

Predicción *in silico* de miRNAs candidatos que regulan la expresión del gen OGG1 el cual participa en la remoción de la 8-oxo-guanina

In silico prediction of candidate miRNAs regulating expression of the OGG1 gene involved in the removal of 8-oxo-guanine

DOI: 10.46932/sfjdv4n1-012

Received in: December 16th, 2022

Accepted in: January 20th, 2023

Marco Antonio Popoca Cuaya

Doctor en Genética y Biología Molecular

Institución: Universidad Autónoma de Campeche - Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Dirección: Avenida Ing. Humberto Lanz Cárdenas, S/N, Colonia Ex Hacienda Kalá, C.P. 24085

Correo electrónico: mapopoca@uacam.mx

Gerardo Ramón Pineda Nah

Licenciado en Biología

Institución: Universidad Autónoma de Campeche - Facultad de Ciencias Químico Biológicas

Dirección: Avenida Ing. Humberto Lanz Cárdenas, S/N, Colonia Ex Hacienda Kalá, C.P. 24085

Correo electrónico: al044178@uacam.mx

RESUMEN

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son generadas de fuentes exógenas y endógenas, lo que puede ocasionar un daño severo a las macromoléculas celulares, especialmente al ADN. La 8-oxo-7,8-dihidroguanina (8oxoG) se genera por la oxidación de guanina y es la más abundante generada por las ROS, se ha sugerido que desempeña un papel en la mutagénesis y la carcinogénesis. La 8oxoG se elimina del ADN mediante la glicosilasa específica OGG1. Los microRNAs (miRNAs) son oligonucleótidos no codificantes que regulan negativamente un gran número de ARNm blanco modulando así la actividad celular. En este trabajo utilizamos herramientas bioinformáticas para identificar miRNAs candidatos de humano y predecir los miRNAs que potencialmente tendrían un papel en la inhibición del gen OGG1. El análisis con diferentes algoritmos reveló que hsa-miR-3187 y hsa-miR-3918 son candidatos que pudieran regular la expresión del gen al hibridar en la región 5'UTR, por lo que estos se deben analizar de manera experimental.

Palabras clave: miRNAs, 8oxoG, bioinformática, UTR, ARNm.

ABSTRACT

Reactive oxygen species (ROS) are generated from exogenous and endogenous sources, which can cause severe damage to cellular macromolecules, especially DNA. 8-oxo-7,8-dihydroguanine (8oxoG) is generated by the oxidation of guanine and is the most abundant ROS generated, it has been suggested to play a role in mutagenesis and carcinogenesis. 8oxoG is removed from DNA by the specific glycosylase OGG1. MicroRNAs (miRNAs) are non-coding oligonucleotides that negatively regulate a large number of target mRNAs thereby modulating cellular activity. In this work we used bioinformatics tools to identify candidate human miRNAs and predict miRNAs that would potentially play a role in inhibiting the OGG1 gene. Analysis with different algorithms revealed that hsa-miR-3187 and hsa-miR-3918 are candidates that could regulate gene expression by hybridizing in the 5'UTR region, so these should be analyzed experimentally.

Keywords: miRNAs, 8oxoG, bioinformatics, UTR, mRNA.

1 INTRODUCCIÓN

Los radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS) son átomos o moléculas altamente reactivos debido a que poseen uno o más electrones en su capa externa por lo que se pueden comportar como oxidantes o reductores. Los radicales libres se generan tanto de manera endógena como resultado del metabolismo celular y por fuentes exógenas como agua y aire contaminado, tabaco, alcohol, metales pesados, diversas sustancias químicas y radiación. Cantidades excesivas de ROS en la célula causan estrés oxidativo y por el desequilibrio entre los ROS y los antioxidantes (Phaniendra A. *et al.* 2015, Liguori I. *et al.* 2018). Como resultado del estrés oxidativo, las macromoléculas celulares se ven afectadas al ser oxidadas, en el caso de las proteínas, lípidos y ARN dañados son recicladas o degradadas, mientras que el ADN puede ser oxidado en las bases nitrogenadas lo cual puede generar sitiosapurínicos o apirimidínicos o incluso rompimiento de la doble hélice del ADN, estas lesiones pueden ocasionar alteraciones en la regulación de la expresión genética. El ADN dañado desencadena la respuesta al daño del ADN (DDR) la cual es mediada por la transducción de señales para reparar el material genético y así mantener la integridad del genoma o sufrir apoptosis si hay demasiado daño (Carter R.J. y Parsons J.L., 2016, Peluso M. *et al.* 2020).

La 8-oxo-7,8-dihidroguanina comúnmente conocida como 8-oxoguanina (8-oxoG) se forma por la oxidación de la guanina, es una de las lesiones en el ADN más prevalentes formadas por ROS y se le considera como uno de los mutágenos endógenos que contribuye a la transformación celular espontánea (Banda D.M., *et al.* 2017, Ba X. *et al.* 2018). Se ha reportado que durante la replicación del ADN las polimerasas incorporan erróneamente Adenina en sitios donde la guanina se ha modificado a 8-oxoG, si esta mutación por transversión no se repara, este cambio se incorpora de manera permanente en el genoma. Por otro lado, se ha demostrado que la generación de 8-oxoG son predominantes en células somáticas particularmente en genes relacionados con cáncer de pulmón, mama y colorrectal. La reparación generada por oxidación de Guanina; ocurre por escisión de bases (BER) la cual es iniciada por la enzima 8-oxoG ADN glicosilasa 1 (OGG1), esta tiene la función de hidrolizar el enlace N-glicosídico y también la eliminación del fosfato 3' del sitioapurínico resultante, posteriormente la ADN□□ polimerasa incorpora los nucleótidos y es sellado por la ligasa III (Allgayer J. *et al.* 2013, Guo C. *et al.* 2017).

Los microARN (miRNAs) son una clase de ARN no codificantes con una longitud promedio de 22 nucleótidos. Estos juegan un papel importante en la regulación de la expresión genética a nivel postranscripcional de sus genes blanco. Los miRNAs se aparean con el ARN mensajero (ARNm) blanco suprimiendo su expresión mediante la represión de la traducción y/o la degradación del ARNm blanco (O'Brien J. *et al.* 2018). La interacción entre los miRNAs con el ARNm ocurre en el extremo 3' en la región no traducida (UTR) sin embargo esta interacción puede ocurrir en otras regiones incluidas la 5'UTR y la secuencia codificante. Los miRNAs desempeñan papeles clave en la mayoría de los procesos

celulares conocidos, incluyendo desarrollo, transducción de señales, proliferación celular, diferenciación, muerte celular, adhesión, migración y angiogénesis (Ebrahimi S.O. *et al.* 2020).

Los miRNAs regulan la expresión genética a nivel postranscripcional de diversos ARNm y de manera importante los que participan en la reparación del ADN. La inhibición de los genes que participan en los diferentes mecanismos de reparación ocasionaría una mayor inestabilidad genómica lo que podría conducir a la carcinogénesis. El daño del ADN modula la expresión de miRNAs, por lo que la interacción con sus genes blanco también se puede ver afectados de manera negativa. (Peter M. E., 2010). En diferentes estudios se ha demostrado la participación de los miRNAs en la reparación de cadena sencilla por escisión de bases (BER), la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y la reparación por mal apareamiento de las bases (MMR) así como también de las roturas de doble cadena en el ADN (DSB). Algunos miRNAs que se han identificado en la regulación de la reparación del ADN son miR-25, miR-155, miR-125b. (Natarajan V., 2016)

Interesantemente los miRNAs pueden migrar fuera de la célula y se puede encontrar en fluidos corporales, se ha reportado su presencia en sangre, orina, saliva, líquido seminal, leche materna y otros líquidos o a través del paso activo, en microvesículas y exosomas. En los últimos años ya se han identificado y utilizado a los miRNAs como biomarcadores en el diagnóstico y pronóstico en diferentes enfermedades como cáncer, inflamación, etc. (Condrat C.E. *et al.* 2020). El análisis bioinformático en este estudio predijo que hsa-miR-3187 y hsa-miR-3918 son potenciales reguladores del mRNA OGG1 el cual participa en la reparación del ADN para la remoción de 8-oxoG.

2 DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

En el presente estudio se identificaron a los miRNAs candidatos que pudieran regular el ARNm del gen OGG1 de humanos (hsa) mediante un análisis *in silico*. Se emplearon dos herramientas de predicción de miRNAs las cuales fueron miRDB (<http://mirdb.org/>) y TargetScan (http://targetscan.org/vert_72/). Los miRNAs comunes que se encontraron en las dos bases de datos se seleccionaron como candidatos en la regulación de OGG1.

miRDB es una base de datos en línea la cual contiene las secuencias 3'-UTR de todos los genes conocidos en cinco especies incluyendo al humano, adicionalmente contiene las secuencias de miRNAs específicos de especies enlazadas a miRBase. En el caso de TargetScan se utilizó para predecir los miRNAs mediante la búsqueda de la presencia de sitios 8mer, 7mer y 6mer.

Las secuencias maduras de los miRNAs candidatos seleccionados se consultaron en miRBase (mirbase.org/es) el cual es la principal base de datos en línea para el almacenamiento de información de miRNAs de diferentes reportes experimentales y bioinformáticos de varias especies. Para el análisis de la hibridación entre los miRNAs seleccionados y el ARNm del gen OGG1 se utilizó la plataforma de RNA22

v2 (<https://cm.jefferson.edu/rna22/Interactive/>) y STarMir (<http://sfold.wadsworth.org/cgi-bin/starmir.pl>).

El gen OGG1 humano presenta ocho isoformas debido al proceso de corte y empalme alternativo (OGG1-1a, -1b, -1c, -2a, -2b, -2c, -2d y -2e), las cuales están registradas en el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). La OGG1-1a está presente en el núcleo, mientras que las otras isoformas están presentes en la mitocondria. La secuencia del ARNm de OGG1 (FASTA) se obtuvo del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; Gene ID: 4968; acceso NM_002542.6).

3 RESULTADOS

La identificación de los miRNAs que interactúan con el gen OGG1 se llevó a cabo a través de algoritmos bioinformáticos: miRDB y TargetScan, los cuales predijeron un total de 91 y 83 miRNAs respectivamente, estos fueron seleccionados como candidatos potenciales, posteriormente se realizó una comparación y selección entre ambas bases de datos y se obtuvieron un total de 26 miRNAs los cuales se muestran en la figura 1. Estos se agruparon utilizando un diagrama de Venn (<http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>). Posteriormente se realizó la búsqueda de las secuencias maduras de miRNAs consultando a miRBase y el número de acceso, de cada uno de los miRNAs se realizó el análisis bioinformático para predecir los diferentes sitios de interacción con el transcrito de OGG1 con los programas RNA22 v2 y STarMir. El análisis de las secuencias en el programa RNA22 detectó 4 hibridaciones tomando en cuenta la energía del plegamiento, estos miRNAs fueron: hsa-miR-3187-3p, hsa-miR-1236-5p, hsa-miR-3622a-3p y hsa-miR-3918, los cuales se observan en la tabla 1, estos miRNAs de igual manera se evaluaron con el programa de STarMir, este algoritmo es capaz de detectar los sitios de unión en la secuencia del transcrito blanco y los miRNA, esta interacción puede ser en la región 5'-UTR (no traducida), la CDS (secuencia de codificación) o en el extremo 3'-UTR. Nuestro análisis detectó que hsa-miR-3187 y hsa-miR-3918 pueden interactuar en la región 5'-

Figura 1. Diagrama de Venn mostrando el número de miRNAs predichos por los algoritmos de miRDB y TargetScan7.

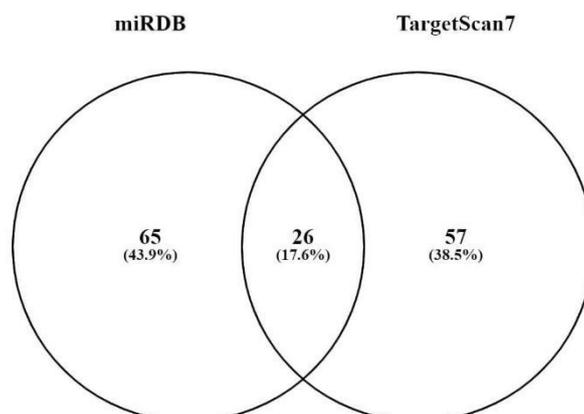
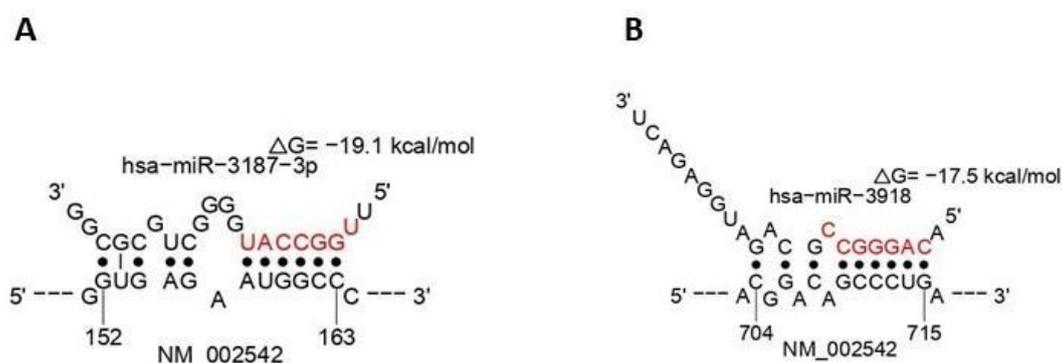


Tabla 1. Predicción de la posición de unión de los miRNAs candidatos en el ARN mensajero de OGG1 utilizando el programa RNA22.

miRNA	Energía de plegamiento (kcal/mol)	Posición en el blanco
hsa-miR-3187-3p	-20.60	1475
hsa-miR-1236-5p	-20.70	1048
hsa-miR-3622a-3p	-20.60	686
hsa-miR-3918	-25.20	875

Figura 2. Predicción de los sitios de unión de hsa-miR-3187 (A) y hsa-miR-3918 (B) en la región 5' UTR del ARNm del gen OGG1.



UTR del ARNm del OGG1, analizamos la región donde se identificaron al menos 6 nucleótidos de interacción entre los miRNAs y la secuencia 5'UTR como se puede ver en la figura 2. El análisis bioinformático sugiere que durante la oxidación de la guanina en el ADN la expresión de OGG1 podría ser regulada potencialmente por hsa-miR-3187 y hsa-miR-3918.

4 DISCUSIÓN

El estrés oxidativo induce inflamación crónica ocasionada por niveles desequilibrados de ROS relacionado a diferentes procesos patológicos, además de dañar a las macromoléculas celulares, el estrés oxidativo altera la expresión genética mediante modificaciones epigenéticas, represión o activación transcripcional y puede afectar los niveles de expresión de múltiples miRNAs. Interesantemente los miRNAs regulan la expresión de sensores redox pudiendo alterar componentes clave de la maquinaria antioxidante celular (Ebrahimi S.O. *et al.* 2020). Los radicales libres modifican la estructura del ADN por la generación de sitios apurínicos, ruptura de cadenas o modificaciones de bases nitrogenadas por lo que las células activan diversos mecanismos de reparación del ADN que involucran diferentes vías de señalización las cuales a su vez están regulados por diferentes proteínas que a su vez sufren modificaciones postraduccionales. En los últimos años se ha descrito la función regulatoria que tienen los miRNAs en diferentes procesos celulares incluyendo la reparación del ADN (Phaniendra A. *et al.* 2015, Carter R.J. y Parsons J.L., 2016).

Diversos estudios indican que la reparación del ADN es regulada por miRNAs, las cuales se han reportado tanto en rompimiento de cadena sencilla y de cadena doble (Natarajan V., 2016). En un estudio realizado en queratinocitos se demostró que la acumulación de 8-OH-dG en el ADN, disminuyó la reparación del ADN debido al incremento los niveles de miR-200a la cual disminuye la expresión de OGG1-2a evitando la remoción de la guanina oxidada y contribuyendo con la senescencia celular (Tinaburri L. *et al.* 2018). En otro trabajo se observó que en muestras de orina de personas ocupacionalmente expuestas a disolvente orgánicos (etilbenceno, tolueno, xileno) la expresión de miR-6778-5p incrementó considerablemente debido a la formación de 8-OH-dG a en comparación con los controles, lo cual sugiere que miR-6778-6p puede ser utilizado como un biomarcador de estrés oxidativo (Sisto R. *et al.* 2019). A pesar de que cada vez son más los reportes que involucran a los miRNAs en la reparación del ADN es necesario caracterizar y analizar familias de miRNAs debido a que poseen una secuencia común, lo que sugiere que pueden tener una función compartida (Vaschetto L.M., 2018).

Las herramientas bioinformáticas en el análisis de estructuras proteicas, actividad enzimática y estudios de secuencias de ácidos nucleicos han permitido simular y predecir diferentes estructuras moleculares, en el caso de los miRNAs existen diferentes algoritmos que han sido desarrollados y utilizados como una herramienta fundamental, por lo que en este estudio utilizamos a miRDB y TargetScan, las cuales son ampliamente utilizadas en el análisis de miRNAs. Las diferencias en el número predicho de miRNAs por cada base de datos se debe a que cada base de datos cuenta con sus propios algoritmos para predecir genes blanco de los miRNAs, lo cual está relacionado con la energía de conservación, energía libre, y energía de accesibilidad, principalmente (Dweep H. *et al.* 2013). Los miRNAs interactúan principalmente con el extremo 3' UTR y de esta manera restringe la transcripción de los genes blanco o conducen a la degradación del ARNm regulando así la expresión genética, pero también se ha observado que hay una relación fuerte en la región 5' UTR y juega un papel importante en la regulación génica mediada por los miRNAs debido a la presencia de varios sitios blanco para los miRNAs, además de la complementariedad de los miRNAs con la secuencia codificante y por lo tanto la regulación de la expresión de los genes blanco (Gu W, *et al.* 2014, Ni *et al.* 2015). Interesantemente también se ha estudiado que en algunos casos los miRNAs pueden actuar no solo para reprimir, sino también para inducir la expresión genética de los genes blanco (Yousef M. *et al.* 2009 y Fabian K. *et al.* 2020). La validación de la interacción in silico de miRNAs candidatos y el transcrito de OGG1 se llevó a cabo con STarMir debido a que puede hacer predicciones para cualquier par de miRNA-ARNm de cualquier especie de interés, la base de datos arrojó resultados precalculados para diferentes miRNAs. En este caso identificamos a miR-3187 y miR-3918 como miRNAs potenciales que pudieran regular la expresión de OGG1 en la región 5' UTR.

Un miRNA puede tener múltiples sitios de unión en la misma región de un gen lo que puede incrementar potencialmente el nivel de supresión traduccional y mejorar la especificidad génica, por lo que los diferentes algoritmos también han ayudado a identificar diferentes genes blanco de los miRNAs. La sobreexpresión de miR-3918 en células de carcinoma hepatocelular, redujo los niveles de ARNm y proteínas de Bcl2, el cual tiene la función de inhibir la muerte celular programada o apoptosis (Yang G. *et al.* 2019), en otro estudio se encontró la presencia de diversos miRNAs entre los que se identificó a miR-3918 en líneas celulares de tumores cerebrales y en líquido cefalorraquídeo de pacientes con tumores en el cerebro, aunque se desconocen los genes blanco de mir-3918, se sugiere que puede ser un potencial biomarcador para el diagnóstico y pronóstico de este tipo de tumores. (Shalaby T. *et al.* 2015). Por otro lado, en un análisis de exomas en suero y en líneas celulares, se observó la sobreexpresión de miR-3187-5p durante los primeros estadios de cáncer de pulmón, lo que sugiere que puede usarse como un buen biomarcador no invasivo para el uso en la detección temprana de pacientes con cáncer de pulmón (Zhang Z.J. *et al.* 2020). Los reportes que existen acerca de miR-3918 y miR-3187 no muestran el papel en la reparación del ADN, en este análisis realizamos la predicción de que podrían tener un papel importante en la reparación del ADN por BER a través de la enzima OGG1, por lo cual es necesario realizar diversos tipos de estudio para validar y confirmar la funcionalidad de los miRNA in vivo o in vitro.

REFERENCIAS

- Allgayer, J., Kitsera, N., von der Lippen, C., Epe, B., & Khobta, A. "Modulation of base excision repair of 8-oxoguanine by the nucleotide sequence." *Nucleic acids research* vol. 41,18: 8559-71. 2013.
- Ba, Xueqing, and Istvan Boldogh. "8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions." *Redox biology* vol. 14: 669-678. 2018.
- Banda, D. M., Nuñez, N. N., Burnside, M. A., Bradshaw, K. M., & David, S. S. "Repair of 8-oxoG:A mismatches by the MUTYH glycosylase: Mechanism, metals and medicine." *Free radical biology & medicine* vol. 107: 202-215. 2017.
- Carter, R. J., & Parsons, J. L. "Base Excision Repair, a Pathway Regulated by Posttranslational Modifications." *Molecular and cellular biology* vol. 36,10 1426-37. 2 May. 2016.
- Condrat, C. E., Thompson, D. C., Barbu, M. G., Bugnar, O. L., Boboc, A., Cretoiu, D., Suci, N., Cretoiu, S. M., & Voinea, S. C. "miRNAs as Biomarkers in Disease: Latest Findings Regarding Their Role in Diagnosis and Prognosis." *Cells* vol. 9,2 276. 23 Jan. 2020.
- Dweep, H., Sticht, C., & Gretz, N. "In-Silico Algorithms for the Screening of Possible microRNA Binding Sites and Their Interactions." *Current genomics* vol. 14,2: 127-36. 2013.
- Ebrahimi, S. O., Reisi, S., & Shareef, S. "miRNAs, oxidative stress, and cancer: A comprehensive and updated review." *Journal of cellular physiology* vol. 235,11: 8812-8825. 2020.
- Fabian K., Christina B., Pascal H., Tobias F., Martin H., Eckart M., Andreas K., "What's the target: understanding two decades of in silico microRNA-target prediction", *Briefings in Bioinformatics*, vol 21, Issue 6, Pages 1999–2010, November 2020.
- Guo, C., Ding, P., Xie, C., Ye, C., Ye, M., Pan, C., Cao, X., Zhang, S., & Zheng, S. "Potential application of the oxidative nucleic acid damage biomarkers in detection of diseases." *Oncotarget* vol. 8,43 75767-75777. 8 sep. 2017.
- Liguori, I., Russo, G., Curcio, F., Bulli, G., Aran, L., Della-Morte, D., Gargiulo, G., Testa, G., Cacciatore, F., Bonaduce, D., & Abete, P. "Oxidative stress, aging, and diseases." *Clinical interventions in aging* vol. 13 757-772. 26 Apr. 2018.
- Natarajan V. "Regulation of DNA repair by non-coding miRNAs." *Non-coding RNA research* vol. 1,1 64-68. 5 Nov. 2016.
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. "Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation." *Frontiers in endocrinology* vol. 9 402. 3 Aug. 2018.
- Peluso, M., Russo, V., Mello, T., & Galli, A. "Oxidative Stress and DNA Damage in Chronic Disease and Environmental Studies." *International journal of molecular sciences* vol. 21,18 6936. 21 Sep. 2020.
- Peter, M E. "Targeting of mRNAs by multiple miRNAs: the next step." *Oncogene* vol. 29,15: 2161-4. 2010.
- Phaniendra, A., Jestadi, D. B., & Periyasamy, L. "Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases." *IJCB* vol. 30,1: 11-26. 2015.

Shalaby T, Fiaschetti G, Baulande S, Gerber NU, Baumgartner M, Grotzer MA. “Detection and quantification of extracellular microRNAs in medulloblastoma” *J Cancer Metastasis Treat*, vol 1:67-75. 2015.

Sisto, R., Capone, P., Cerini, L., Sanjust, F., Paci, E., Pigni, D., Gatto, M. P., Gherardi, M., Gordiani, A., L'Episcopo, N., Tranfo, G., & Chiarella, P. “Circulating microRNAs as potential biomarkers of occupational exposure to low dose organic solvents.” *Toxicology reports* vol. 6; 126-135. 8 Jan. 2019.

Tinaburri, L., D'Errico, M., Sileno, S., Maurelli, R., Degan, P., Magenta, A., & Dellambra, E. “miR-200a Modulates the Expression of the DNA Repair Protein OGG1 Playing a Role in Aging of Primary Human Keratinocytes.” *Oxidative medicine and cellular longevity* vol. 2018 9147326. 25 Mar. 2018.

Vaschetto, Luis M. “miRNA activation is an endogenous gene expression pathway.” *RNA biology* vol. 15,6: 826-828. 2018.

Yang, G., Wang, X., Liu, B., Lu, Z., Xu, Z., Xiu, P., Liu, Z., & Li, J. “circ-BIRC6, a circular RNA, promotes hepatocellular carcinoma progression by targeting the miR-3918/Bcl2 axis.” *Cell cycle*, vol. 18,9: 976-989. 2019.

Yousef, M., Showe, L., & Showe, M. “A study of microRNAs in silico and in vivo: bioinformatics approaches to microRNA discovery and target identification.” *The FEBS journal* vol. 276,8: 2150-6. 2009.

Zhang ZJ, Song XG, Xie L, Wang KY, Tang YY, Yu M, Feng XD, Song XR. “Circulating serum exosomal miR-20b-5p and miR-3187-5p as efficient diagnostic biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer” *Exp Biol Med*. 245(16):1428-1436 Oct. 2020.