



DOI:10.22144/ctu.jsi.2019.003

## QUÁ TRÌNH TRƯỞNG THÀNH CỦA MICRORNA 144 PHỤ THUỘC VÀO DICER

Lê Thị Trúc Linh\* và Hồ Thị Bích Phượng

Khoa Công nghệ Sinh học, Đại học Mở Thành phố Hồ Chí Minh

\*Người chịu trách nhiệm về bài viết: Lê Thị Trúc Linh (email: linh.ltt@ou.edu.com)

### Thông tin chung:

Ngày nhận bài: 13/11/2018

Ngày nhận bài sửa: 20/03/2019

Ngày duyệt đăng: 12/04/2019

### Title:

MicroRNA 144 requires Dicer for its maturation

### Từ khóa:

Ago2, Dicer, DLD, miR-144, trưởng thành

### Keywords:

Ago2, Dicer, DLD, miR-144, maturation

### ABSTRACT

MicroRNAs are short (~20nt to 25nt long) single – stranded RNA molecules that have emerged as important post-transcriptional regulators of gene expression. The maturation of miRNAs depends on either Dicer or Ago2. In this study, the role of Dicer in miR-144 maturation was investigated. MicroRNA 144 level in Dicer knock out cell lines was determined by real-time PCR. The results showed that miR-144 expression significantly decreased when Dicer was knocked out. This data suggests that the maturation of miR-144 is Dicer dependent.

### TÓM TẮT

MicroRNA (miRNA) là một nhóm RNA có kích thước từ 20 đến 25 nucleotide, có chức năng điều hòa biểu hiện gen bằng cách gắn đặc hiệu với một trình tự trên mRNA đích. Quá trình trưởng thành của các miRNAs từ tiền miRNA có thể phụ thuộc Dicer hoặc Ago2. Nghiên cứu này được thực hiện nhằm khảo sát vai trò của Dicer trong quá trình trưởng thành của miRNA 144 (miR-144). Theo đó, hàm lượng miR-144 trong tế bào bị mất Dicer sẽ được kiểm tra bằng real-time PCR. Kết quả cho thấy khi Dicer bị mất đi, lượng miR-144 trưởng thành giảm mạnh. Điều đó cho thấy quá trình trưởng thành của miR-144 phụ thuộc vào Dicer.

Trích dẫn: Lê Thị Trúc Linh và Hồ Thị Bích Phượng, 2019. Quá trình trưởng thành của MicroRNA 144 phụ thuộc vào Dicer. Tạp chí Khoa học Trường Đại học Cần Thơ. 55(Số chuyên đề: Công nghệ Sinh học)(1): 24-28.

## 1 GIỚI THIỆU

MicroRNA (miRNA) là một nhóm RNA có kích thước từ 20 đến 25 nucleotide, có chức năng điều hòa biểu hiện gen bằng cách gắn đặc hiệu với một trình tự trên mRNA đích (Ambros, 2004; Bartel, 2004). Có khoảng 4552 miRNAs được tìm thấy trong các tế bào người (miRbase, 2014) và mỗi miRNA được dự đoán điều hòa vài gen đích (Lim *et al.*, 2005; Kozomara and Griffiths-Jones, 2011). Các chương trình bioinformatics dự đoán hơn 50% các gen mã hóa ở người được điều hòa bởi miRNA (Chen *et al.*, 2005; Lewis *et al.*, 2005).

Hầu hết các miRNA được biết hiện nay nằm trong vùng intron của những gen mã hóa cho

protein, tuy nhiên cũng có một số ít miRNA nằm trong vùng exons hoặc trong vùng không mã hóa cho mRNA (Rodriguez *et al.*, 2004). Mặc dù chức năng của miRNA và mRNA khác biệt, nhưng các bằng chứng hiện tại cho thấy cơ chế điều hòa phiên mã của hai phân tử này có nhiều điểm tương đồng (Lee *et al.*, 2002). MiRNA được tạo ra từ nhiều bước: đầu tiên, các miRNA được phiên mã bởi phức hợp RNA polymerase II (Lee *et al.*, 2004), sau đó gắn mũ (capped), gắn đuôi poly A (Cai *et al.*, 2004). Quá trình phiên mã này tạo ra phân tử miRNA cơ sở (primary miRNA), có mang một cấu trúc kẹp tóc (Lee *et al.*, 2002; Kim, 2005). Sau đó, Drosha (một loại RNase II) và Drosha cofactor, DGCR8 cắt vùng cấu trúc kẹp tóc trên miRNA – cơ sở để tạo ra

tiền miRNA (precursor miRNA), có kích thước khoảng 70-100 nucleotide (Lee *et al.*, 2003; Han *et al.*, 2004). Cả hai quá trình trên được thực hiện trong nhân. Tiếp theo, tiền miRNA được vận chuyển ra ngoài qua màng nhân đến tương bào cytosol nhờ Exportin-5 (Yi *et al.*, 2003). Sau đó, Dicer (một loại RNase III) cắt tiền miRNA thành một phân tử RNA mạch đôi có kích thước ngắn (Ketting *et al.*, 2001; Chendrimada *et al.*, 2005). Phân tử RNA mạch đôi này có một mạch đơn là miRNA, mạch còn lại mang trình tự bổ sung với trình tự miRNA.

Ở người, miR-144 nằm trên chromosome 17. Các miRNA nằm gần miR-144 (<10 kb) gồm có miRNA 4732, miRNA 451a/b (miR-451a/b). Đặc biệt, miR-144 và miR-451 cách nhau khoảng 100 bp, miRNA 4732 cách miR-144 khoảng 30 bp. Vì nằm gần nhau nên những miRNA này có thể được phiên mã cùng lúc (Papapetrou *et al.*, 2010). Tuy nhiên, trong một số bệnh ở người, sự tăng hoặc giảm biểu hiện của miR-144 không đi kèm với sự tăng hoặc giảm biểu hiện của miR-451 (Rosenberger *et al.*, 2017). Điều đó chứng tỏ cơ chế điều hòa sau phiên mã của hai miRNA này khác nhau. Quá trình trưởng thành của miR-451 đã được chứng minh phụ thuộc Ago2 mà không phụ thuộc Dicer (Dueck and Meister, 2010). Do vậy, có một số giả thuyết cho rằng quá trình trưởng thành của miR-144 phụ thuộc Dicer. Từ đó lý giải cho sự khác biệt về hàm lượng của hai phân tử miRNAs trong một số bệnh ở người. Trong nghiên cứu này, vai trò của Dicer với sự trưởng thành của miR-144 được kiểm tra. Kết quả cho thấy Dicer cần cho quá trình trưởng thành của miRNA này.

## 2 VẬT LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

### 2.1 Tế bào

Dòng tế bào DLD-1 (ATCC® CCL-221™) và dòng tế bào đối chứng tương ứng (parental cell line) được nuôi cấy ở 37°C với 5% (v/v) CO<sub>2</sub> trong môi trường dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) high glucose, glutaMAX supplement (Life technologies, 10566-016) với 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (FCS) (PAA), 100 IU/mL penicillin và 100 µg/mL streptomycin (Sigma, P4333). DLD-1 là dòng tế bào ung thư đại trực tràng có vùng exon 5 là vùng mã hóa cho Dicer helicase domain bị bất hoạt. Trong khi đó, dòng tế bào đối chứng có vùng mã hóa Dicer helicase domain bình thường.

### 2.2 Tổng hợp cDNA

RNA tổng được tách từ tế bào bằng trizol® reagent (Invitrogen, 15569-026). Nồng độ, độ tinh sạch của RNA được xác định bằng NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies). Để tổng hợp cDNA, 1 µg RNA tổng số được trộn với

0,2 µg random hexamer primer (Life Technologies, 48190-011) trong tổng thể tích 11 µL. Phản ứng sau khi được đặt ở 70°C trong 10 phút được làm lạnh nhanh. Tiếp tục thêm vào phản ứng 1 µL superscript II reverse transcriptase (200 units/µL) (Life Technologies, 18064-014); 4 µL first strand buffer (5X) (Life Technologies, 28028-013); 2 µL dithiothreitol (DTT) 0,1 M (Life Technologies, 18057-018); 2 µL dNTP mix 10 mM (Bioline, BIO-39044); 1 µL recombinant rnasin ribonuclease inhibitor (20-40 units/µL) (Promega, N2511). Phản ứng được thực hiện ở 42°C trong 1 giờ và theo sau là bước bất hoạt 70°C trong 10 phút. cDNA được pha loãng tới 0,5 µg/mL trong H<sub>2</sub>O (Sigma, W4502).

MicroRNA cDNA được tổng hợp bằng miRCury LNA™ universal cDNA synthesis kit (Exiqon, 203300). Phản ứng cDNA được thực hiện với 10 ng RNA tổng và 2 µL reaction buffer (5X); 1 µL enzyme (Exiqon, 203300) trong tổng thể tích 10 µL. Phản ứng diễn ra ở 42°C trong 1 giờ. Sau khi bất hoạt phản ứng ở 95°C trong 5 phút, cDNA được pha loãng tới 12,5 pg/µL với H<sub>2</sub>O (Sigma, W4502) và 50 pg cDNA được sử dụng trong các phản ứng PCR định lượng microRNA sau đó.

### 2.3 Real-time PCR

Primers bắt đặc hiệu cho Dicer được thiết kế sử dụng phần mềm Profinder (roche applied science). Primers và probe cho 18S rRNA được thiết kế bằng phần mềm Primer Express® 1.0 (Life Technologies, 4363991). Độ đặc hiệu của Primers được kiểm tra bằng BLASTn (NCBI). Phản ứng real-time PCR được thực hiện trong hệ thống ABI Prism 7900 HT Sequence Detector (Applied Biosystems) với 5 ng cDNA cho Dicer và 1 ng cDNA cho 18S rRNA. Mỗi phản ứng với thể tích 25 µL gồm có kappa fast universal qPCR master mix (2X) (Kappa Biosystems, KK4703); 100 nM DICER-F AGCAACACAGAGATCTCAAACATT (Sigma); 100 nM DICER-R GCAAAGCAGGGCTTTTCAT (Sigma); 200 nM probe #47 (Roche Diagnostics). Chu trình nhiệt của phản ứng bao gồm 50°C 2 phút, 95°C 10 phút, 40 chu kỳ của 95°C 15 giây, 60°C 1 phút.

Để định lượng miR-144, Hsa-miR-144-3p LNA™ PCR primer (Qiagen, 339306) và U6 (Qiagen, 339306) được sử dụng trong phản ứng PCR là SYBR® Green I dye. Phản ứng gồm có 0,18 µL SYBR® Green I dye; 5 µL kappa fastUniversal qPCR master mix (2X) (Kappa Biosystems, KK4703) và 1 µL mẫu (theo hướng dẫn của nhà sản xuất) trong tổng thể tích là 10 µL. Chu trình nhiệt của phản ứng gồm có 10 phút ở 95°C, 40 chu kỳ gồm có 10 giây ở 95°C, 1 phút ở 60°C và theo sau

là bước biến tính để xác định đường cong nóng chảy (melting curve). Mức độ biểu hiện của Dicer và miR-144 được xác định bằng công thức  $2^{-\Delta C_t}$ . Trong đó  $\Delta C_t = C_{t,Dicer} - 18S$  hoặc  $\Delta C_t = C_{t,miR-144} - U6$ .

#### 2.4 Phân tích số liệu

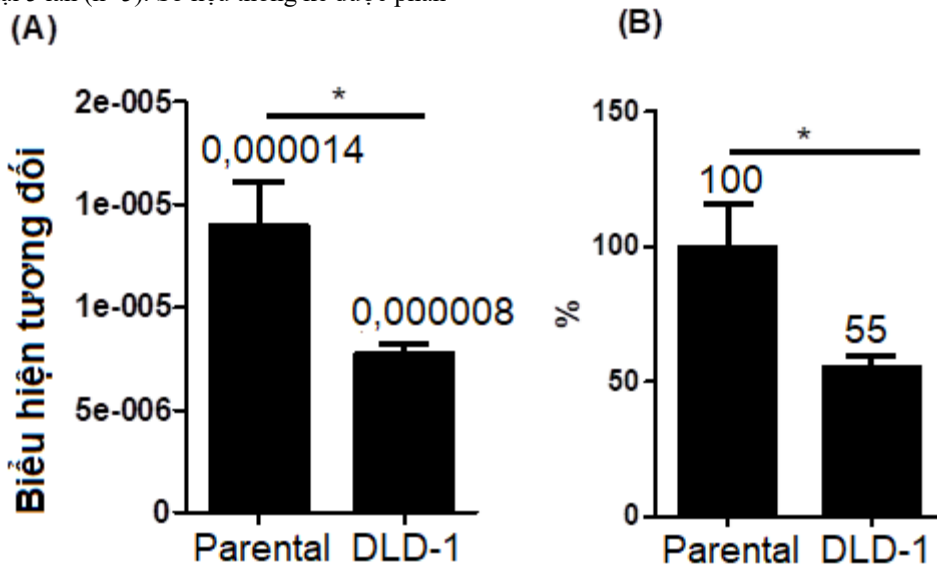
Student's unpaired t-test (two-tail) được sử dụng để phân tích sự khác biệt giữa 2 nhóm tế bào: parental (có Dicer) và DLD-1 (không có Dicer). Tất cả các giá trị được biểu diễn dưới dạng trung bình của các lần thí nghiệm lặp lại. Trong đó, thí nghiệm được lặp lại 5 lần (n=5). Số liệu thống kê được phân

tích sử dụng phần mềm GraphPad Prism version 4.0. Mức độ khác biệt có ý nghĩa thống kê được biểu diễn \*  $\leq 0,05$ ; \*\*  $\leq 0,01$  và \*\*\*  $\leq 0,001$ .

### 3 KẾT QUẢ

#### 3.1 Mức độ biểu hiện của Dicer trong tế bào DLD-1

Tế bào DLD-1 là tế bào ung thư đại trực tràng có vùng exon 5 là vùng mã hóa cho Dicer helicase domain bị bất hoạt. Do vậy, Dicer bị mất hoạt tính. Mức độ biểu hiện của mRNA Dicer trong tế bào này được kiểm tra bằng real-time PCR.



Hình 1: Mức độ biểu hiện Dicer trong tế bào Dicer knock out

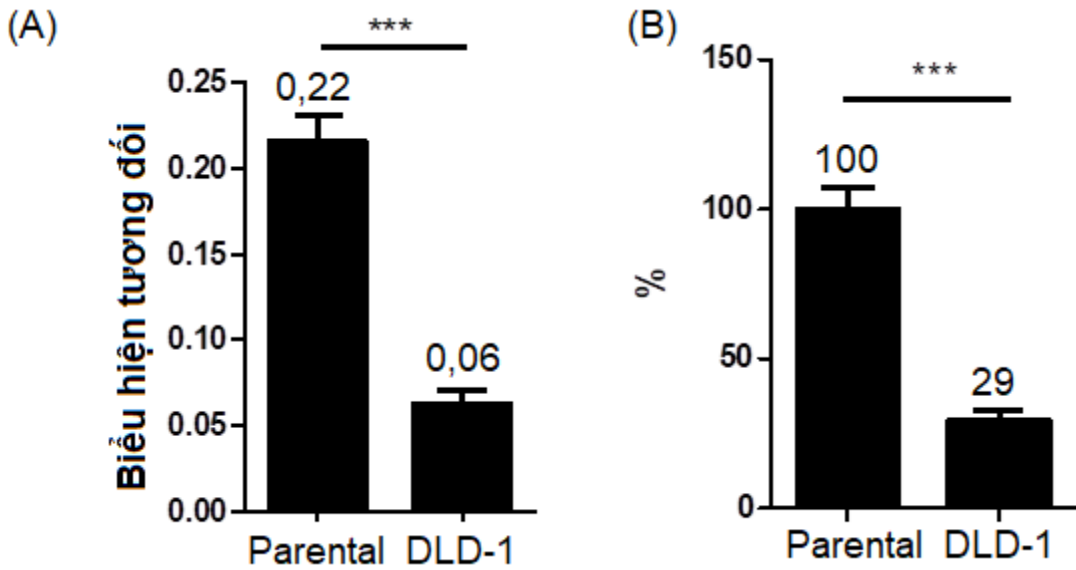
Phản ứng real-time định lượng mRNA Dicer với 18S rRNA được sử dụng làm chứng nội. (A) mức độ biểu hiện của Dicer trong tế bào đối chứng và tế bào bị đột biến Dicer. (B) % mức độ biểu hiện của Dicer trong tế bào đối chứng và tế bào bị đột biến Dicer. DLD-1: tế bào bị đột biến Dicer, parental: tế bào đối chứng. Sự khác biệt về hàm lượng Dicer giữa các nhóm được phân tích bằng unpaired two-tailed student's t test. \*  $p < 0,05$ ;  $n = 5$ .

Kết quả cho thấy hàm lượng mRNA giảm rõ rệt trong tế bào có Dicer bị bất hoạt khi so sánh với tế bào đối chứng (Hình 1). Giá trị trục tung thể hiện mức độ biểu hiện tương đối của Dicer so với chứng nội tại 18S. Giá trị này ở mức bình thường sẽ bằng với mức độ trong tế bào chứng. Như đã trình bày ở trên, tế bào cần Dicer để hoạt động, để duy trì dòng tế bào này, một lượng nhỏ Dicer vẫn được hình

thành thể thực hiện một số chức năng nhất định. Kết quả ở Hình 1 phù hợp với dự kiến ban đầu.

#### 3.2 Hàm lượng miR-144 trưởng thành trong tế bào Dicer knock out

Để kiểm tra vai trò của Dicer đối với sự trưởng thành của miR-144, hàm lượng miR-144 trưởng thành trong tế bào mất Dicer và tế bào đối chứng được kiểm tra bằng real-time PCR.



**Hình 2: Hàm lượng miR-144 trong tế bào Dicer knock out**

(A) Mức độ biểu hiện của miR-144 trong các tế bào khảo sát. (B) Phần trăm mức độ biểu hiện của miR-144 trong các tế bào khảo sát. Sự khác biệt về hàm lượng miR-144 giữa các nhóm được phân tích bằng unpaired two-tailed student's t test, \*\*\*  $p < 0,001$ ;  $n = 5$ .

Kết quả (Hình 2) cho thấy hàm lượng miR-144 giảm mạnh trong tế bào có Dicer bị bất hoạt khi so sánh với tế bào đối chứng.

#### 4 THẢO LUẬN

Hầu hết các miRNAs được tạo thành từ phân tử miRNA cơ sở nhờ sự tham gia của hai loại enzyme ribonuclease III là Drosha và Dicer (Bartel, 2004). Một số nhóm miRNA không cần xúc tác của Drosha để trưởng thành như: miRtrons, tRNAZ, và snoRNA (Berezikov *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007; Carthew and Sontheimer, 2009). Khác với Drosha, Dicer thường được xem là enzyme trung tâm trong quá trình trưởng thành của các miRNAs. Tuy nhiên, một số miRNAs vẫn có thể trưởng thành từ tiền miRNA mà không cần Dicer như miR-451 (Dueck and Meister, 2010). Quá trình trưởng thành của miR-451 từ tiền miR-451 phụ thuộc vào Ago2 (Ketting *et al.*, 2001). MiR-144 và miR-451 cùng được mã hóa trên nhiễm sắc thể 17 ở người và cách nhau khoảng 100 bp. Vì vậy, miR-144 và miR-451 được phiên mã cùng lúc trong cùng một phân tử miR-144/451 cơ sở (Papapetrou *et al.*, 2010).

Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm xác định ảnh hưởng của Dicer đối với sự trưởng thành của miR-144, sử dụng một loại tế bào thương mại có phân tử Dicer bị đột biến có hàm lượng Dicer trong tế bào giảm so với tế bào bình thường. Sự giảm này có thể ở hai mức độ protein và mRNA. Trong đó, nếu Dicer mRNA giảm, Dicer protein chắc chắn sẽ giảm. Vì vậy, bước đầu tiên của nghiên cứu sẽ xác định hàm

lượng Dicer trong tế bào để kiểm tra. Bước tiếp theo, trong tế bào có lượng Dicer giảm này, tiến hành kiểm tra mức độ miR-144 trưởng thành. Primer được thiết kế để bắt đặc hiệu với miR-144 trưởng thành. Nếu sự trưởng thành của miR-144 phụ thuộc Dicer, khi Dicer giảm, hàm lượng miR-144 trưởng thành sẽ thay đổi (giảm hoặc tăng). Nếu sự trưởng thành của miR-144 không phụ thuộc Dicer, hàm lượng miR-144 trưởng thành sẽ không thay đổi.

Mối liên hệ giữa mức biểu hiện của Dicer và hàm lượng của miR-144 trưởng thành được thể hiện rõ trong kết quả Hình 1 và 2. Khi hàm lượng Dicer giảm, hàm lượng miR-144 trưởng thành giảm.

Thực hiện kiểm tra hàm lượng miR-144 trưởng thành trong tế bào có Dicer bị bất hoạt, lượng miR-144 được tìm thấy giảm rõ rệt (80%). Điều này chứng tỏ quá trình trưởng thành của miR-144 cần Dicer.

Như vậy, trong khi Ago2 cần cho sự trưởng thành của miR-451, miR-144 lại cần sự tham gia của Dicer trong quá trình trưởng thành. Hiện vẫn chưa rõ tại sao quá trình trưởng thành của hai miRNA này lại khác nhau trong khi được phiên mã cùng lúc và cần được nghiên cứu thêm.

#### 5 KẾT LUẬN

Kết quả nghiên cứu thì sự trưởng thành của miR-144 được tìm thấy phụ thuộc Dicer; và sự khác biệt này là 80% và ở mức ý nghĩa thống kê  $p < 0,001$ .

## TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Ambros, V., 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 431(7006): 350-355.
- Bartel, D., 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*. 116(2): 281-297.
- Berezikov, E., Chung, W.J., Willis, J., Cuppen, E. and Lai, E.C. 2007. Mammalian mirtron genes. *Molecular cell*. 28(2): 328-336.
- Cai, X., Hagedorn, C. and Cullen, B., 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA (New York, N.Y.)*. 10(12): 1957-1966.
- Carthew, R.W. and Sontheimer, E.J., 2009. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell*. 136(4): 642-655.
- Chen, C., Ridzon, D., Broomer, A., et al., 2005. Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. 33(20): e179-e179.
- Chendrimada, T., Gregory, R., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K. and Shiekhattar, R., 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*. 436(7051): 740-744.
- Dueck, A. and Meister, G., 2010. MicroRNA processing without Dicer. *Genome Biol*. 11(6): 123.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H. and Kim, N., 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development*. 18(24): 3016-3027.
- Ketting, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J. and Plasterk, R.H., 2001. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes & Development*. 15(20): 2654-2659.
- Kim, N., 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*. 6(5): 376-385.
- Kozomara, A. and Griffiths-Jones, S., 2011. miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*. 39(Database issue): D152-D157.
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., et al., 2003. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*. 425(6956): 415-419.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.T., Kim, S. and Kim, N., 2002. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *The EMBO Journal*. 21(17): 4663-4670.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek S. and Kim, N., 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*. 23(20): 4051-4060.
- Lewis, B., Burge, C. and Bartel, D., 2005. Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell*. 120(1): 15-20.
- Lim, L., Lau, N., Garrett-Engele, P., et al., 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*. 433(7027): 769-773.
- Papapetrou, E.P., Korkola, J.E. and Sadelain, M., 2010. A genetic strategy for single and combinatorial analysis of miRNA function in mammalian hematopoietic stem cells. *Stem cells*. 28(2): 287-296.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. and Bradley, A., 2004. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Research*. 14(10A): 1902-1910.
- Rosenberger, C.M., Podyminogin, R.L., Diercks, A.H., et al., 2017. miR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis. *PLoS pathogens*. 13(4): e1006305.
- Ruby, J.G., Jan, C.H. and Bartel, D.P., 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*. 448(7149): 83.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I. and Cullen, B., 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes & Development*. 17(24): 3011-3016.

www.mirbase.org