Journal of North Khorasan
University of Medical Sciences
No 39, Volume 10, Issue 4

Research Article

In silico screening of G-Quadruplex Structures in *Wilms tumor 1* Gene Promoter

Saeedeh Ghazaey Zidanloo [1,*], Mahsa Jafarzadeh Hesari [2]

[1] PhD, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnorud, Iran
[2] MSc, Addiction and Behavioral Sciences Research Center, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran
* **Corresponding author:** Saeedeh Ghazaey Zidanloo, PhD, Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnorud, Iran. E-mail: Ghazaeys@kub.ac.ir

DOI: 10.21859/nkjmd-10049

How to Cite this Article:
Ghazaey Zidanloo S, Jafarzadeh Hesari M. *In silico* screening of G-Quadruplex Structures in *Wilms tumor 1* Gene Promoter. *J North Khorasan Univ Med Sci*. 2019; **10**(4):61-67. DOI: 10.21859/nkjmd-10049

Received: 13 Jun 2018
Accepted: 25 Jul 2018

Keywords:
G-quadruplex Structures
in silico Screening
Promoter
WT1 Gene

Abstract

Introduction: X-ray diffraction studies have revealed that guanines in a DNA stands may be arranged in quartet and form a structure called G-quadruplexs. Bioinformatics studies suggested the formation of G-quadruplex structure in human crucial genes, including *Wilms tumor 1 (WT1)*. The aim of this study was to *in silico* analysis of the guanine-rich sequence in the promoter region of the *WT1* gene which have potential to form G-quadruplex structures.

Methods: To identify the presence of repetitive guanosine-rich sequences prone to form G-quadruplex structures in the regulatory region of the *WT1* gene, the promoter sequence was extracted from the NCBI gene bank. The sequence was evaluated by the QGRS mapper software.

Results: According to the data obtained from the software, and the G-scores, three appropriate sequences in the promoter region of the *WT1* gene were identified with the highest probability for the formation of G-quadruplex structures. A valuable point in this study was the presence of recognition sites of large number of transcription factors in these three areas.

Conclusions: The majority of these G-quadruplex forming sequences were located in the promoter regions of the oncogenes. These discoveries have led scientists to point out that these structures may play a significant physiological role under *in vivo* conditions. Therefore, by identifying and targeting these sequences in the regulatory regions of the genes, it is possible to control the expression of the genes.

مجله دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی
دوره ۱۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۷

مقاله پژوهشی

شناسایی *in silico* ساختارهای DNA چهاررشته‌ای در توالی پروموتری ژن تومور ویلمز ۱

سعیده قضایی‌زیدانلو [۱،*]، مهسا جعفرزاده‌حصاری [۲]

[۱] دکترای تخصصی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر، بجنورد، ایران
[۲] کارشناس ارشد اپیدمیولوژی، مرکز تحقیقات اعتیاد و علوم رفتاری، معاونت تحقیقات و فناوری، دانشگاه علوم پزشکی خراسان شمالی، بجنورد، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** سعیده قضایی زیدانلو، دکترای تخصصی، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه کوثر، بجنورد، ایران. ایمیل: Ghazaeys@kub.ac.ir

DOI: 10.21859/nkjms-10049

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۰۳/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۰۵/۰۳

واژگان کلیدی:
بررسی *in silico*
پروموتر
ساختار چهاررشته گوانینی
ژن تومور ویلمز ۱

چکیده

مقدمه: مطالعات پراش اشعه ایکس آشکار کرد که گوانین‌های موجود در یک رشته ممکن است به شکل چهارتایی آرایش یابند و یک ساختار چهار رشته‌ای بنام مارپیچ چهار رشته‌ای گوانینی تشکیل دهند. مطالعات بیوانفورماتیک، احتمال تشکیل ساختار چهار رشته‌ای گوانینی را در ژن‌های کلیدی انسان از جمله *تومور ویلمز* ۱ (*WT1*) مطرح نمودند. هدف این مطالعه، بررسی *in silico* توالی غنی از گوانین در پروموتر ژن *WT1* از لحاظ مستعد بودن برای تشکیل ساختار چهار رشته درون‌مولکولی بود.

روش کار: برای شناسایی حضور توالی‌های مستعد چهار رشته شدن در ناحیه تنظیمی ژن *WT1*، ابتدا توالی پروموتری ژن از بانک ژنی NCBI استخراج شد. توالی مورد نظر توسط نرم افزار نقشه یاب آنلاین توالی‌های پلی‌گوانینی مستعد چهاررشته شدن (QGRS Mapper)، از لحاظ حضور نواحی مستعد چهاررشته شدن بررسی شد.

یافته‌ها: با استفاده از داده‌های حاصل از بررسی با نرم افزار نقشه یاب، بر اساس نمره G، سه توالی‌های مناسب در ناحیه پروموتری ژن *WT1*، با بیشترین احتمال برای تشکیل ساختار چهار رشته‌ای شناسایی شد. نکته ارزشمند در این بررسی، حضور جایگاه‌های شناسایی تعداد زیادی از فاکتورهای رونویسی در این سه ناحیه بود.

نتیجه‌گیری: اغلب توالی‌های مستعد چهاررشته شدن در مناطق پروموتری آنکوژن‌ها واقع شده‌اند. این یافته‌ها، دانشمندان را به این سو هدایت کرده که این ساختارها ممکن است دارای نقش مهم فیزیولوژیکی در شرایط درون سلول باشند. پس با شناسایی و هدف قرار دادن این توالی‌ها در نواحی تنظیمی ژن‌ها، می‌توان بیان آن ژن را کنترل نمود.

مقدمه

بررسی‌ها با استفاده از پراش اشعه ایکس نشان داد که DNA قادر به تشکیل ساختار چهاررشته نیز هست [۱]. بر خلاف DNA دورشته با پیوند واتسون-کریکی، پایه ساختار گوانین چهارتایی بر اساس پیوند هوگستینی است. پیوند هوگستینی می‌تواند اجازه شکل‌گیری ساختارهای مارپیچ دورشته، سه‌رشته و چهاررشته را بدهد. در جایی که تشکیل ساختارهای دورشته کمتر رایج باشد، ساختار سه‌رشته به طور طبیعی در مارپیچ‌های سه‌تایی و tRNA شکل می‌گیرد اما ساختارهای چهاررشته هوگستینی فقط توسط گوانین تشکیل می‌شود و از این رو اصطلاحاً ساختار چهاررشته‌ای گوانینی (G-quadruplexes) خوانده می‌شود. در یک توالی غنی از گوانین، گوانین‌های چهارتایی، بصورت صفحه‌ای روی هم انباشته می‌شوند. هر گوانین، چهار پیوند هوگستینی را با دو گوانین دیگر بصورت دو پیوند N1 - O6 و دو پیوند N2 - N7 تشکیل می‌دهد [۲]. ساختار چهاررشته بین گوانین‌های یک رشته بصورت درون مولکولی و یا میان گوانین‌های دورشته و یا چهاررشته بصورت بین‌مولکولی شکل می‌گیرد. علاوه بر این، پیوند در هر رشته می‌تواند در هردو جهت '۵-به-'۳ یا '۳-به-'۵ صورت گیرد و در نتیجه ساختارهای مختلفی برای گوانین‌های چهارتایی گزارش شده است [۳]. اخیراً نشان داده که تراکم توالی‌های بالقوه در نزدیکی جایگاه آغاز رونویسی (TSS) است. تراکم توالی‌های بالقوه در تشکیل ساختار چهاررشته‌ای، با محتوای GC ژنوم در ارتباط هستند. با این حال، مهم است که توجه داشته باشیم که آنها با جایگاههای CpG در ژنوم مرتبط نیستند، یعنی لازمه تشکیل ساختار، فقط وجود یک رشته DNA غنی از G و رشته دیگری غنی از C می‌باشد. در نواحی مختلفی از ژنوم، توالی‌هایی یافت شده‌اند که بصورت بالقوه توانایی تشکیل ساختار چهاررشته را دارند، این یافته نشان می‌دهد که این توالی‌ها می‌توانند در سلول نقش‌های تنظیمی ایفا کنند [۴]. مثلاً توالی‌های تکراری غنی از گوانین در ناحیه تلومری یوکاریوت‌ها، قادر به تشکیل ساختار چهاررشته هستند که این ساختارها، توالی تلومری تک رشته در انتهای ´۳ که برای بقای سلول حیاتی است را حفاظت می‌کنند [۵، ۶]. اخیراً مشخص شده این توالی‌های مستعد چهاررشته شدن در تنظیم رونویسی ژن‌ها نقش دارند. پژوهش‌های بعدی نشان داد ۴۲/۷ درصد از پروموتر ژن‌ها، حداقل یک

توالی بالقوه در تشکیل ساختار چهاررشته‌ای دارند. درون پروموتر، احتمال یافتن یک توالی بالقوه در تشکیل ساختار چهاررشته، با نزدیک شدن به نقطه آغاز رونویسی کاملاً مرتبط است [۷]. در سال ۲۰۰۸ ژانگ و همکارانش با بررسی بیوانفورماتیکی توالی تنظیمی ژن‌ها و استفاده از نرم افزار Quadparser، لیستی بنام Greglist تهیه کردند و در آن اسامی ۳۰ ژن ذکر شده که در ناحیه پروموتری خود دارای توالی‌های مستعد چهاررشته شدن هستند و احتمالاً با تشکیل ساختار چهاررشته، بیان این ژن‌ها تنظیم می‌شود. بسیاری از ژن‌ها در این لیست، آنکوژن بوده و برای اولین بار به عنوان کاندید چهاررشته‌ای شدن ذکر شده بودند که ژن تومور ویلمز ۱ یا *WT1* نیز یکی از آنهاست [۸]. هدف این مطالعه بررسی *In silico* توالی پروموتری ژن *WT1* و یافتن نواحی مستعد تشکیل ساختار چهاررشته، با استفاده از نرم افزار آنلاین QGRS mapper است.

روش کار

نرم افزار QGRS Mapper

نقشه یاب آنلاین توالی‌های پلی‌گوانینی مستعد چهاررشته شدن (QGRS Mapper)، یک برنامه نرم افزاری است که اطلاعات لازم در مورد ترکیب و توزیع نواحی مستعد ساختار چهاررشته شدن (QGRS) را فراهم می‌سازد (http://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS) (Kikin et al., 2006). این نقشه یاب QGRS می‌تواند تشکیل ساختار چهاررشته میان دو یا سه تکرار پشت سرهم گوانین با موتیف زیر را پیش بینی کند: $G_xN_{y1}G_xN_{y2}G_xN_{y3}G_x$ که در آن 'x' تعداد گوانین و y_1, y_2 و y_3" طول حلقه‌ها است. حداکثر طول توالی می‌تواند ۴۵ نوکلئوتید باشد. بدین منظور، برای شناسایی حضور توالی‌های مستعد چهار رشته شدن در ناحیه تنظیمی ژن *WT1*، ابتدا توالی پروموتری ژن از بانک ژنی NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov) استخراج شد. توالی نوکلئوتیدی در صفحه آنالیز نرم افزار وارد شد و نرم افزار توالی را از لحاظ حضور نواحی مستعد چهاررشته شدن بررسی نمود. توالی می‌تواند به فرمت FASTA و یا NCBI براساس شناسه ژن، نام ژن یا accession number وارد شود. نرم‌افزار با استفاده از الگوریتم‌ها و برنامه‌های کامپیوتری، به شناخت و نقشه برداری از توالی‌های بالقوه می‌پردازد [۹]. برنامه نقشه‌یابی، به دنبال توالی‌های پلی‌گوانینی می‌گردد. هر بخش از توالی‌های ژنومی به عنوان مثال پروموتر، تلومر، و همچنین توالی‌های RNA، می‌تواند برای تجزیه و تحلیل توالی ژنومی مورد استفاده قرار گیرد. نقشه یاب QGRS ابزاری منحصر به فرد است که علاوه بر ارائه اطلاعات در مورد ترکیب و محل نواحی مستعد ساختار چهاررشته شدن در ژنوم، برای پیشگویی تشکیل ساختار چهاررشته در توالی‌های الیگونوکلئوتیدی کوتاه نیز بکار می‌رود [۹].

تعریف یک سیستم نمره دهی برای توالی‌های ژنومی

Kikin و همکارانش، بعلاوه یک سیستم نمره دهی بنام نمره G (G-Score) نیز جهت ارزیابی نواحی مستعد ساختار چهاررشته شدن و احتمال تشکیل ساختار چهاررشته پایدارتر، ابداع کرده‌اند. طول ناحیه‌ای که برای بررسی احتمال تشکیل ساختار چهاررشته به نرم‌افزار داده می‌شود در نمره دهی تأثیر می‌گذارد [۹]. هر توالی که نمره بالاتری بگیرد، انتخاب بهتری برای تشکیل ساختار چهاررشته خواهد بود.

یافته‌ها

در این پژوهش، ما به بررسی احتمال تشکیل ساختار چهاررشته در توالی پروموتری ژن *WT1* به صورت *in silico* پرداختیم. توالی پروموتری از بانک ژنی NCBI استخراج شد و با استفاده از نرم افزار آنلاین GQRS mapper مناطق پروموتری مستعد برای چهار رشته‌ای شدن بررسی گردید. اطلاعات حاصل از این نرم‌افزار آنلاین در تصویر ۱ نمایش داده شد. با توجه به امتیازی که بر اساس نمره G، نرم افزار به توالی‌ها داده بود، پنج توالی با بالاترین نمره شناسایی و بر اساس اندازه با عنوان *WT28*، *WT21* *WT21*، *WT33* و *WT28* نامگذاری شدند. مشخصات این پنج توالی در جدول ۱ آمده است. طبق مطالعه هوفمن و همکارانش در سال ۱۹۹۳، بیشترین فعالیت پروموتری ژن *WT1* در ناحیه‌ای بین ۴۴۹ باز بالادست تا ۲۰۱ باز پایین دست نقطه شروع رونویسی ژن گزارش شده است [۱۰]. با توجه به این یافته توالی‌هایی که در این ناحیه پروموتری واقع شده‌اند برای بررسی بیشتر انتخاب شدند که شامل سه ناحیه *WT21*، *WT33* و *WT28* شد. توالی پروموتری ژن *WT1* معرفی شده توسط هوفمن و همکارانش به همراه جایگاه توالی‌های مستعد چهاررشته شدن، نسبت به نقطه شروع رونویسی در تصویر ۲ آمده است. از میان این توالی‌ها، *WT21* به عنوان بهترین توالی با بالاترین نمره G روی پروموتر ژن *WT1* شناسایی شد. توالی *WT21* با امتیاز بالاتری که دارد می‌تواند به عنوان عامل مؤثر در شکل‌گیری ساختار چهاررشته پایدارتر و در تنظیم بیان ژن *WT1* در نظر گرفته شود.

بحث

ژن *WT1* روی کروموزوم ۱۱ ناحیه p13 قرار دارد و دارای ۱۰ اگزون بوده که محصول پروتئینی آن یک فاکتور رونویسی است که تنظیم فعالیت بسیاری از ژن‌ها را در دوران جنینی بر عهده دارد. این ژن فقط در دوران جنینی بیان می‌شود و در دوران بزرگسالی خاموش است [۱۱]. تحقیقات Zhang و همکارانش در سال ۲۰۰۸، لیستی از ژن‌های دارای توالی مستعد چهاررشته شدن را بصورت پایگاه اطلاعاتی بنام Geglist مطرح کرد که در آن، ناحیه پروموتری ژن *WT1* برای اولین بار ذکر شده بود [۸].

توالی‌های غنی از گوانین مانند *WT21* با توانایی بالقوه در تشکیل ساختار چهاررشته، در نواحی مختلفی از ژنوم دیده شده است. یافته‌ها در مورد تکرار و پراکندگی این توالی‌ها، نقش تنظیمی چندگانه برای آنها را پیشنهاد می‌کند. علاوه بر این، تحقیقات اخیر نشان داده‌اند که این توالی‌ها بصورت شگفت انگیزی در جمعیت انسان‌ها از لحاظ جایگاه و توالی حفظ شده‌اند [۱۲]. این پراکندگی برنامه‌ریزی شده در این توالی‌ها و همچنین حفظ شدن جایگاه آنها در طول تکامل، این فرضیه را که این توالی‌های مستعد چهاررشته شدن، باید یک یا چند نقش تنظیمی مثبت در سلول ایفا نمایند، پیشنهاد می‌دهد؛ بویژه تعدد این توالی‌های مستعد چهاررشته شدن در نزدیکی پروموتر ژن‌ها، حاکی از اثر بالقوه این ساختارها در تنظیم بیان ژن است [۱۲].

الف

Gene Information	
Gene ID: S77896.1	Number of Products: 1
Gene Symbol: *WT1*	Number of poly A Signals:
Gene Size: 1355 nt.	QGRS found: 9
	QGRS found (including overlaps): 427

```
000001 GGGGCTGCCA AACAGAGACT AGATGAAGGG AGTCAGATTT AGCGAACGTC TTCGAGCTCC CAAAGATTCG AACACTAACT CGCGCCCGTG GGCCGATGGA
000101 GGTTCTCCCT ACTCCACTCC TTGGTCCCCT TAACTGGCTT CCGCCTCCTG GTCAATCACT GAGCAACCAG AATGGTATCC TCGACCAGGG CCACAGGCAG
000201 TGCTCGGCGG AGTGGCTCCA GGAGTTACCC GCTCCCTGCC GGGCTTCGTA TCCAAACACT CCCCTTCACC CCTCCTCCCC AAACTGGGCG CCAGGATGCT
000301 CCGGCCGGAA TATACTCAGG CTTTGGGCGT TTGCCAAGGG TTTTCTTCCC TCCTAAACTA GCCGCTGTTT TCCCGGCTTA ACCGTAGAAG AATTAGATAT
000401 TCCTCACTGG AAAGGGAAAC TAAGTGCTGC TGACTCCAAT TTTAGGTAGG CGGCAACCGC CTTCCGCTTG GCGCAAACCT CACCAAGTAA ACAACTACTA
000501 GCCGATCGAA ATACGCCCGG CTTATAACTG GTGCAACTCC CGGCCACCCA ACTGAGGGAC GTTCGCCTTC AGTCCCGACC TCTGGAACCC ACAAAGGGCC
000601 ACCTCTTTCC CCAGTGACCC CAAGATCATG GCCACTCCCC TACCCGACAG TTCTAGAAGC AAGAGCCAGA CTCAAGGGTG CAAAGCAAGG GTATACGCTT
000701 CTTTGAAGCT TGACTGAGTT CTTTCTGCGC TTTCCTGAAG TTCCCGCCCT CTTGGAGCCT ACCTGCCCCT CCCTCCAAAC CACTCTTTTA GATTAACAAC
000801 CCCATCTCTA CTCCCACCGC ATTCGACCCT GCCCGGACTC ACTGCTTACC TGAACGGACT CTCCAGTGAG ACGAGGCTCC CACACTGGCG AAGGCCAAGA
000901 AGGGGAGGTG GGGGGAGGGT TGTGCCACAC CGGCCAGCTG AGAGCGCGTG TTGGGTTGAA GAGGAGGGTG TCTCCGAGAG GGACGCTCCC TCGGACCCGC
001001 CCTCACCCCA GCTGCGAGGG CGCCCCCAAG GAGCAGCGCG CGCTGCCTGG CCGGGCTTGG GCTGCTGAGT GAATGGAGCG GCCGAGCCTC CTGGCTCCTC
001101 CTCCTCCCCG CCCGCCGGCC CCTCTTATTT GAGCTTTGGG AAGCTGAGGG CAGCCAGGCA GCTGGGGTAA GGAGTTCAAG GCAGCGCCCA CACCCGGGGG
001201 CTCTCCGCAA CCCGACCGCC TGTCCGCTCC CCCACTTCCC GCCCTCCCTC CCACCTACTC ATTCACCCAC CCACCCACCC AGAGCCGGGA CGGCAGCCCA
001301 GGCGCCCGGG CCCCGCCGTC TCCTCGCCGC GATCCTGGAC TTCCTCTTGC TGCAG
```

ب

QGRS sequences found (overlaps not included)

Position	Length	QGRS	G-Score
188	28	GGGCCACAGGCAGTGCTCGGCGGAGTGG	19
287	22	GGCGCCAGGATGCTCCGGCCGG	16
445	27	GGTAGGCGGCAACCGCCTTCCGCTTGG	6
903	17	GGGAGGTGGGGGGAGGG	38
953	29	GGGTTGAAGAGGAGGGTGTCTCCGAGAGG	12
1053	29	GGGCTTGGGCTGCTGAGTGAATGGAGCGG	11
1139	29	GGAAGCTGAGGGCAGCCAGGCAGCTGGGG	21
1171	30	GGAGTTCAAGGCAGCGCCCACACCCGGGGG	8
1287	23	GGGACGGCAGCCCAGGCGCCCGG	17

تصویر ۱: بررسی توالی پروموتری ژن *WT1* (S77896.1) با نرم‌افزار آنلاین QGRS mapper: (الف)؛ ۹ ناحیه مستعد برای تشکیل ساختار چهاررشته، مشخص شدند که بصورت هایلایت شده نمایش داده شد. ب)؛ مقادیر G-Score برای هر یک از این نواحی نمایش داده شد.

جدول ۱: مشخصات پنج توالی کاندید برای چهاررشته شدن در پروموتر ژن *WT1*

نام	توالی	موقعیت نسبت به کدون شروع	G-Score
WT28	$5'G_3C_2ACAG_2CAGTGCTCG_2CG_2AGTG_2$	۷۸۹- تا ۷۶۱-	۱۹
WT22	$5'G_2CGC_2AG_2ATGCTC_2G_2C_2G_2$	۶۹۰- تا ۶۶۸-	۱۶
WT21	$5'AG_4AG_2TG_6AG_3TT$	۲۵- تا ۸-	۳۸
WT22-b	$5'TG_3A_2GCTGAG_3CAGC_2AG_2CAGCTG_4TA$	۲۱۳+ تا ۲۴۵+	۲۱
WT28	$5'C_2G_3ACG_2CAGC_3AG_2CGC_3G_3CC$	۳۶۱+ تا ۳۸۹+	۱۷

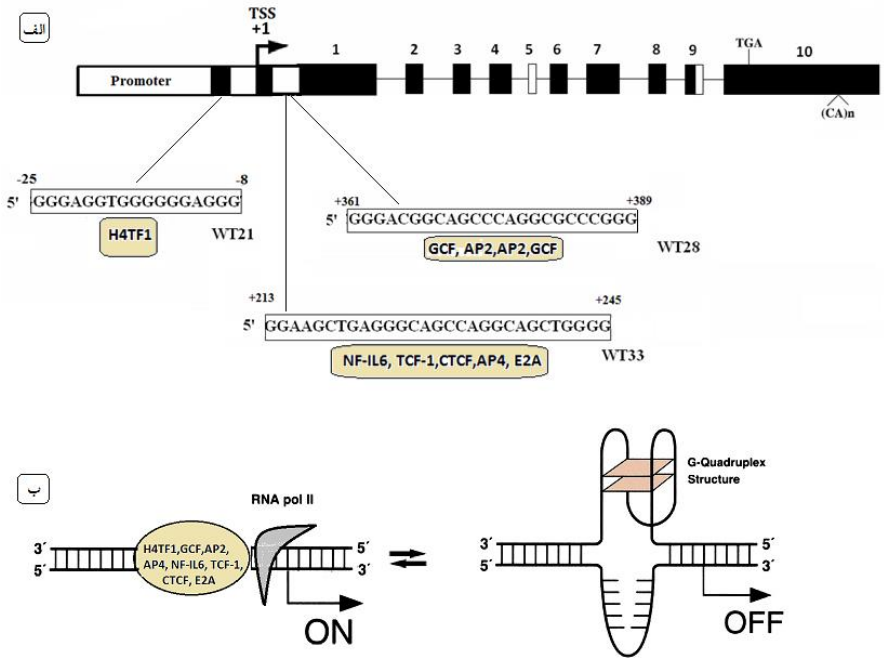
تحقیقات بیوانفورماتیک نشان داده‌اند که پروموتر آنکوژن‌ها و ژن‌هایی مانند ژن‌های فاکتورهای رونویسی، که در سلول نقش تنظیمی دارند، بیشتر از سایرین حاوی این توالی‌های مستعد چهاررشته شدن هستند [۱۳]. ساختارهای چهاررشته‌ای در ۴۰ درصد از ژن‌های ژنوم انسان ممکن است نقشی بصورت عناصر تنظیمی سیس داشته باشند [۱۲]. به این ترتیب، ارتباط بین این توالی‌های بالقوه و عملکرد ژن برجسته شده است. مثلاً مقادیر کمتری از توالی‌های بالقوه در ژن‌های دخیل در گیرنده‌های همراه گوانین، گیرنده حسی، مجتمع شدن نوکلئوزوم، تثبیت اسیدهای نوکلئیک، چرخه یوبیکوئیتین و تقسیم سلولی، گزارش شده درحالیکه مقادیر بالای توالی‌های بالقوه با عملکردهایی مانند تکامل، پاسخ سیستم ایمنی، فعالیت فاکتورهای رونویسی، پاسخ یاخته‌ای، انقباض عضلات، عوامل رشد و سیتوکین‌ها مرتبط است. همچنین برخلاف آنکوژن‌ها که مقادیر بالای توالی‌های بالقوه را دارا هستند، ویژگی ژن‌های سرکوبگر تومور، مقادیر کمتر توالی‌های بالقوه است [۱۴]. مطالعات مختلف روی تعدادی از آنکوژن‌های انسانی این توالی‌های مستعد چهاررشته شدن بصورت حفاظت شده مشاهده شده‌اند. در جدول ۲ این توالی‌ها در چند آنکوژن از جمله *WT1* مقایسه شد.

در سال ۱۹۹۴ فریزر و همکارانش با استفاده از نتایج مطالعات هوفمن، فاکتورهای رونویسی و جایگاه آنها را روی توالی پروموتری ژن *WT1* مشخص کردند [۱۵]. بیشترین فعالیت پروموتری برای این ژن بالادست نقطه شروع رونویسی و در جایگاه عناصر غنی از پیورین گزارش شده؛ اگرچه پروموتر *WT1* از لحاظ ساختاری با دیگر ژن‌های سرکوبگر تومور مانند Rb و p53 مشابه و فاقد جعبه CCAAT و TATA است، اما از لحاظ الگوی بیان با این دو ژن فرق دارد و بیانش محدود به کلیه و سیستم تناسلی-ادراری، طحال و بافت خون ساز است. بنابراین پروموتر *WT1* عضو زیررده پروموترهای پلیمراز II است که حاوی چندین جعبه GC بوده و بررسی‌ها نشان داده‌اند که میان‌کنش بین حداقل دوتا از این جعبه‌های GC برای آغاز رونویسی از این ژن لازم است. این گزارش، ناحیه پروموتری در ژن *WT1* را بین نواحی ۲۰۰- تا ۴۵۰+ تأیید نموده است [۱۵]. سه ناحیه *WT21*، *WT33* و*WT28* نیز در همین محدوده واقع هستند (تصویر ۳). در بررسی این ناحیه، چیزی که بسیار برای ما جالب توجه بود، حضور جایگاه شناسایی تعداد زیادی از فاکتورهای رونویسی در سه ناحیه *WT21*، *WT33* و*WT28* بود که ما برای تشکیل ساختار چهاررشته شناسایی کرده بودیم. توالی *WT21* توسط فاکتور رونویسی H4TF1 شناسایی می‌شود؛ همچنین

دو توالی *WT*33 و *WT*28 نیز جایگاه شناسایی فاکتورهای متعدد رونویسی مانند NF-IL6، TCF-1، CTCF، AP2 و GCF هستند (تصویر ۳). این یافته بسیار برای ما حائز اهمیت بود زیرا تائید نمودند که توالی‌های مستعد چهاررشته شدن در *WT1* دارای نقش تنظیمی در پروموتر این ژن می‌باشند. پس با هدف قرار دادن این توالی‌ها می‌توان در تنظیم بیان این ژن دخالت نمود.

```
GenBank: S77896.1, WT1 {promoter}
GGGGCTGCCA AACAGAGACT AGATGAAGGG AGTCAGATTT AGCGAACGTC TTCGAGCTCC
CAAAGATTCG AACACTAACT CGCGCCCGTG GGCCGATGGA GGTTCTCCCT ACTCCACTCC
TTGGTCCCCT TAACTGGCTT CCGCCTCCTG GTCAATCACT GAGCAACCAG AATGGTATCC
TCGACCAGGG CCACAGGCAG TGCTCGGCGG AGTGGCTCCA GGAGTTACCC GCTCCCTGCC
GGGCTTCGTA TCCAAACACT CCCCTTCACC CCTCCTCCCC AAACTGGGCG CCAGGATGCT
CCGGCCGGAA TATACTCAGG CTTTGGGCGT TTGCCAAGGG TTTTCTTCCC TCCTAAACTA
GCCGCTGTTT TCCCGGCTTA ACCGTAGAAG AATTAGATAT TCCTCACTGG AAAGGGAAAC
TAAGTGCTGC TGACTCCAAT TTTAGGTAGG CGGCAACCGC CTTCCGCTTG GCGCAAACCT
CACCAAGTAA ACAACTACTA GCCGATCGAA ATACGCCCGG CTTATAACTG GTGCAACTCC
CGGCCACCCA ACTGAGGGAC GTTCGCCTTC AGTCCCGACC TCTGGAACCC ACAAAGGGCC
ACCTCTTTCC CCAGTGACCC CAAGATCATG GCCACTCCCC TACCCGACAG TTCTAGAAGC
AAGAGCCAGA CTCAAGGGTG CAAAGCAAGG GTATACGCTT CTTTGAAGCT TGACTGAGTT
CTTTCTGCGC TTTCCTGAAG TTCCCGCCCT CTTGGAGCCT ACCTGCCCCT CCCTCCAAAC
CACTCTTTTA GATTAACAAC CCCATCTCTA CTCCCACCGC ATTCGACCCT GCCCGGACTC
ACTGCTTACC TGAACGGACT CTCCAGTGAG ACGAGGCTCC CACACTGGCG AAGGCCAAGA
AGGGGAGGTG GGGGGAGGGT TGTGCCACAC CGGCCAGCTG AGAGCGCGTG TTGGGTTGAA
GAGGAGGGTG TCTCCGAGAG GGACGCTCCC TCGGACCCGC CCTCACCCCA GCTGCGAGGG
CGCCCCCAAG GAGCAGCGCG CGCTGCCTGG CCGGGCTTGG GCTGCTGAGT GAATGGAGCGG
CCGAGCCTC CTGGCTCCTC CTCCTCCCCG CCCGCCGGCC CCTCTTATTT GAGCTTTG
GGAAGCTGAGGG CAGCCAGGCA GCTGGGGTAA GGAGTTCAAG GCAGCGCCCA CACCCGGGGG
CTCTCCGCAA CCCGACCGCC TGTCCGCTCC CCCACTTCCC GCCCTCCCTC CCACCTACTC
ATTCACCCAC CCACCCACCC AGAGCCGGGA CGGCAGCCCA GGCGCCCGGG CCCCGCCGTC
TCCTCGCCGC GATCCTGGAC TTCCTCTTGC TGCAG
```

تصویر ۲: توالی نوکلئوتیدی پروموتری ژن *WT1*: جایگاه کدون شروع با فلش مشخص شد. توالی *WT*21 (____)، *WT*33 (_ _) و *WT*28 (....) نیز با کادر مشخص می‌باشند.



تصویر ۳: تصویری شماتیک از آرایش ژنی، اگزون‌ها و نواحی مستعد در تشکیل ساختار چهاررشته در ژن *WT1*: (الف)؛ آرایش ژنی ژن *WT1* شامل ۱۰ اگزون و جایگاه آغاز رونویسی (TSS) نمایش داده شده. رشته غنی از گوانین در ناحیه پروموتری این ژن، سه ناحیه مستعد برای تشکیل ساختار چهاررشته وجود دارد که *WT*21، *WT*33 و *WT*28 نامگذاری شد. جایگاه فاکتورهای رونویسی روی هر یک از این توالی‌ها نشان داده شد. (ب): در صورت عدم تشکیل ساختار چهاررشته با قرار گرفتن فاکتورهای رونویسی در جایگاه خود و در حضور آنزیم RNA پلیمراز II رونویسی انجام می‌شود. اما در صورت تشکیل و پایدار شدن ساختار چهاررشته پروموتری، امکان قرار گرفتن فاکتورهای رونویسی و شناسایی پروموتر توسط RNA پلیمراز II فراهم نشده و رونویسی مهار می‌شود.

جدول ۲: مقایسه توالی مستعد برای تشکیل ساختار چهاررشته در پروموتر آنکوژن‌های مختلف

ژن	توالی							منبع
c-myc	GGG	A	GGG	TG	GGG	A	5'GGG	[۷]
VEGF	GGG	T	GGG	GA	GGG	T	5'GGG	[۱۶, ۱۷]
PDGFB	GGG	T	GGG	GA	GGG	CTCT	5'GGG	[۱۸, ۱۹]
RET	GGG	C	GGG	GCG	GGG	C	5'GGG	[۲۰, ۲۱]
Hif-1a	GGG	A	GGGA	GAGAGG	GGG	C	5'GGG	[۲۲]
k-ras	GGG	AGA	GGG	AGA	GGG	G	5'GGG	[۲۳]
WT1	GGG	AGGT	GGG	-	GGG	A	5'GGG	مطالعه اخیر

روش‌های بیوانفورماتیک برای تعیین ساختار دوم اسید نوکلئیک دهه‌هاست که بکار گرفته شده است. با این حال با کشف اهمیت زیستی ساختار چهاررشته‌ای گوانینی، واضح است که برای پیش‌بینی حضورشان در ژنوم نیاز به ابزار خاص است. اگر چه برنامه آنلاین M-fold برای پیش بینی ساختار دوم DNA و RNA قدرتمند است اما توانایی پیش‌بینی ساختار چهاررشته‌ای گوانینی را ندارد.

نقشه بردار توالی‌های غنی از گوانین سازنده ساختار چهاررشته، یک ابزار آنلاین کاربرپسند است که می‌تواند به پیش‌بینی ساختار چهاررشته‌ای گوانینی بپردازد. اگر چه این نرم افزار یک ابزار مفید برای پیش بینی است، ولی قادر به پیش بینی همگی ساختارهای چهاررشته نیست و ممکن است توالی‌های مستعدی باشند که نقشه بردار QGRS قادر به پیش بینی آن نشده باشد. به همین دلیل نقشه بردار QGRS، و ابزارهای مشابه، فقط باید پله اول بررسی باشند و نه ابزار تعیین کننده. به منظور رسیدن به شواهدی قانع کننده در وجود ساختار چهاررشته، مطالعات بیوفیزیکی و بیوشیمیایی مورد نیاز هستند. علاوه بر این می‌توان با استفاده از روش‌های کشت سلول و بررسی سطح رونویسی از ژن مورد نظر، میزان رونویسی از ژن را در صورت تشکیل یا عدم تشکیل ساختار چهاررشته مقایسه نمود.

نتیجه‌گیری

بررسی‌های بیوانفورماتیکی نشان داده که توالی‌های مستعد چهاررشته شدن بیشتر در مناطق پروموتری آنکوژن‌ها واقع شده‌اند و دانشمندان را به این سو هدایت کرده که این ساختارها ممکن است دارای نقش مهم تنظیمی در شرایط درون سلول باشند. شکل‌گیری ساختار چهاررشته در پروموتر ژن *WT1*، می‌تواند رونویسی از این ژن را بصورت منفی تحت تأثیر قرار دهد یعنی با تشکیل ساختار چهاررشته در ناحیه پروموتری ژن *WT1*، جایگاه شناسایی هر یک از این فاکتورهای رونویسی ممکن است مهار شده و سطح رونویسی از ژن کاهش یابد. پس با شناسایی و هدف قرار دادن این توالی‌ها در نواحی تنظیمی ژن‌ها، می‌توان بیان آن ژن را کنترل نمود.

بنابراین در قدم اول، مطالعات بیوانفورماتیکی از لحاظ تشخیص موتیف‌های بالقوه در ژنوم انسان که قابلیت تبدیل به اهداف درمانی را دارند، بسیار باارزش است. اگرچه الگوهای مطالعات جدید تاحدی این ساختارها را مکان یابی کرده است اما در واقع ممکن است تعداد توالی‌های بالقوه در تشکیل ساختار چهاررشته بسیار بالاتر و حتی فراتر از انتظار باشد.

References

1. Arnott S, Chandrasekaran R, Hukins DW, Smith PJ, Watts L. Structural details of double-helix observed for DNAs containing alternating purine and pyrimidine sequences. J Mol Biol. 1974;88(2):523-33. pmid: 4453006
2. Strahan GD, Shafer RH, Keniry MA. Structural properties of the [d(G3T4G3)]2 quadruplex: evidence for sequential syn-syn deoxyguanosines. Nucleic Acids Res. 1994;22(24):5447-55. pmid: 7816637
3. Esposito V, Galeone A, Mayol L, Oliviero G, Virgilio A, Randazzo L. A topological classification of G-quadruplex structures. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids. 2007;26(8-9):1155-9. doi: 10.1080/15257770701527059 pmid: 18058556
4. Han H, Hurley LH. G-quadruplex DNA: a potential target for anti-cancer drug design. Trends Pharmacol Sci. 2000;21(4):136-42. pmid: 10740289
5. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. Nature. 1991;350(6319):569-73. doi: 10.1038/350569a0 pmid: 1708110
6. Williamson JR. G-quartet structures in telomeric DNA. Annu Rev Biophys Biomol Struct. 1994;23:703-30. doi: 10.1146/annurev.bb.23.060194.003415 pmid: 7919797
7. Siddiqui-Jain A, Grand CL, Bearss DJ, Hurley LH. Direct evidence for a G-quadruplex in a promoter region and its targeting with a small molecule to repress c-MYC transcription. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002;99(18):11593-8. doi: 10.1073/pnas.182256799 pmid: 12195017
8. Zhang R, Lin Y, Zhang CT. Greglist: a database listing potential G-quadruplex regulated genes. Nucleic Acids Res. 2008;36(Database issue):D372-6. doi: 10.1093/nar/gkm787 pmid: 17916572
9. Kikin O, D'Antonio L, Bagga PS. QGRS Mapper: a web-based server for predicting G-quadruplexes in nucleotide sequences. Nucleic Acids Res. 2006;34(Web Server issue):W676-82. doi: 10.1093/nar/gkl253 pmid: 16845096
10. Hofmann W, Royer HD, Drechsler M, Schneider S, Royer-Pokora B. Characterization of the transcriptional regulatory region of the human *WT1* gene. Oncogene. 1993;8(11):3123-32. pmid: 8414514
11. Rosenfeld C, Cheever MA, Gaiger A. *WT1* in acute leukemia, chronic myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome: therapeutic potential of *WT1* targeted therapies. Leukemia. 2003;17(7):1301-12. doi: 10.1038/sj.leu.2402988 pmid: 12835718
12. Huppert JL, Balasubramanian S. G-quadruplexes in promoters throughout the human genome. Nucleic Acids Res. 2007;35(2):406-13. doi: 10.1093/nar/gkl1057 pmid: 17169996
13. Huppert JL. Hunting G-quadruplexes. Biochimie. 2008;90(8):1140-8. doi: 10.1016/j.biochi.2008.01.014 pmid: 18294969
14. Eddy J, Maizels N. Gene function correlates with potential for G4 DNA formation in the human genome. Nucleic Acids Res. 2006;34(14):3887-96. doi: 10.1093/nar/gkl529 pmid: 16914419
15. Fraizer GC, Wu YJ, Hewitt SM, Maity T, Ton CC, Huff V, et al. Transcriptional regulation of the human Wilms' tumor gene (*WT1*). Cell type-specific enhancer and promiscuous promoter. J Biol Chem. 1994;269(12):8892-900. pmid: 8132626
16. Sun D, Guo K, Rusche JJ, Hurley LH. Facilitation of a structural transition in the polypurine/polypyrimidine tract within the proximal promoter region of the human VEGF gene by the

presence of potassium and G-quadruplex-interactive agents. Nucleic Acids Res. 2005;33(18):6070-80. doi: 10.1093/nar/gki917 pmid: 16239639

17. Agrawal P, Hatzakis E, Guo K, Carver M, Yang D. Solution structure of the major G-quadruplex formed in the human VEGF promoter in K+: insights into loop interactions of the parallel G-quadruplexes. Nucleic Acids Res. 2013;41(22):10584-92. doi: 10.1093/nar/gkt784 pmid: 24005038
18. Qin Y, Rezler EM, Gokhale V, Sun D, Hurley LH. Characterization of the G-quadruplexes in the duplex nuclease hypersensitive element of the PDGF-A promoter and modulation of PDGF-A promoter activity by TMPyP4. Nucleic Acids Res. 2007;35(22):7698-713. doi: 10.1093/nar/gkm538 pmid: 17984069
19. Chen Y, Agrawal P, Brown RV, Hatzakis E, Hurley L, Yang D. The major G-quadruplex formed in the human platelet-derived growth factor receptor beta promoter adopts a novel broken-strand structure in K+ solution. J Am Chem Soc. 2012;134(32):13220-3. doi: 10.1021/ja305764d pmid: 22866911
20. Sun D, Pourpak A, Beetz K, Hurley L, editors. Direct evidence for the formation of G-quadruplex in the proximal promoter region of the RET protooncogene and its targeting with a small molecule to repress RET protooncogene transcription. Clinical cancer research; 2003; American association for cancer research.
21. Tong X, Lan W, Zhang X, Wu H, Liu M, Cao C. Solution structure of all parallel G-quadruplex formed by the oncogene RET promoter sequence. Nucleic Acids Res. 2011;39(15):6753-63. doi: 10.1093/nar/gkr233 pmid: 21540209
22. De Armond R, Wood S, Sun D, Hurley LH, Ebbinghaus SW. Evidence for the presence of a guanine quadruplex forming region within a polypurine tract of the hypoxia inducible factor 1alpha promoter. Biochemistry. 2005;44(49):16341-50. doi: 10.1021/bi051618u pmid: 16331995
23. Cogoi S, Paramasivam M, Membrino A, Yokoyama KK, Xodo LE. The KRAS promoter responds to Myc-associated zinc finger and poly(ADP-ribose) polymerase 1 proteins, which recognize a critical quadruplex-forming GA-element. J Biol Chem. 2010;285(29):22003-16. doi: 10.1074/jbc.M110.101923 pmid: 20457603