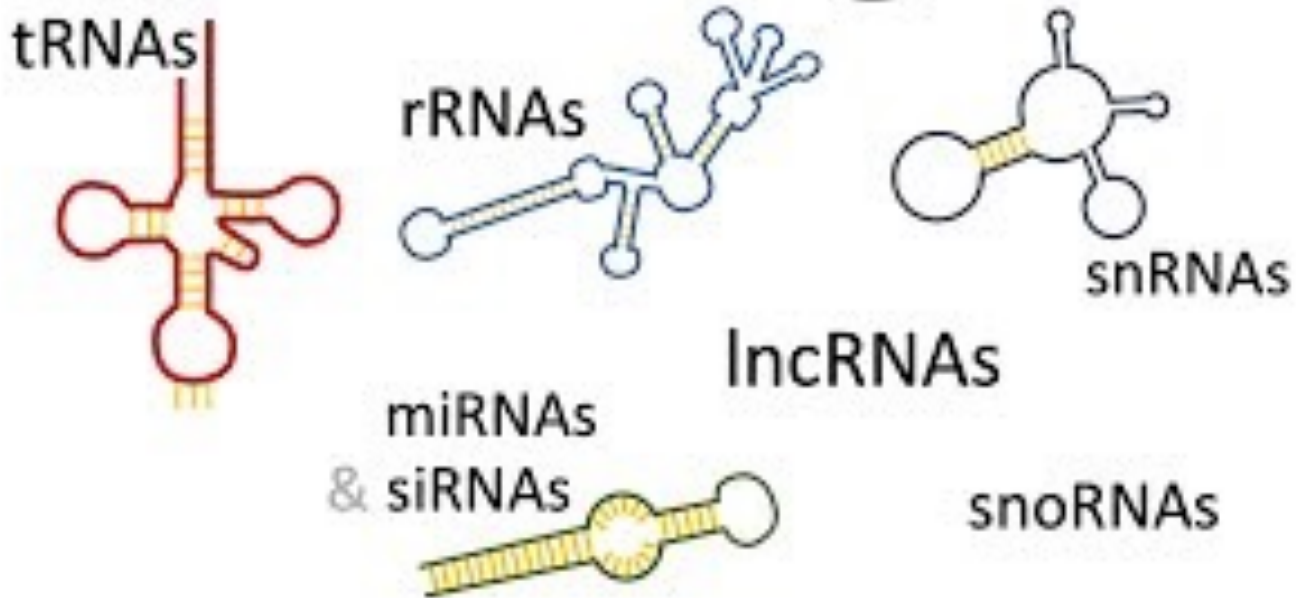


# I microRNA

C. Mannironi  
a.a. 2021-2022

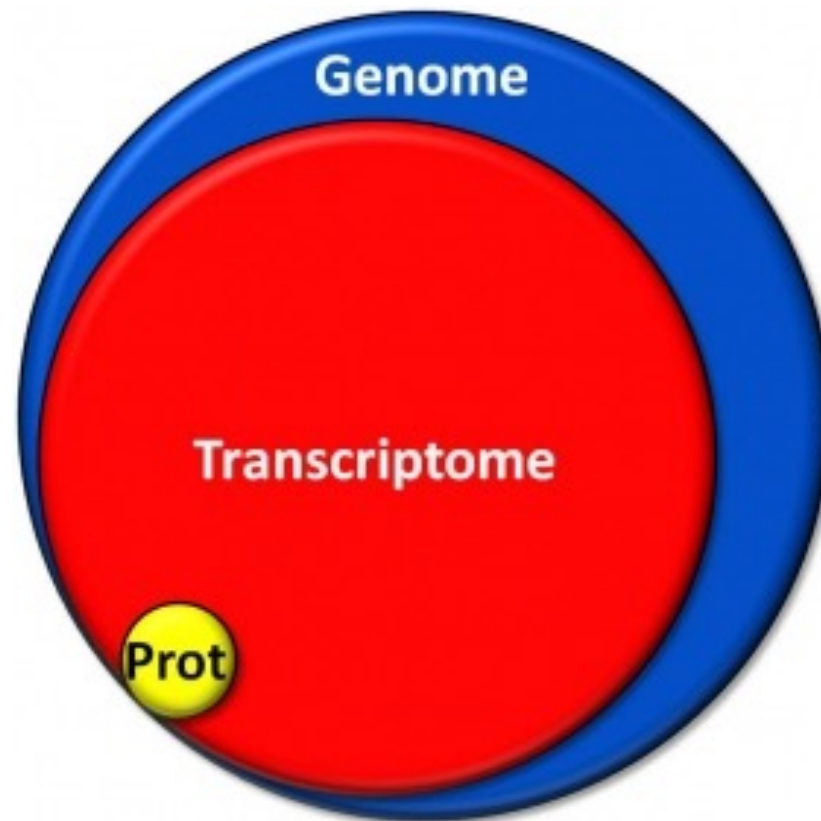
I microRNA sono piccoli RNA non codificanti

# Non-coding RNA



Lnc: long non coding RNA

Piu' del 90% del genoma umano è trascritto in RNA



ma solo l'1.5-2% di questo codifica per proteine

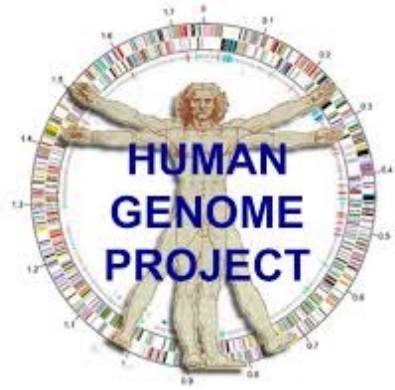
E' considerato ora gene una sequenza di DNA codificante e non codificante per proteine

Il genoma dei mammiferi è costituito prevalentemente da DNA non codificante

DNA non codificante

DNA  
codificante per  
proteine (meno  
del 2% del  
nostro genoma)

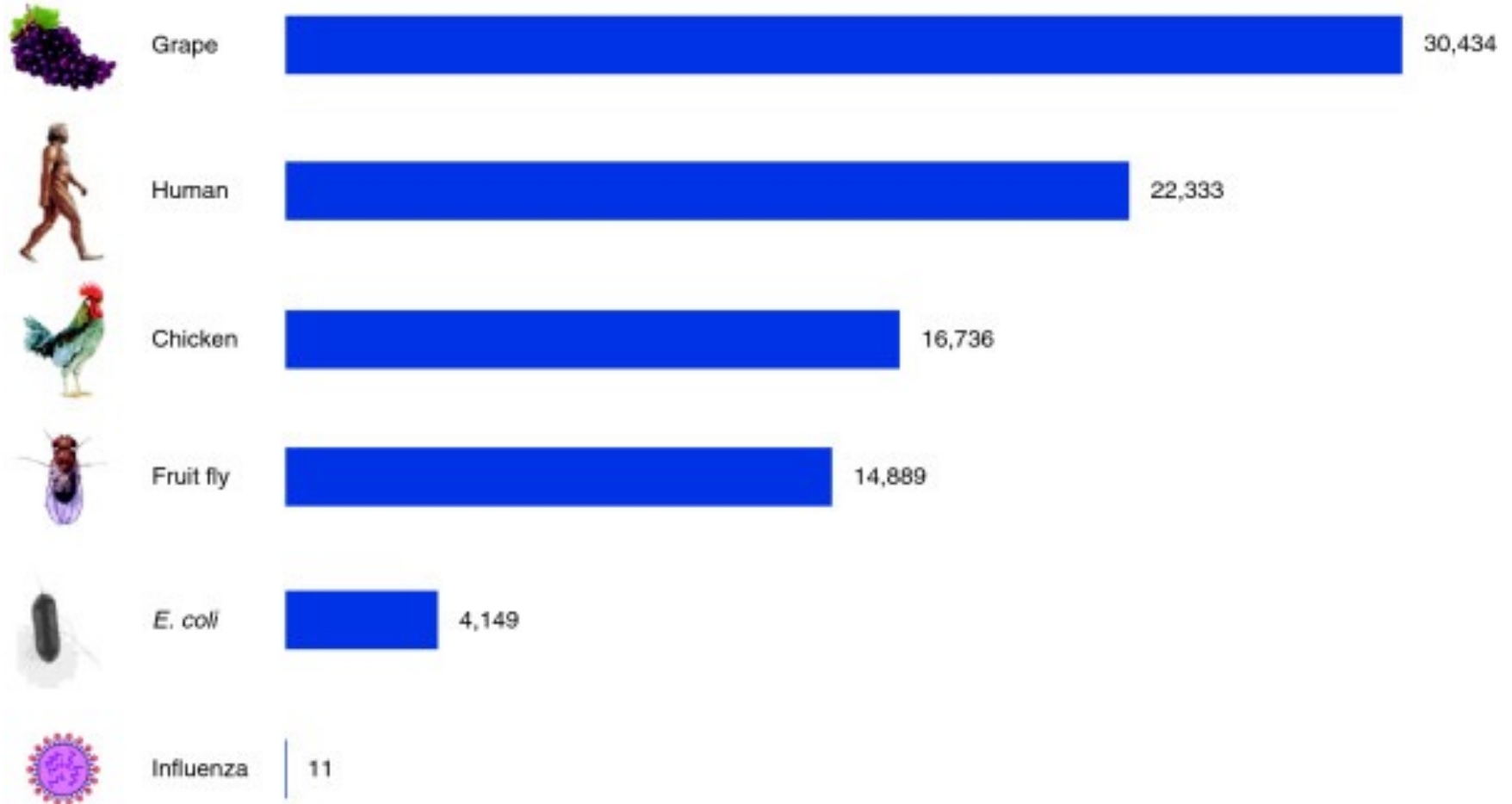




Il 'Progetto genoma umano', completato nell'aprile del 2003, ha dimostrato che il numero dei nostri geni codificanti è molto piu' basso dell'atteso



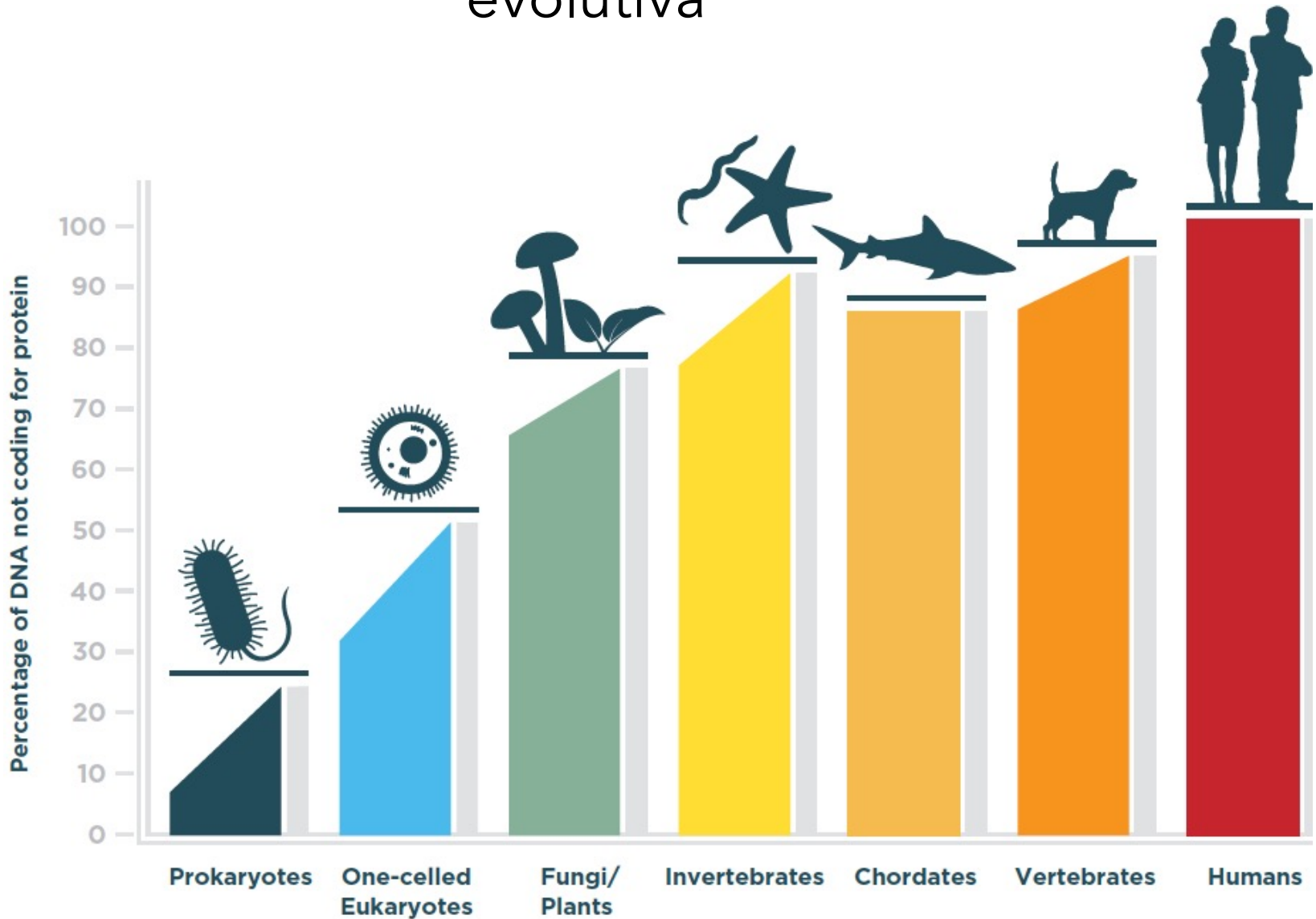
Dall'analisi comparative del genoma di diversi organismi è risultato che noi stiamo tra il pollo e l'uva



Se il numero dei geni non correla con la complessita'  
di un organismo dov'è contenuta l'informazione che  
programma la nostra complessita'?

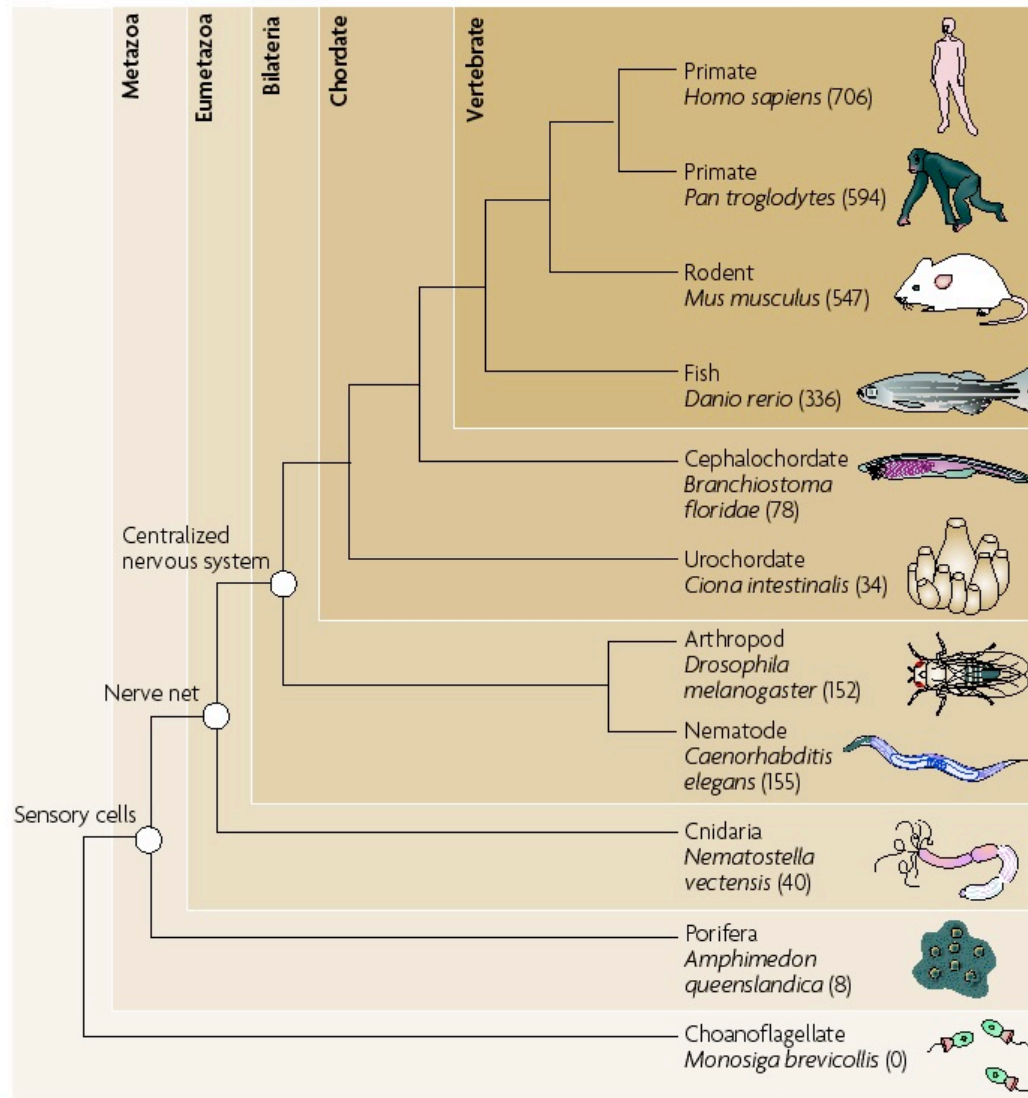


Nel genoma la quantita' relativa del DNA non codificante aumenta con la complessita' evolutiva

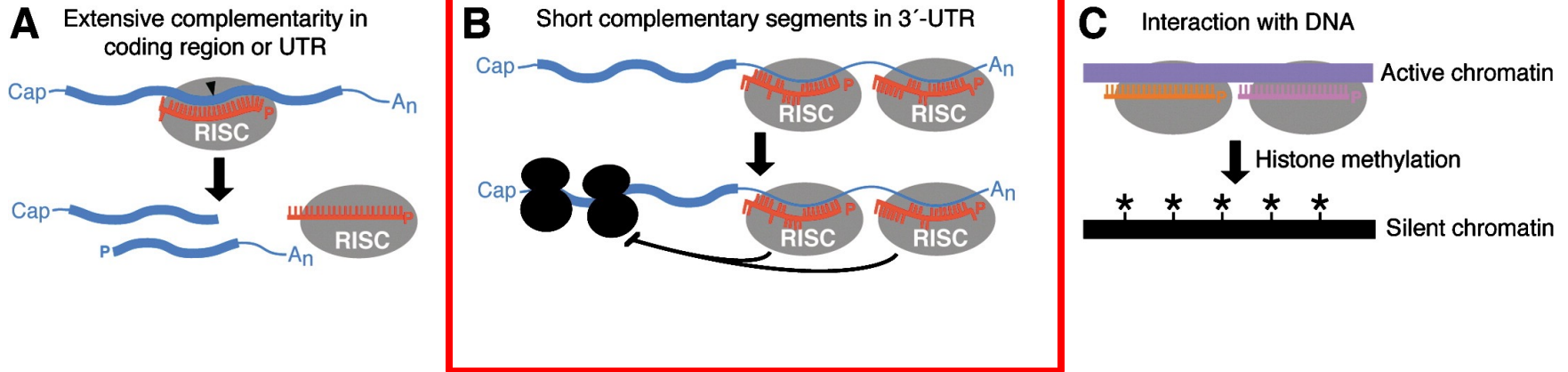




# Il numero dei miRNA espressi da una data specie aumenta con la complessita' morfologica ed evolutiva



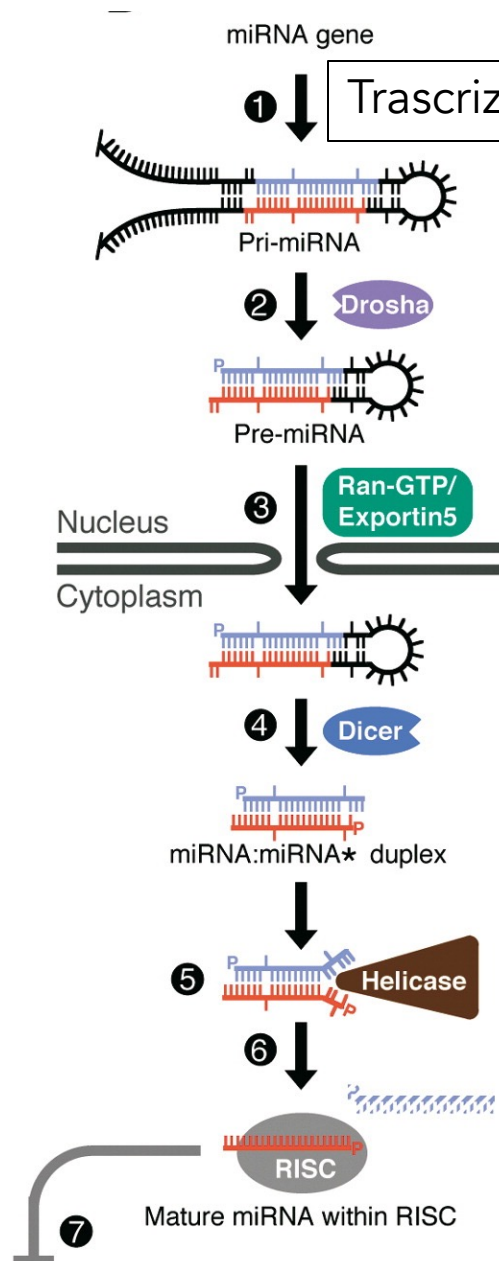
# I microRNA sono piccoli RNA silenziatori



Bartel, 2004

I microRNA (miRNA) sono piccoli ncRNA , lunghi 19-23 nt

# BIOGENESI dei miRNA



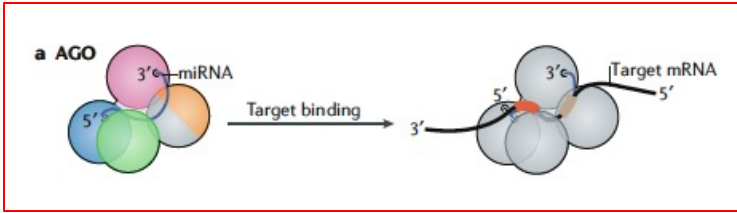
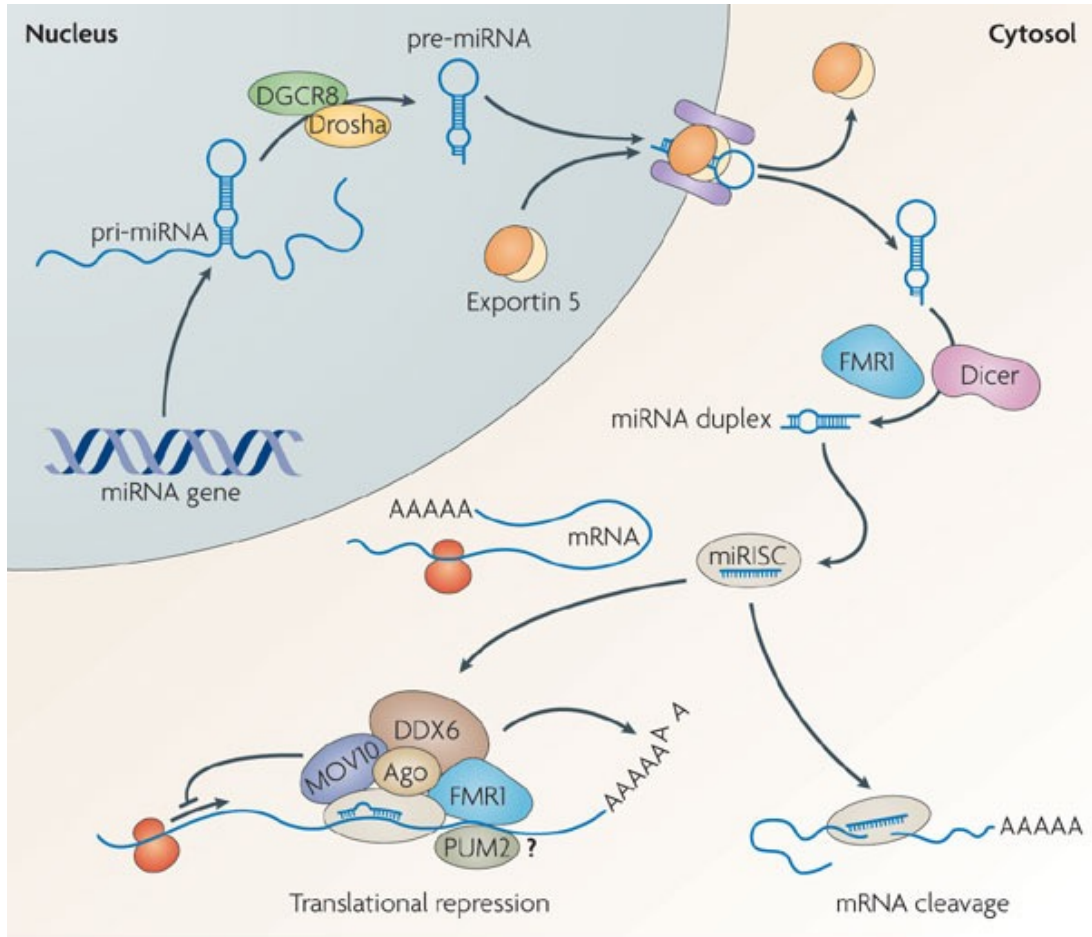
1° taglio da parte del Microprocessore

2° taglio da parte di Dicer

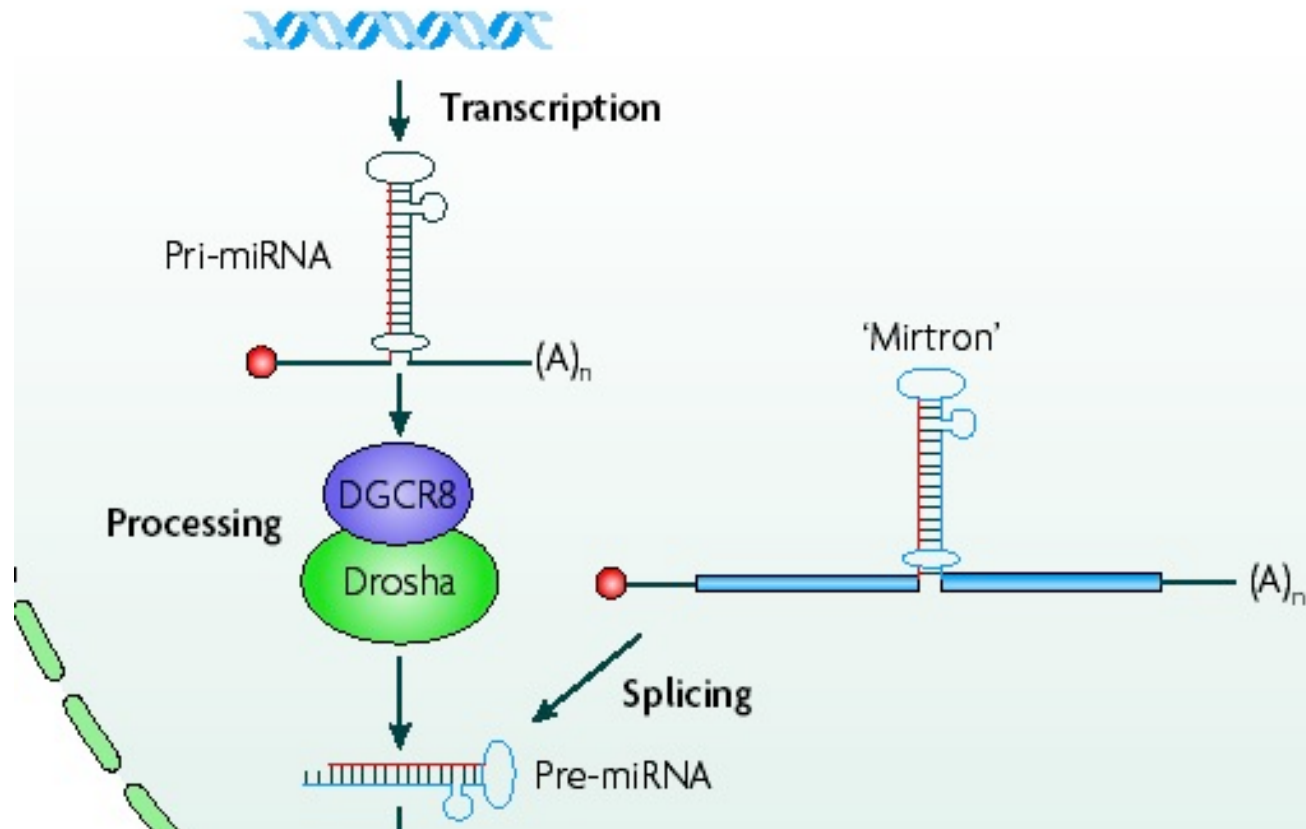
Caricamento di uno dei 2 filamenti nel complesso RISC

*miRISC: miRNA-induced silencing complex*

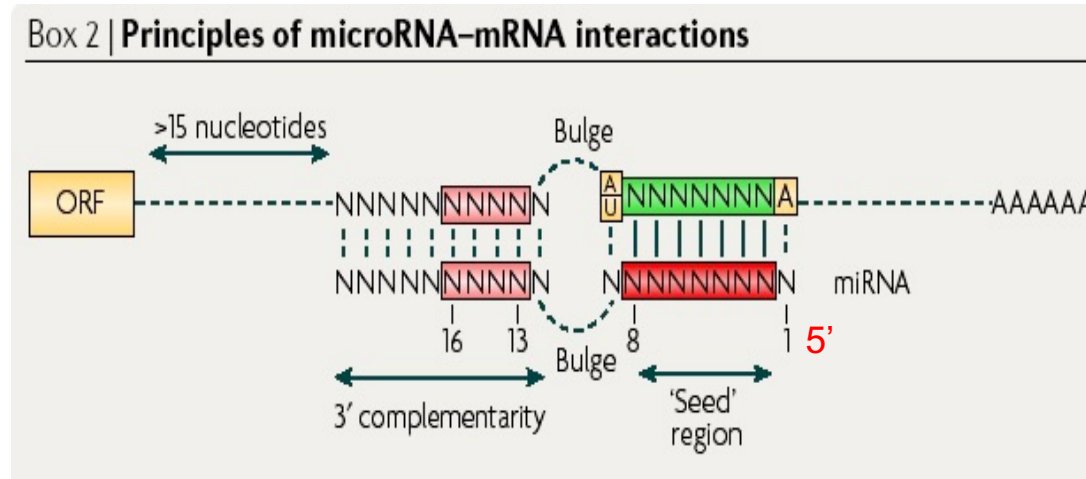
# ....BIOGENESI dei miRNA



I geni dei microRNA possono essere unita' geniche indipendenti o far parte di geni codificanti per un mRNA



# Interazione miRNA:mRNA target



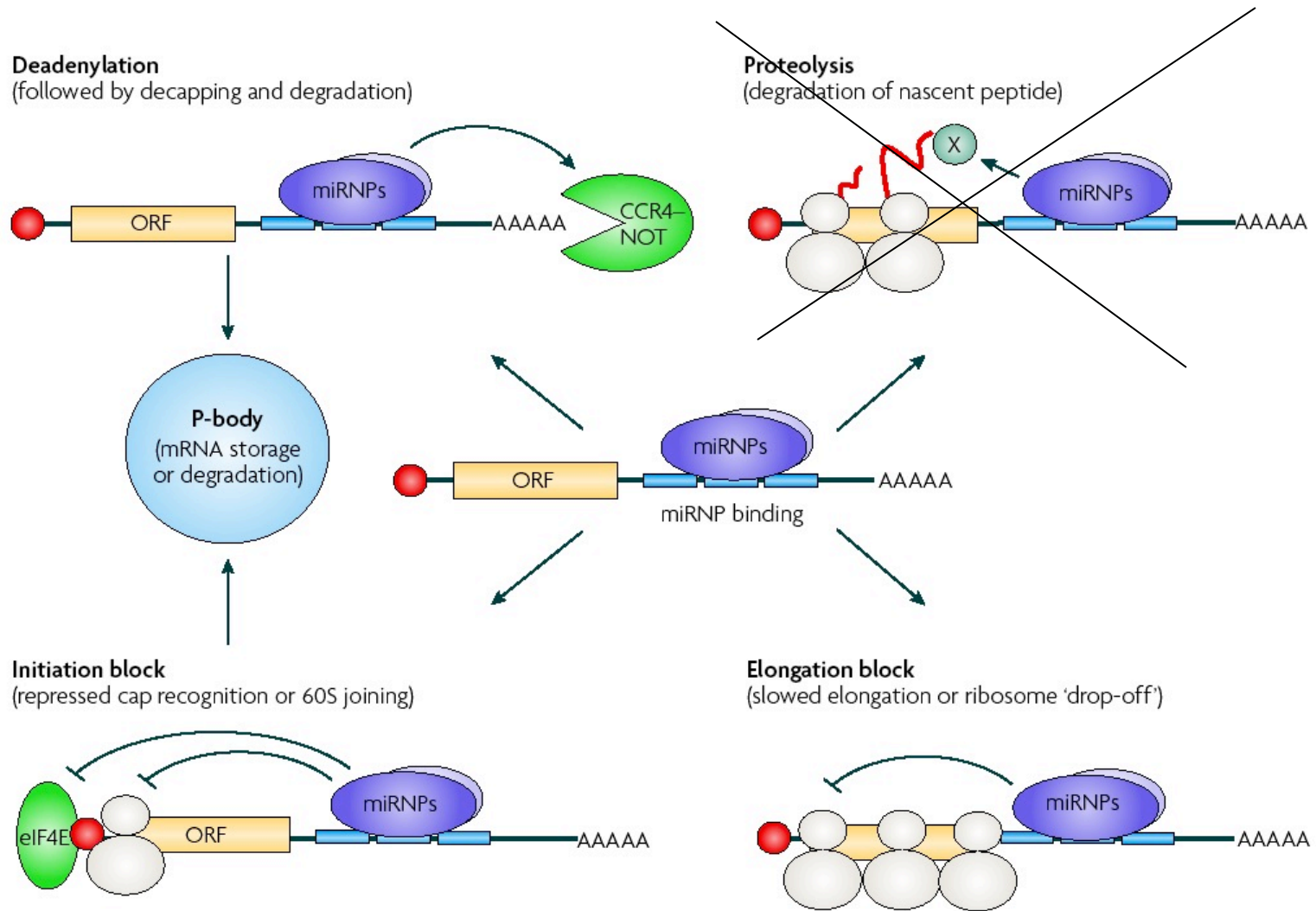
I miRNAs interagiscono con l'RNA target per complementarità di sequenza di 7 o più nucleotidi presenti nell'estremità 5' (sequenza seed). Altre regioni di complementarità con l'RNA target possono essere presenti nella regione al 3' del miRNA.

Nei mammiferi i miRNA più comunemente riconoscono sequenze presenti nella 3'UTR dell'mRNA, talvolta nella 5'UTR o ORF.

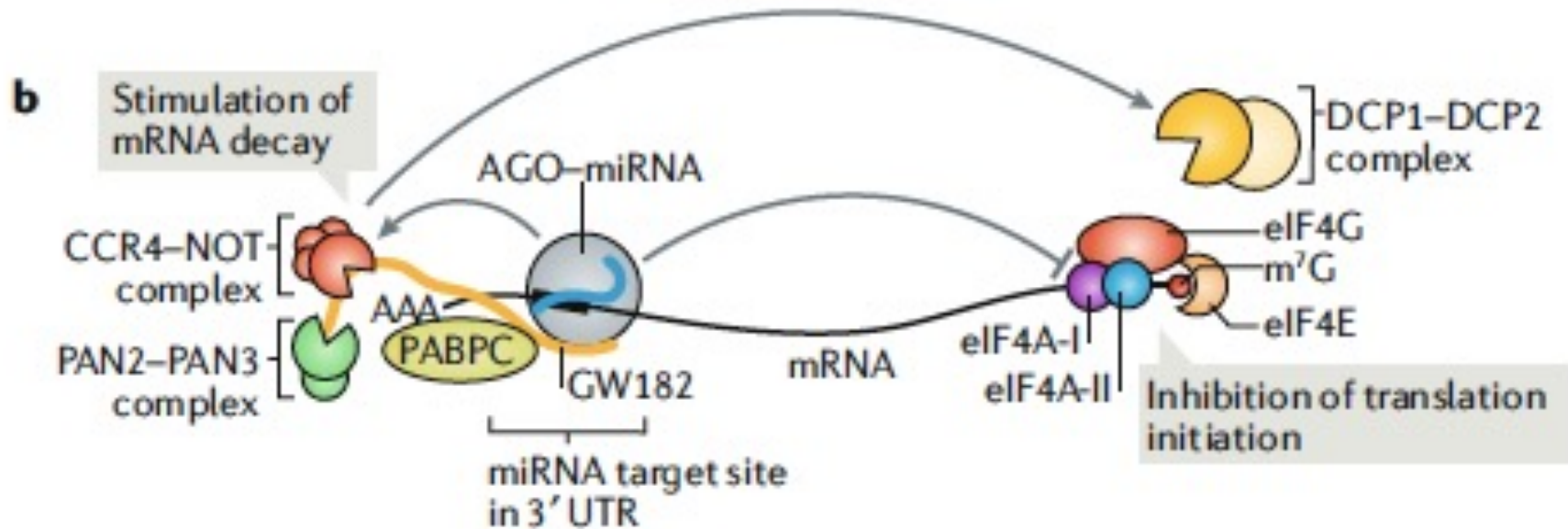
I miRNA funzionano come molecole guida nel silenziamento dell'RNA messaggero.

RNA target dei miRNA non sono solo mRNA ma anche lncRNA ed RNA circolari.

# Mechanisms of miRNA mediated gene silencing



## Mechanisms of miRNA mediated gene silencing



*miRNAs silence gene expression by inhibiting translation at the initiation step, through release of eukaryotic initiation factor eIF4A-I and eIF4A-II, and by mediating mRNA decay through interactions with GW182 proteins. GW182 binds polyadenylate-binding protein (PABPC), the deadenylation complexes poly(A)-nuclease deadenylation complex subunit 2 (PAN2)-PAN3 and carbon catabolite repressor protein 4 (CCR4)-NOT. Deadenylation is followed by decapping by the complex mRNA-decapping enzyme subunit 1 (DCP1)-DCP2 and 5'-3' mRNA degradation*



# miRBase

Il database miRBase ([www.mirbase.org/](http://www.mirbase.org/)) è una banca dati, continuamente aggiornato e consultabile online, contenente le sequenze dei miRNA identificati in 271 organismi diversi.

Ora v.22!

## miRBase: from microRNA sequences to function

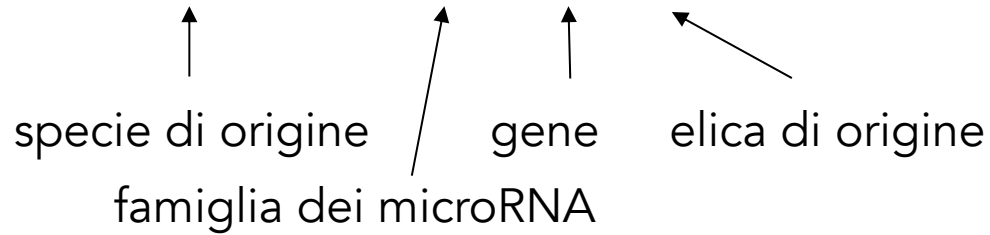
Ana Kozomara, Maria Birgaoanu, Sam Griffiths-Jones 

*Nucleic Acids Research*, Volume 47, Issue D1, 08 January 2019, Pages D155–D162, <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>

**Published:** 13 November 2018 **Article history** ▼

Un po' di nomenclatura  
Es. mir-124

# hsa-miR-124-1-3p



miR-124/mir-124-1-3p

uaaggcacgcgugaaugccaa

stem-loop



mir-124-5p è anche indicato mir-124\*  
forma meno abbondante non identificata per prima

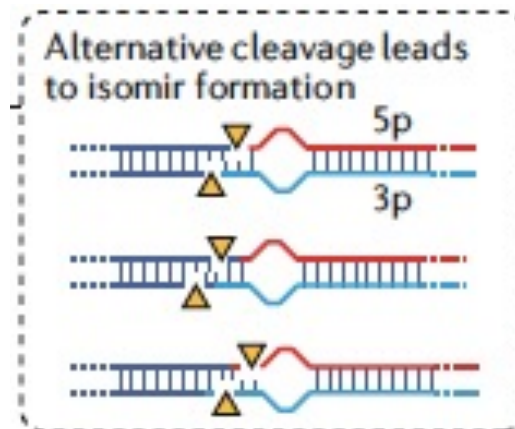


## Iso-miRNA

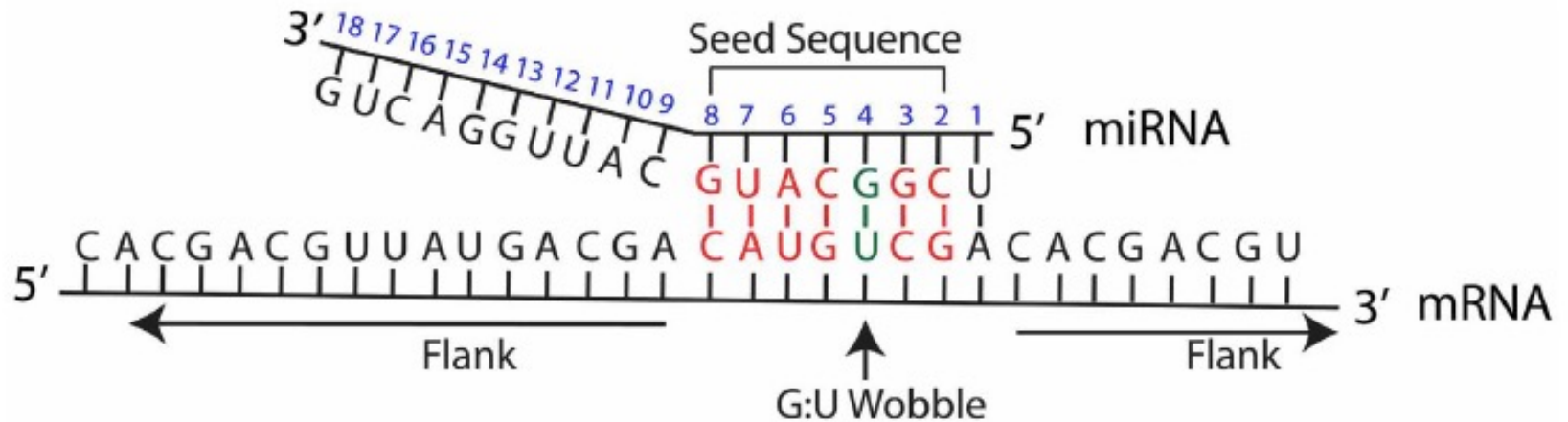
miRNA appartenenti alla stessa famiglia (es famiglia hsa-mir-34) che differiscono per singoli nucleotidi e condividono la regione seed .

hsa-mir-34a/hsa-miR-34a-5p **U**GGCAGUGUC UUAGCUGGUUG**U**  
hsa-mir-34b/hsa-miR-34b-5p **U**AGGCAGUGUC**A**UUAGCUGAUUG  
hsa-mir-34c/hsa-miR-34c-5p **A**GGCAGUG**U**AGUUAGCUGAUUG**C**

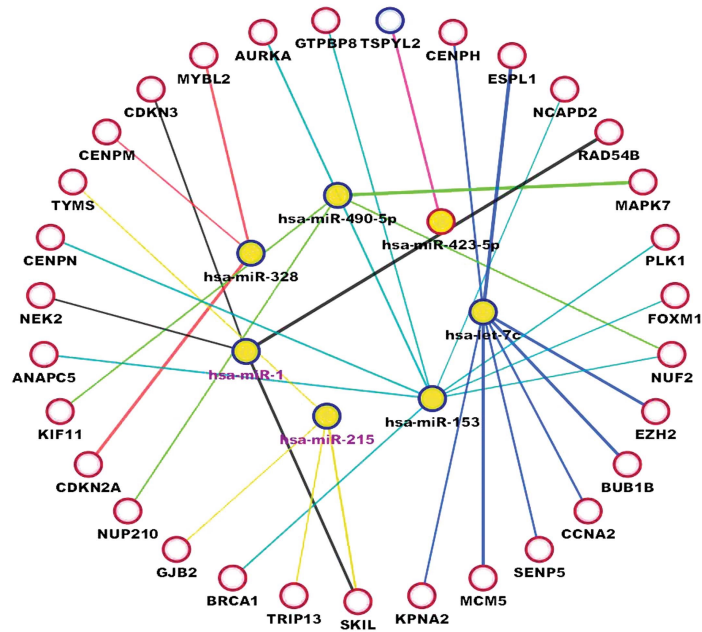
Spesso l'eterogeneità è alle estremità 5' o 3' ed è generata nel processo di maturazione da parte di Drosha



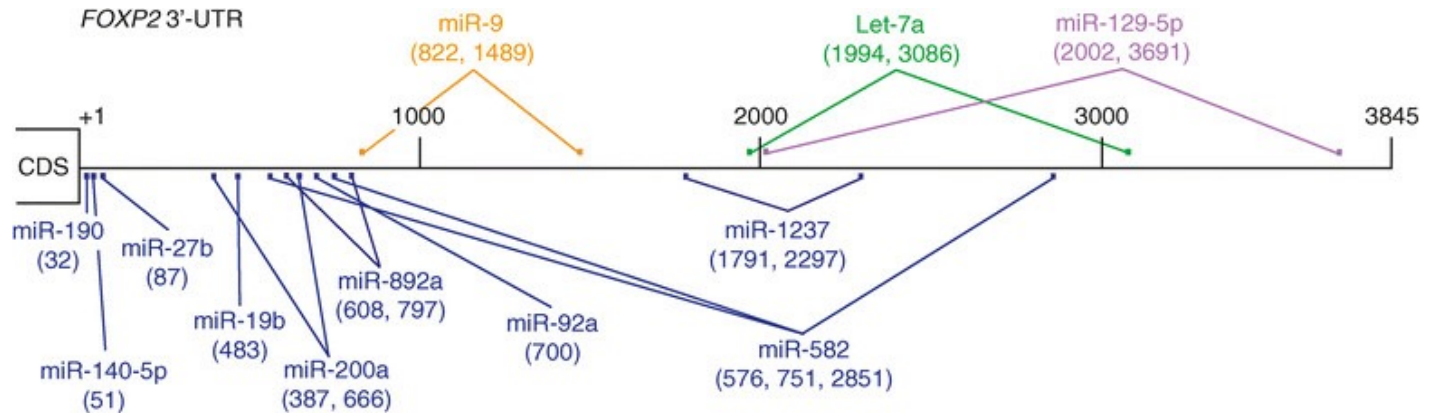
I miRNA regolano ca il 50% dei geni cellulari e potenzialmente ca il 75% di tutti i geni



Un singolo miRNA ha decine/centinaia di RNA target

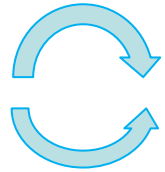


un RNA è regolato da diversi miRNA



Step fondamentale nello studio di un'interazione mRNA:RNA è la predizione computazionale di quali sulla carta possono essere i target di un dato miRNA

Algoritmi di predizione di RNA target per un dato miRNA



Algoritmi di predizione per un dato RNA di miRNA interattori

Diversi algoritmi di predizione sono stati elaborati e sono ora disponibili sul web.







## Principali algoritmi di predizione

TARGETSCAN <http://www.targetscan.org>

miRANDA <http://www.microrna.org/>

DIANA-microT-CDS <http://www.microrna.gr/microT-CDS>

rna22-GUI <https://cm.jefferson.edu/rna22v1.0/>

miRDB (<http://mirdb.org/mirdb/index.html>)

.....

Predizione mediante TARGETSCAN di:

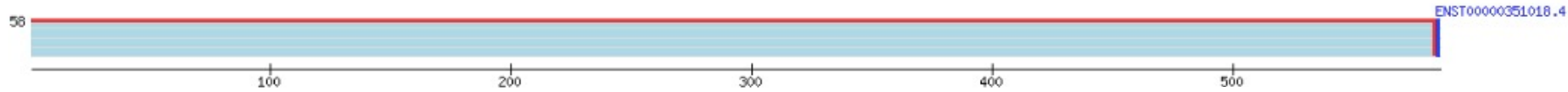
1. RNA target per hsa-mir-124-3p
2. potenziali interazioni tra il mir-124-3p e l'mRNA di Rhog
3. potenziali interazioni tra l'mRNA di Rhog e miRNA

# 1. Predizione mediante TARGETSCAN di RNA target per hsa-mir-124-3p <http://www.targetscan.org>

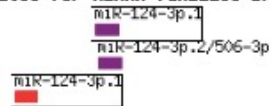
| Target gene | Representative transcript<br>ENST0000... | Gene name   | Number of 3P-seq tags supporting UTR + 5 | Link to sites in UTRs        | Conserved sites |      |         |         | Poorly conserved sites |      |         |         | 6mer sites | Representative miRNA | Predicted occupancy |            |                   | Cumulative weighted context++ score | Total context++ score | Aggregate PCT |
|-------------|--|---|--|------------------------------|-----------------|------|---------|---------|------------------------|------|---------|---------|------------|----------------------|---------------------|------------|-------------------|-------------------------------------|-----------------------|---------------|
|             |  |   |  |                              | total           | 8mer | 7mer-m8 | 7mer-A1 | total                  | 8mer | 7mer-m8 | 7mer-A1 |            |                      | mod miRNA           | high miRNA | transfected miRNA |                                     |                       |               |
| RHOG        | 0351018.4                                | ras homolog family member G   | 58                                       | <a href="#">Sites in UTR</a> | 2               | 1    | 1       | 0       | 2                      | 0    | 2       | 0       | 1          | hsa-miR-124-3p.1     | 0.1987              | 0.9602     | 2.3826            | -1.44                               | -1.44                 | 0.91          |
| CTDSP1      | 0273062.2                                | CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) small phosphatase 1 | 1299                                     | <a href="#">Sites in UTR</a> | 4               | 0    | 4       | 0       | 1                      | 0    | 0       | 1       | 3          | hsa-miR-124-3p.1     | 0.4307              | 1.7791     | 3.6452            | -1.37                               | -1.37                 | > 0.99        |
| SNAI2       | 0020945.1                                | snail family zinc finger 2  | 1233                                     | <a href="#">Sites in UTR</a> | 3               | 1    | 2       | 0       | 0                      | 0    | 0       | 0       | 0          | hsa-miR-124-3p.1     | 0.4021              | 1.4802     | 2.5842            | -1.28                               | -1.28                 | > 0.99        |
| LRRRC58     | 0295628.3                                | leucine rich repeat containing 58   | 940                                      | <a href="#">Sites in UTR</a> | 3               | 3    | 0       | 0       | 0                      | 0    | 0       | 0       | 1          | hsa-miR-124-3p.1     | 0.6746              | 2.0599     | 3.0400            | -1.16                               | -1.18                 | > 0.99        |

## 2. Predizione mediante TARGETSCAN di potenziali interazioni tra il mir-124-3p e l'mRNA di Rhog

Human RHOG ENST00000351018.4 3' UTR length: 585



Conserved sites for miRNA families broadly conserved among vertebrates



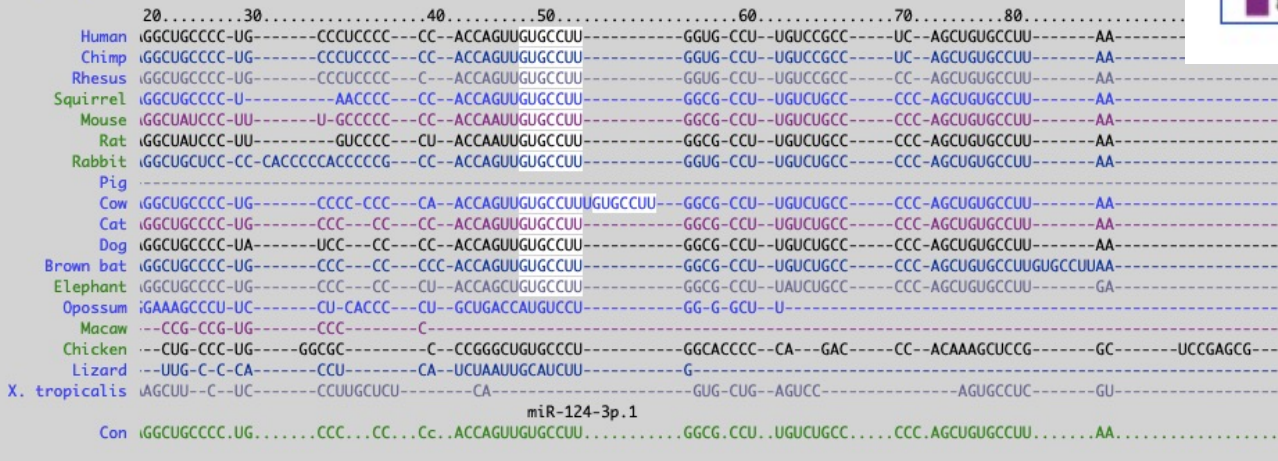
**Key:**

Sites with higher probability of preferential conservation

- 8mer (purple)
- 7mer-m8 (red)
- 7mer-A1 (blue)

Sites with lower probability of preferential conservation

- 8mer (purple)
- 7mer-m8 (red)
- 7mer-A1 (blue)

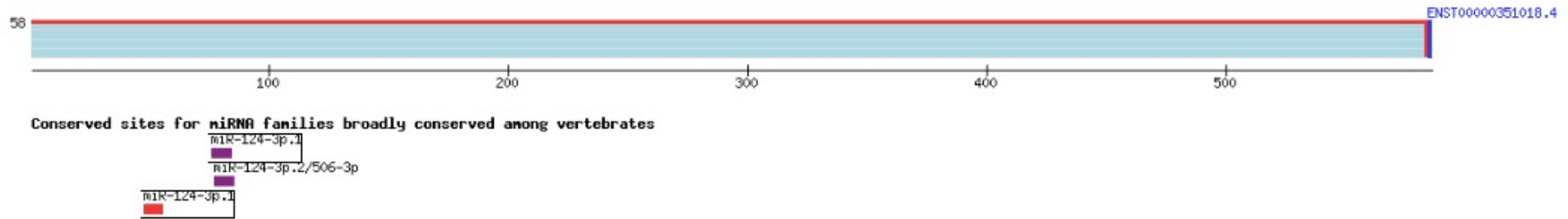


### Conserved

|                               | Predicted consequential pairing of target region (top) and miRNA (bottom) | Site type | Context++ score | Context++ score percentile | Weighted context++ score | Conserved branch length | P <sub>CT</sub> | Predicted relative K <sub>D</sub> |
|-------------------------------|---|-----------|-----------------|----------------------------|--------------------------|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|
| Position 48-54 of RHOG 3' UTR | 5' ... CUCCCCCACCAGUUGGCCUUG ...<br>                                      | 7mer-m8   | -0.30           | 95                         | -0.30                    | 3.553                   | 0.65            | -4.738                            |
| hsa-miR-124-3p.1              | 3' CCGUAAGUGGCG--CACGGAAU   |           |                 |                            |                          |                         |                 |                                   |
| Position 76-83 of RHOG 3' UTR | 5' ... UUGUCCGCCUCAGCU-GUGCCUUA ...<br>                                   | 8mer      | -0.57           | 99                         | -0.57                    | 3.433                   | 0.73            | -5.574                            |

# 3. Predizione mediante TARGETSCAN di potenziali interazioni tra miRNA e l'mRNA di Rhog

Human RHOG ENST00000351018.4 3' UTR length: 585



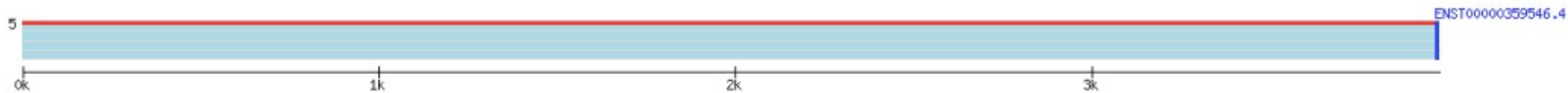
# Predizione mediante TARGETSCAN di potenziali interazioni tra miRNA e l'mRNA di Cplx2 (complexina2)



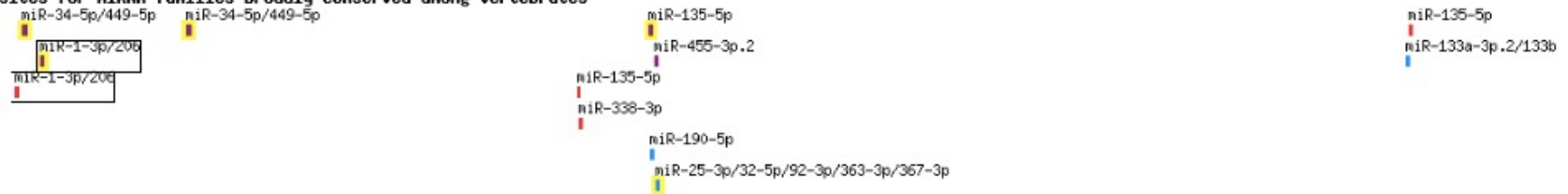
**Representative (most prevalent) transcript for CPLX2 (ENSG00000145920.10):**  
supported by 0 3P-seq tag: [ENST00000359546.4](#) 3975 nt

Less prevalent transcript for CPLX2 (ENSG00000145920.10):  
supported by 0 3P-seq tags: [ENST00000512824.1](#) 89 nt

**Human CPLX2 ENST00000359546.4 3' UTR length: 3975**



**Conserved sites for miRNA families broadly conserved among vertebrates**



# Database di interazioni miRNA:mRNA validate sperimentalmente

**miRTarBase:** The experimentally validated microRNA-target interactions database  
 ([https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase\\_2022/php/index.php](https://mirtarbase.cuhk.edu.cn/~miRTarBase/miRTarBase_2022/php/index.php))

Esempio: mmu-mir-124

| ID  | Species (miRNA) | Species (Target) | miRNA          | Target | Validation methods |              |      |                      |     |        |       |          | Sum | # of papers |
|--|-----------------|------------------|----------------|--------|--------------------|--------------|------|----------------------|-----|--------|-------|----------|-----|-------------|
|  |                 |                  |                |        | Strong evidence    |              |      | Less strong evidence |     |        |       |          |     |             |
|  |                 |                  |                |        | Reporter assay     | Western blot | qPCR | Microarray           | NGS | pSILAC | Other | CLIP-Seq |     |             |
| MIRT000005   | Mus musculus    | Mus musculus     | mmu-miR-124-3p | Itgb1  | ✓                  | ✓            | ✓    | ✓                    |     |        | ✓     |          | 5   | 2           |
| MIRT000360   | Homo sapiens    | Homo sapiens     | hsa-miR-124-3p | SOX9   |                    |              |      |                      | ✓   |        | ✓     |          | 2   | 3           |



Database di meta-analisi, che forniscono previsioni d'interazione miRNA:siti di legame predetti da algoritmi multipli e validati sperimentalmente

## Esempio di miRWalk

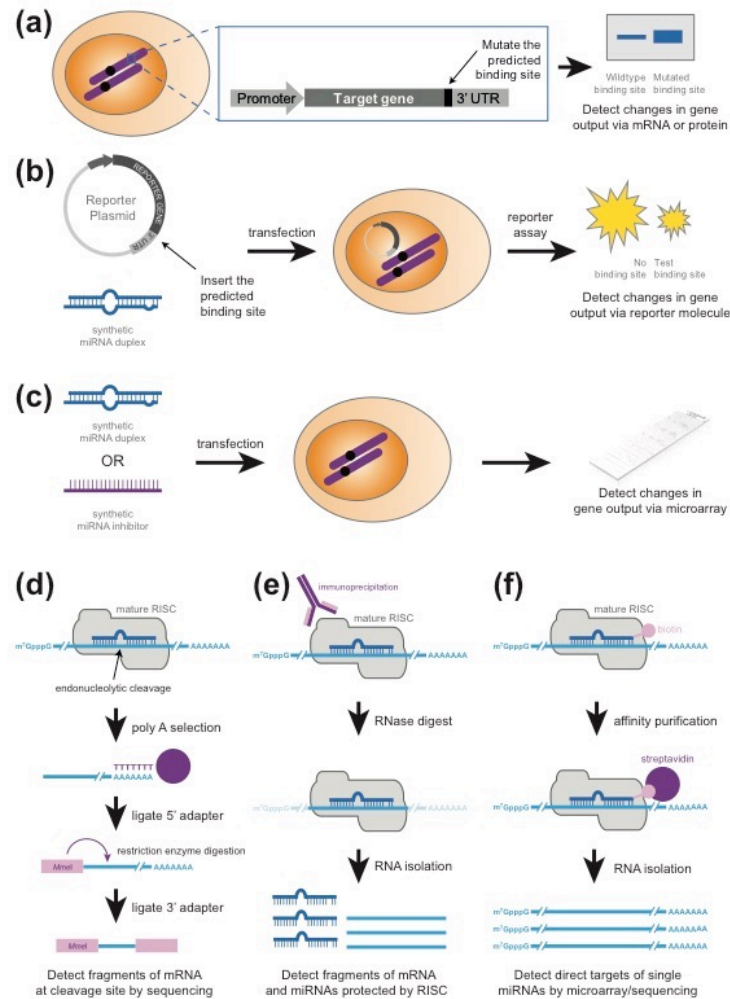


*miRwalk is an open-source platform providing an intuitive interface that generates predicted and validated miRNA-binding sites of known genes of human mouse rat dog and cow*

| Details         |                                |
|-----------------|--------------------------------|
| <b>Mirnaid</b>  | <a href="#">hsa-miR-124-3p</a> |
| <b>Mimatid</b>  | <a href="#">MIMAT0000422</a>   |
| <b>Sequence</b> | UAAGGCACGCGGUGAAUGCCAA         |

| Interactions                   |                              |                         |                         |                    |                       |                           |                 |                 |                         |                        |                    |                         |
|--------------------------------|------------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------|-----------------------|---------------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|------------------------|--------------------|-------------------------|
| Mirna <sup>△</sup>             | Refseqid <sup>△</sup>        | Genesymbol <sup>△</sup> | Duplex <sup>△</sup>     | Score <sup>▽</sup> | Position <sup>△</sup> | Binding Site <sup>△</sup> | Au <sup>△</sup> | Me <sup>△</sup> | N Pairings <sup>△</sup> | Targetsan <sup>△</sup> | Mirdb <sup>△</sup> | Mirtarbase <sup>△</sup> |
| <a href="#">hsa-miR-124-3p</a> | <a href="#">NM_001256424</a> | <a href="#">GUCY1A2</a> | <a href="#">details</a> | 1.00               | CDS                   | 2003,2027                 | 0.54            | -9.339          | 17                      | —                      | —                  | —                       |
| <a href="#">hsa-miR-124-3p</a> | <a href="#">NM_001256420</a> | <a href="#">MAPRE2</a>  | <a href="#">details</a> | 1.00               | 3UTR                  | 1363,1387                 | 0.65            | -8.813          | 17                      | —                      | —                  | —                       |

# Analisi sperimentale per lo studio molecolare e funzionale dell'interazione miRNA/target



# Saggio della Luciferasi per la validazione dell'interazione miRNA/mRNA

