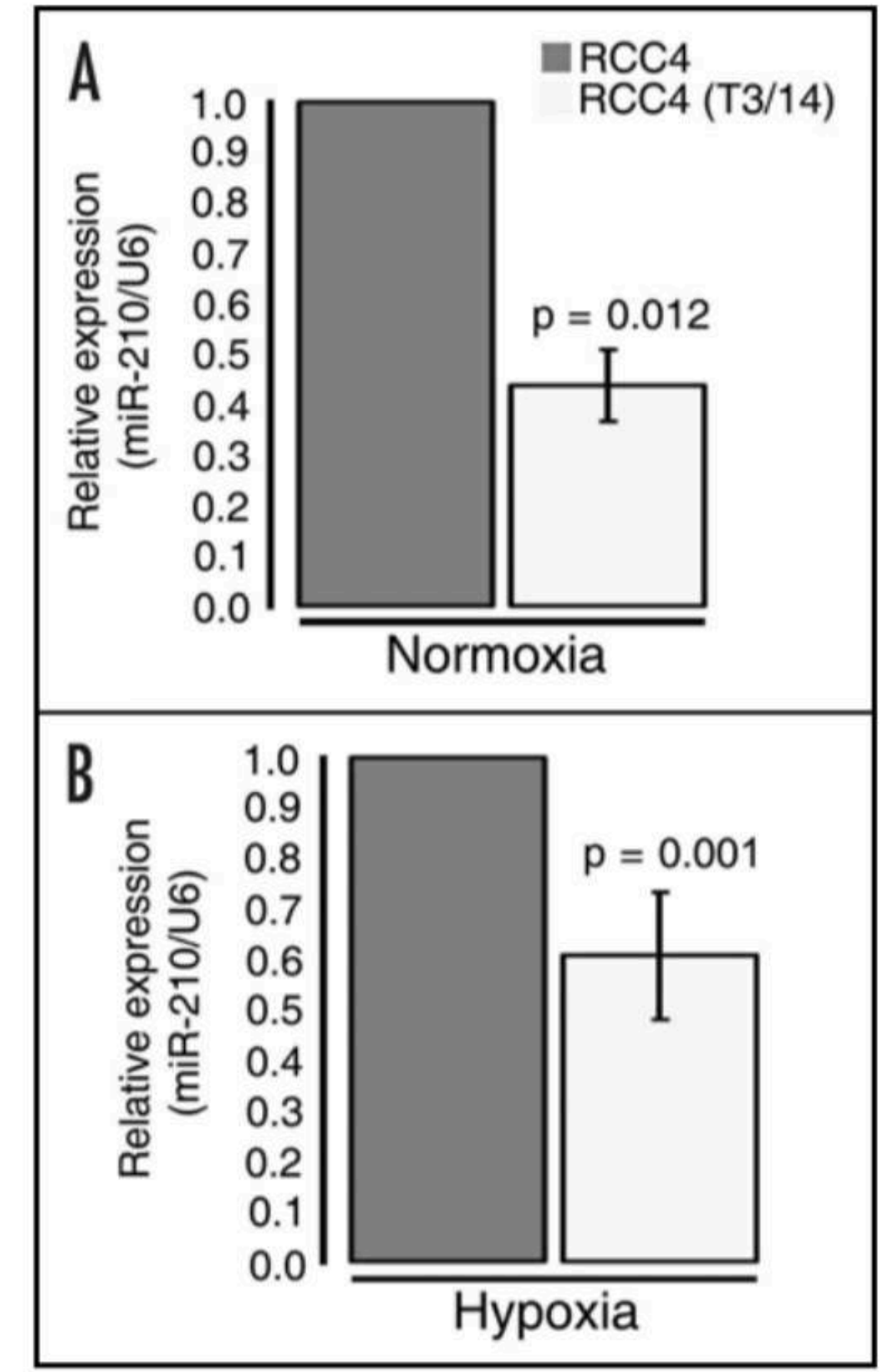
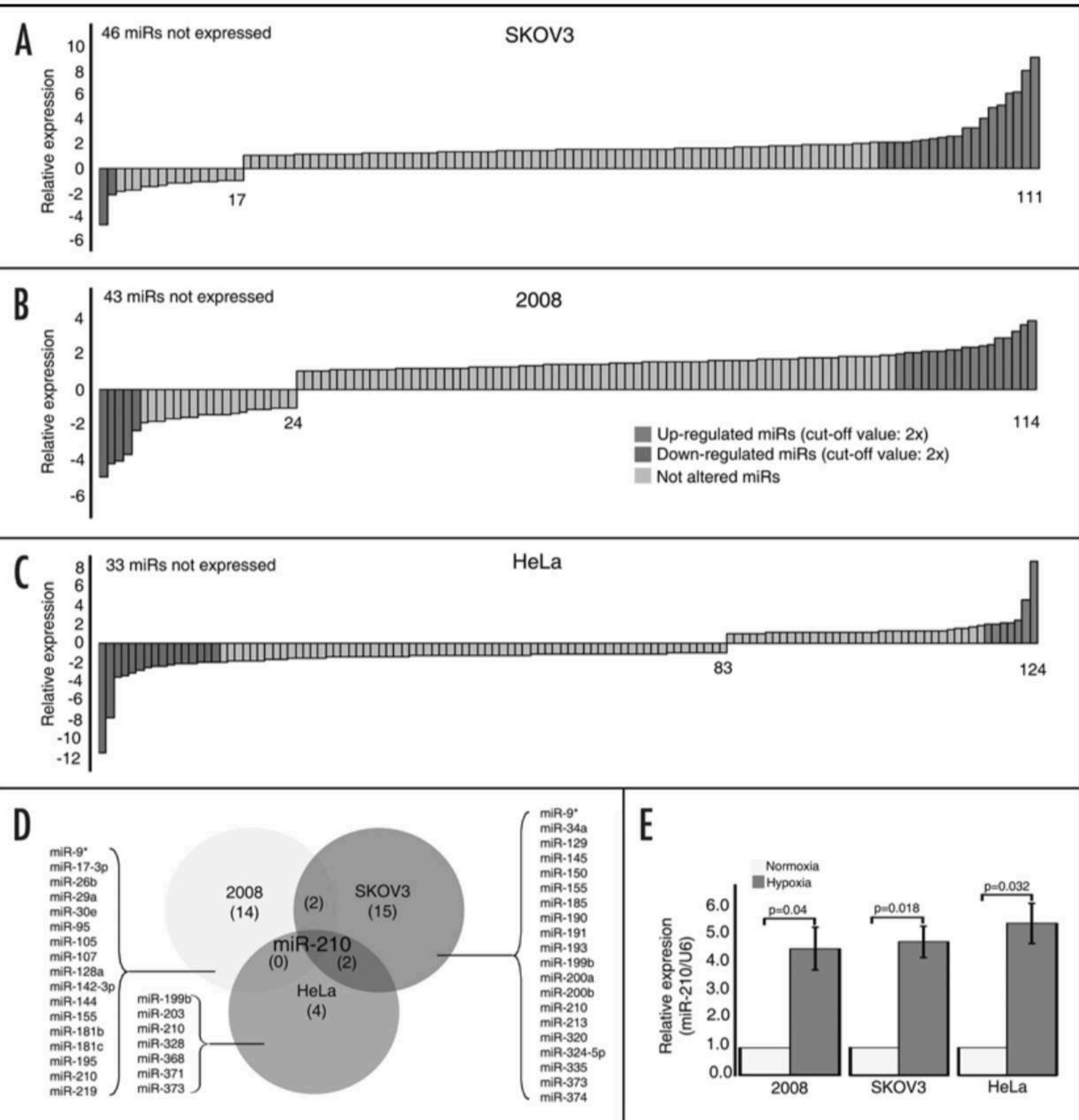
<sup>1</sup>Center for Research on Early Detection and Cure of Ovarian Cancer; <sup>2</sup>Department of Obstetrics and Gynecology; <sup>3</sup>Abramson Family Cancer Research Institute; University of Pennsylvania School of Medicine; Philadelphia, Pennsylvania USA; <sup>4</sup>Department of Obstetrics and Gynecology; University of Turin; Turin, Italy; <sup>5</sup>Laboratory of Gene Expression, Molecular Diagnostics and Modern Therapeutics; Department of Molecular Biology and Genetics; Democritus University of Thrace; Alexandroupolis, Greece

†Current affiliation: Translational Medicine and Genetics at GlaxoSmithKline; King of Prussia, Pennsylvania USA

**Key words:** microRNA, hypoxia, ovarian cancer

---

# Evidence for HIF-dependent induction of miR-210

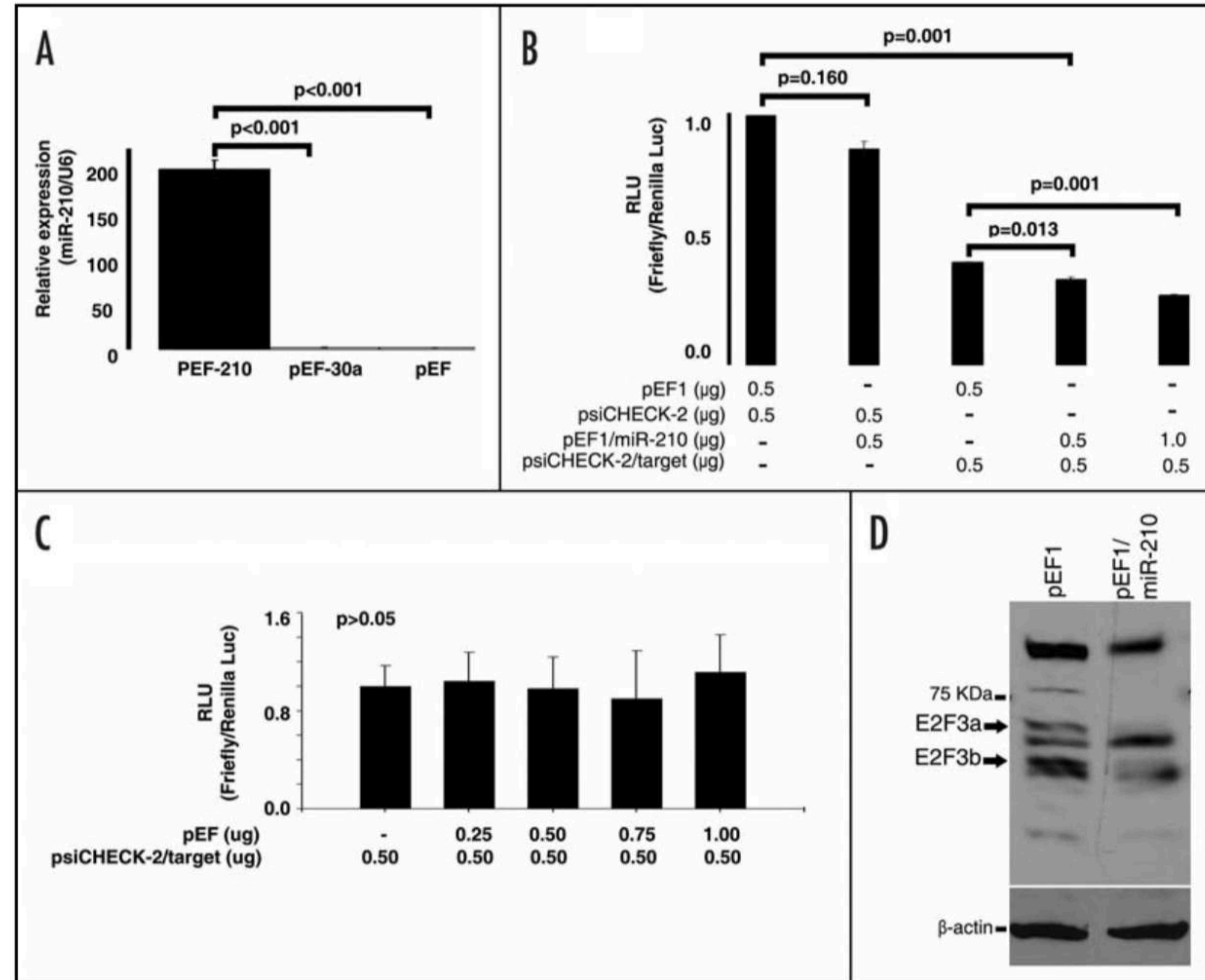
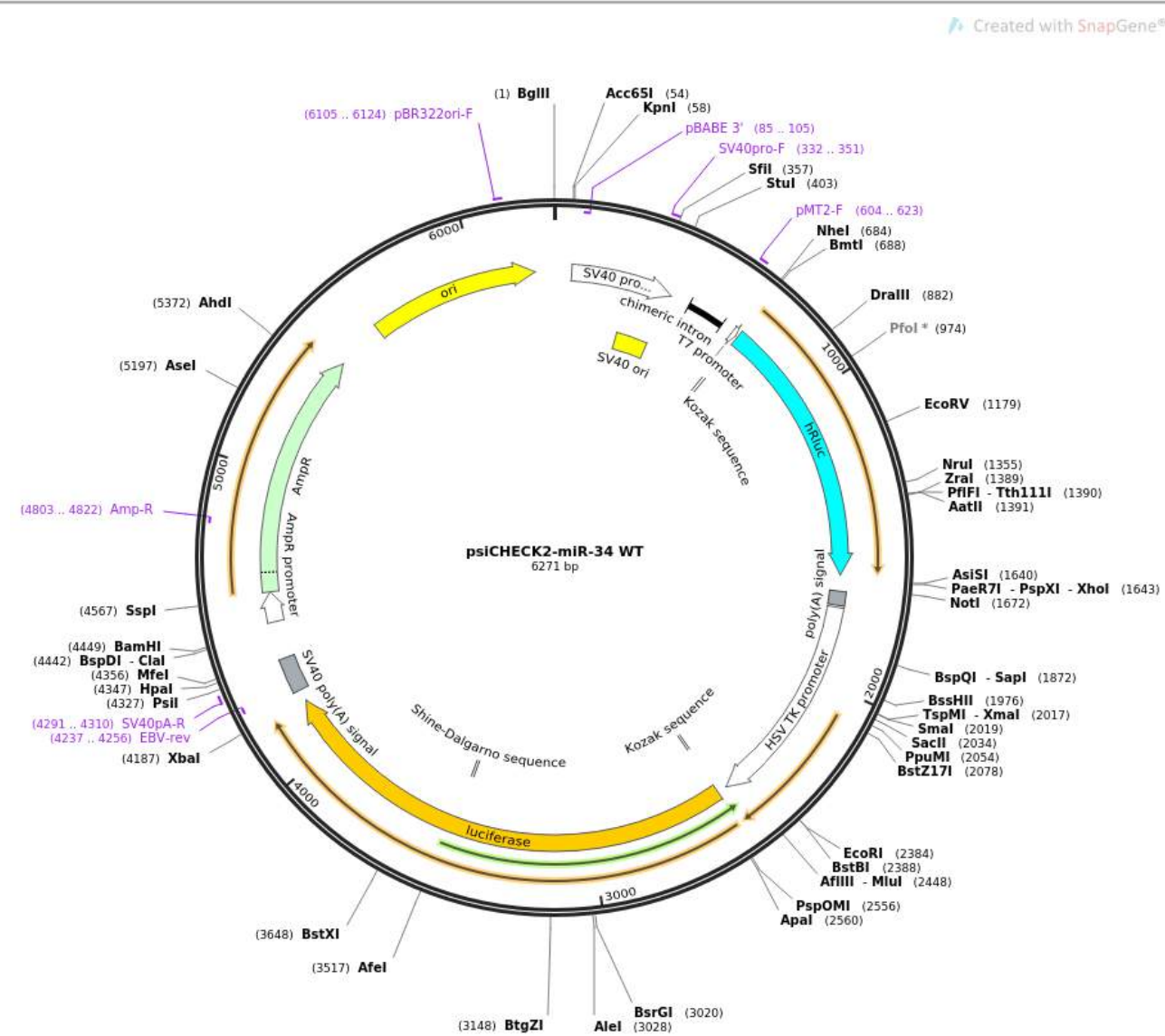


HIF-1 and HIF-2 factors are constitutively active in the RCC4 but not in the RCC4 (T3/14) cell line. The relative quantity of miR-210 was estimated using the DDcT method by normalizing to endogenous U6

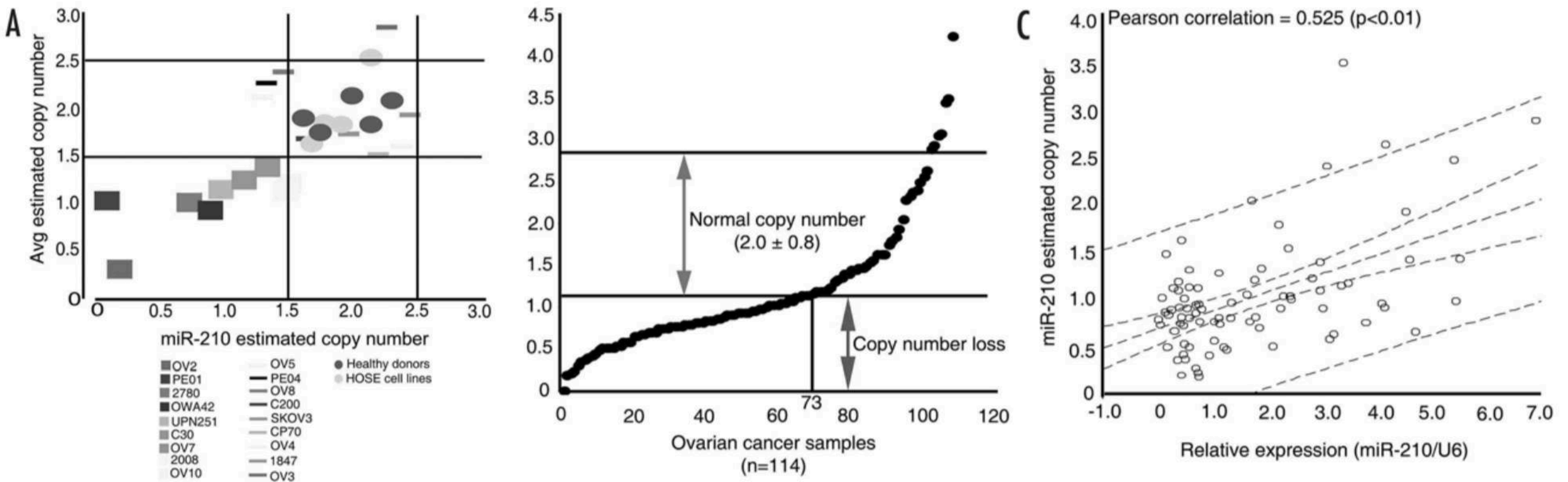
# *e2f3* was the direct target of miR-210

Table 2 GOstat analysis of the biological processes that miR-210-predicted target genes are principally involved in.

GO Number	miR-210 Targets	GO Category	P-Value
GO:0019222	33	regulation of metabolic process	4.35E-09
GO:0050794	41	regulation of cellular process	6.04E-09
GO:0031323	29	regulation of cellular metabolism	1.90E-06
GO:0019219	27	regulation of nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	1.04E-05
GO:0006350	27	transcription	1.82E-05
GO:0006351	25	transcription, DNA-dependent	1.95E-05
GO:0032774	25	RNA biosynthetic process	1.95E-05
GO:0045449	26	regulation of transcription	1.95E-05
GO:0048869	20	cellular developmental process	2.69E-05
GO:0030154	20	cell differentiation	2.69E-05
GO:0048468	17	cell development	3.35E-05
GO:0006355	24	regulation of transcription, DNA-dependent	3.78E-05
GO:0043231	45	intracellular membrane-bound organelle	3.97E-05
GO:0043227	45	membrane-bound organelle	3.97E-05
GO:0048519	15	negative regulation of biological process	6.28E-05
GO:0016070	27	RNA metabolic process	6.28E-05
GO:0005634	35	nucleus	7.22E-05



# Frequent miR-210 gene copy loss in ovarian cancer



- <http://www.mirbase.org/>
- [http://www.targetscan.org/vert\\_72/](http://www.targetscan.org/vert_72/)
- [http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?  
r=microT\\_CDS/index](http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=microT_CDS/index)