

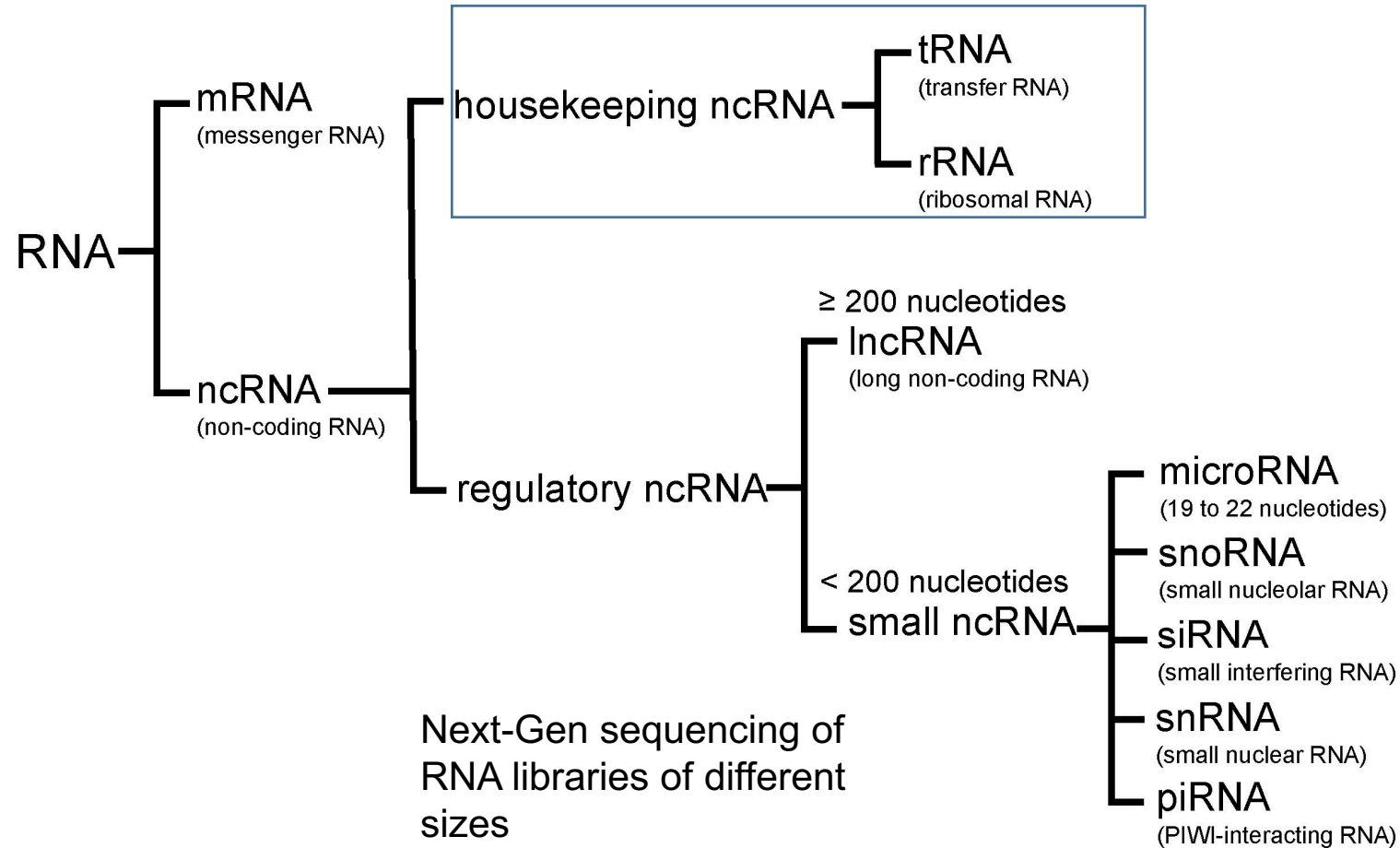
Ο κόσμος του RNA

- Το κεντρικό δόγμα στη Βιολογία παρέσυρε για αρκετό καιρό τους επιστήμονες να θεωρούν ότι τα γονίδια κωδικοποιούν πρωτεΐνες και οι πρωτεΐνες επιτελούν όχι μόνο όλες τις δομικές και καταλυτικές λειτουργίες στο κύτταρο αλλά και σχεδόν όλες τις ρυθμιστικές λειτουργίες.
- Αυτό μπορεί να είναι ουσιαστικά αλήθεια για τους προκαρυωτικούς οργανισμούς.
- Δεν αληθεύει στους ανώτερους οργανισμούς όπου οι αλληλουχίες που κωδικοποιούν πρωτεΐνες είναι ένα πολύ μικρό ποσοστό τους συνολικού γονιδιώματος τους.
- Το RNA αποτελεί ένα ιδανικό μόριο για τη ρύθμιση βιολογικών κυκλωμάτων εξαιτίας της ιδιότητας τους να αποθηκεύει γενετική πληροφορία και της δομικής του πλαστικότητας του.

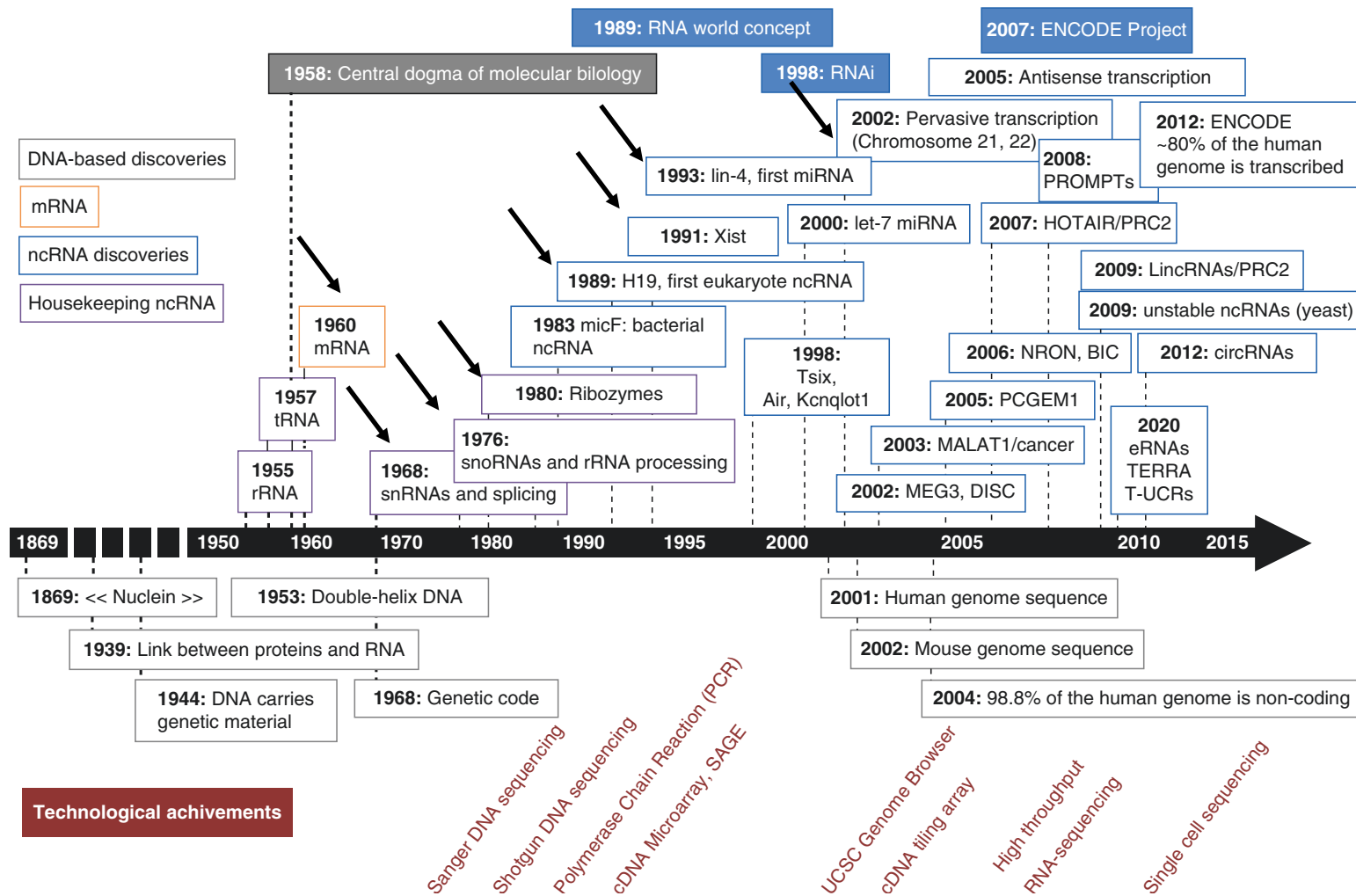
Διακυτταρική επικοινωνία

- Τα μη-κωδικοποιά RNAs (non-coding RNAs) έχουν σημαντικό ρόλο στη διακυτταρική επικοινωνία με αποτέλεσμα να θεωρούνται πλέον ως ρυθμιστές, ιστών, της αλληλοεπίδρασης ιστών σε επίπεδο οργανισμού αλλά και της αλληλοεπίδρασης διαφορετικών οργανισμών μεταξύ τους.
- Υπάρχει μια κοινή και κεντρική βιολογική γλώσσα που αντιπροσωπεύεται από τα μόρια RNA.
- Μέσα στους οργανισμούς, τα κύτταρα μπορούν να εκκρίνουν ncRNAs τα οποία μπορούν να «ταξιδέψουν» χρησιμοποιώντας τα βιολογικά υγρά ώστε να φτάσουν σε μακρινούς στόχους και τα επιπλέσουν τη ρυθμιστική τους λειτουργία, δρώντας ως «γενετικές ορμόνες»
- Σε παθολογικές καταστάσεις αυτό σημαίνει ότι τα ncRNAs μπορούν να εμποδίσουν ή να ευνοήσουν την εξάπλωση μιας ασθένειας.
- Διάφοροι παρασιτικοί οργανισμοί, όπως ιοί, βακτήρια και μύκητες μπορούν να πραγματοποιήσουν «πειρατεία» στους μηχανισμούς άμυνας του ξενιστή, μέσω των ncRNAs. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να παρατηρηθεί και σε σχέσεις συμβίωσης

Κατηγορίες μη-κωδικοποιών RNAs



Χρονοδιάγραμμα των σημαντικότερων ανακαλύψεων της βιολογίας των ριβονουκλεϊκών οξέων, στους ευκαρυώτες



Μεθοδολογίες ανίχνευσης νέων γονιδίων

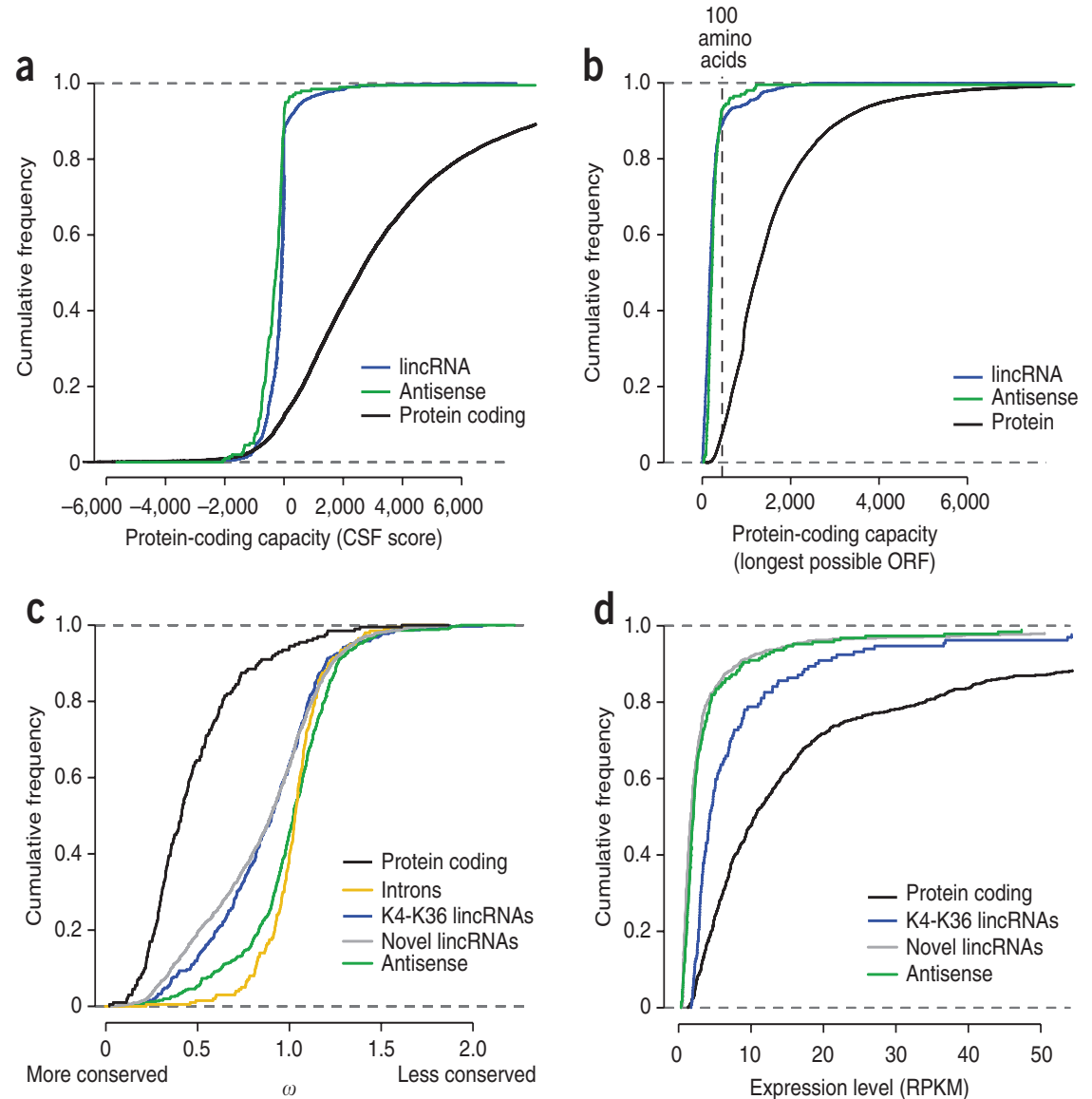
Table 1 | High-throughput technology used for transcriptome analyses

Technique	Principle	Aim	Organism	Main references
SAGE	Reverse transcription to cDNA of the transcriptome Short sequence tag production from unique poly(A)+ transcripts Cloning and sequencing of sequence tag arrays Quantitation of tag recovery	Quantitative gene expression data without prerequisite of sequence knowledge	<i>S. cerevisiae</i>	Velculescu <i>et al</i> , 1997
3'-long SAGE	Similar to SAGE Introduction of a recognition site for a IIS restriction enzyme at the 3' end of cDNA, recovery of 3' end tags High-throughput sequencing	Identification of 3' ends Distinction between overlapping transcripts	<i>S. cerevisiae</i>	Neil <i>et al</i> , 2009
CAGE	Similar to SAGE but from CAP-selected RNAs	Identification of transcription start sites	Mouse Human	Carninci <i>et al</i> , 2006
ASSAGE	Similar to SAGE RNA treatment with bisulphite (changes cytosine residues to uracil) before reverse transcription	Unambiguous strand specificity	Human	He <i>et al</i> , 2008
RNA-Seq	Reverse transcription to cDNA of poly(A)+ RNA High-throughput sequencing	Quantitative transcriptome data High sensitivity, low background, high resolution	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i>	Nagalakshimi <i>et al</i> , 2008; Wilhelm <i>et al</i> , 2008
GRO-seq	Extension of nascent RNA associated with engaged RNAPII (nuclear run-on) Isolation and purification of the RNAs Reverse transcription to cDNA High-throughput sequencing	Genome-wide positional mapping, determination of transcript amount, orientation of engaged RNAPII	Human	Core <i>et al</i> , 2008
High-resolution tiling arrays	Reverse transcription of total or selected RNA followed by hybridization on DNA chip Probes overlap and cover the entire genome	Quantitative transcriptome data from sequenced genomes Strand specific	<i>S. cerevisiae</i> <i>S. pombe</i> Rice Human	David <i>et al</i> , 2006; Xu <i>et al</i> , 2009; Dutrow <i>et al</i> , 2008; Wilhelm <i>et al</i> , 2008; L. Li <i>et al</i> , 2006; Kapranov <i>et al</i> , 2007a; Preker <i>et al</i> , 2008
ChIP-chip	Chromatin immunoprecipitation of RNAPII and TFs Hybridization on DNA array	Mapping of chromatin-bound RNAPII and TFs, genome-wide	<i>S. cerevisiae</i> Human	Steinmetz <i>et al</i> , 2006; Kim <i>et al</i> , 2005
ChIP-Seq	Chromatin immunoprecipitation of RNAPII High-throughput sequencing	Mapping of chromatin-bound RNAPII, also at low complexity sequences (such as telomeres and transposons)	Mouse	Seila <i>et al</i> , 2008

The techniques used in the ENCODE and FANTOM projects are not detailed. RNAPII, RNA polymerase II; *S. cerevisiae*, *Saccharomyces cerevisiae*; *S. pombe*, *Schizosaccharomyces pombe*; TF, transcription factor.

Χαρακτηριστικά μακρών μη-κωδικοποιών RNAs

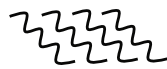
- Σύντομα (100-300nt) ή ανύπαρκτα ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης
- Μη συντηρημένα ή συντηρημένα αλλιώς (δευτεροταγής και τριτοταγής δομή, π.χ. tRNA)
- Κατά μέσο όρο 10 φορές λιγότερα επίπεδα έκφρασης σε σχέση με τα κωδικοποιά.



Αλληλουχοποίηση RNA επόμενης γενιάς

Total RNA or small RNA

RNA extraction



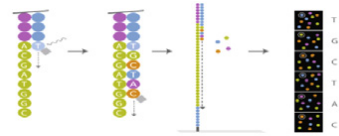
PolyA selection / rRNA depletion
Retain strand information (stranded)

Library preparation



Paired-end / single-end

Sequence



Alignment algorithm

Align reads to a reference genome



Assembly algorithm

Assemble transcripts



Reference gene set

Remove protein coding transcripts

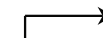


■ Sense read
■ Antisense read

Unstranded library



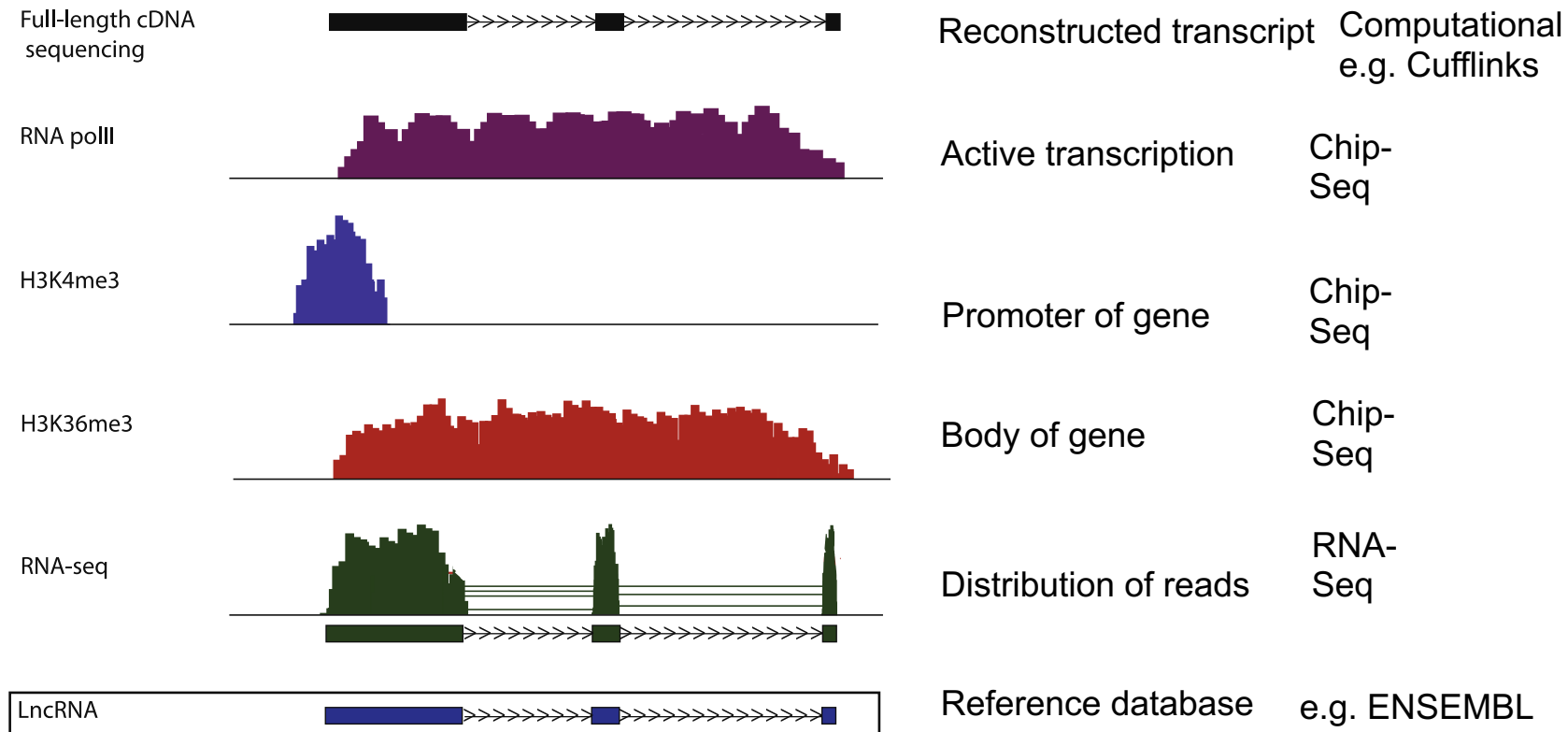
Stranded library



■ Unknown antisense lncRNA
■ Known protein coding transcript

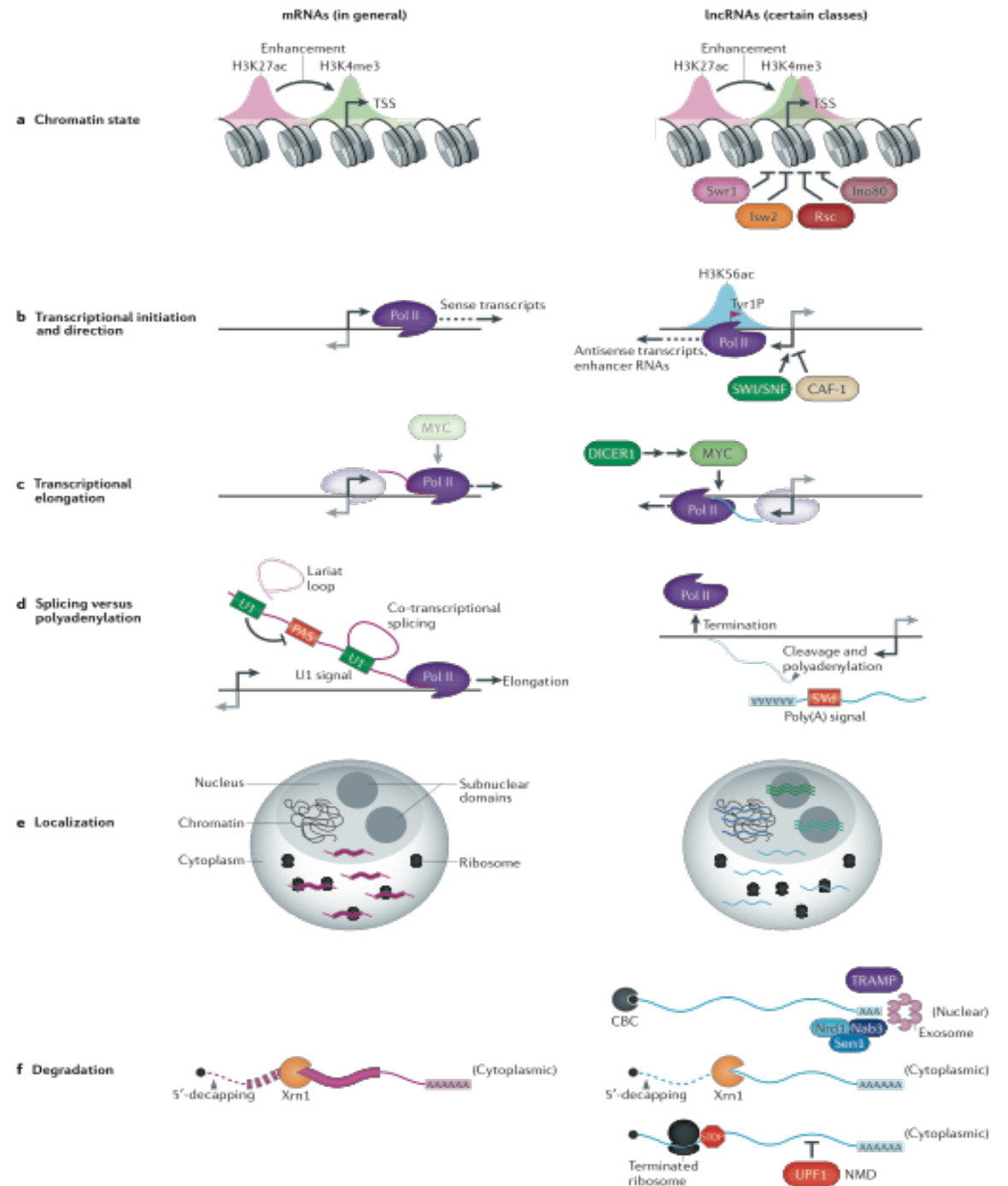
- RNA library preparation by size selection of RNA fragments of interest (small ncRNAs <200nts or lncRNAs > 200nts)
- Ribosomal RNA depletion is necessary
- Paired-end sequencing is preferred as ncRNAs are enriched for repetitive elements.
- Directionality is important to discover ncRNAs species around coding genes!
- Depth of sequencing is critical for ncRNA identification and characterization

Διαδεδομένες τεχνικές για την πρόβλεψη και σχολιασμό γονιδιακών τόπων lncRNA με NGS



Ομοιότητες/Διαφορές mRNAs και lncRNAs

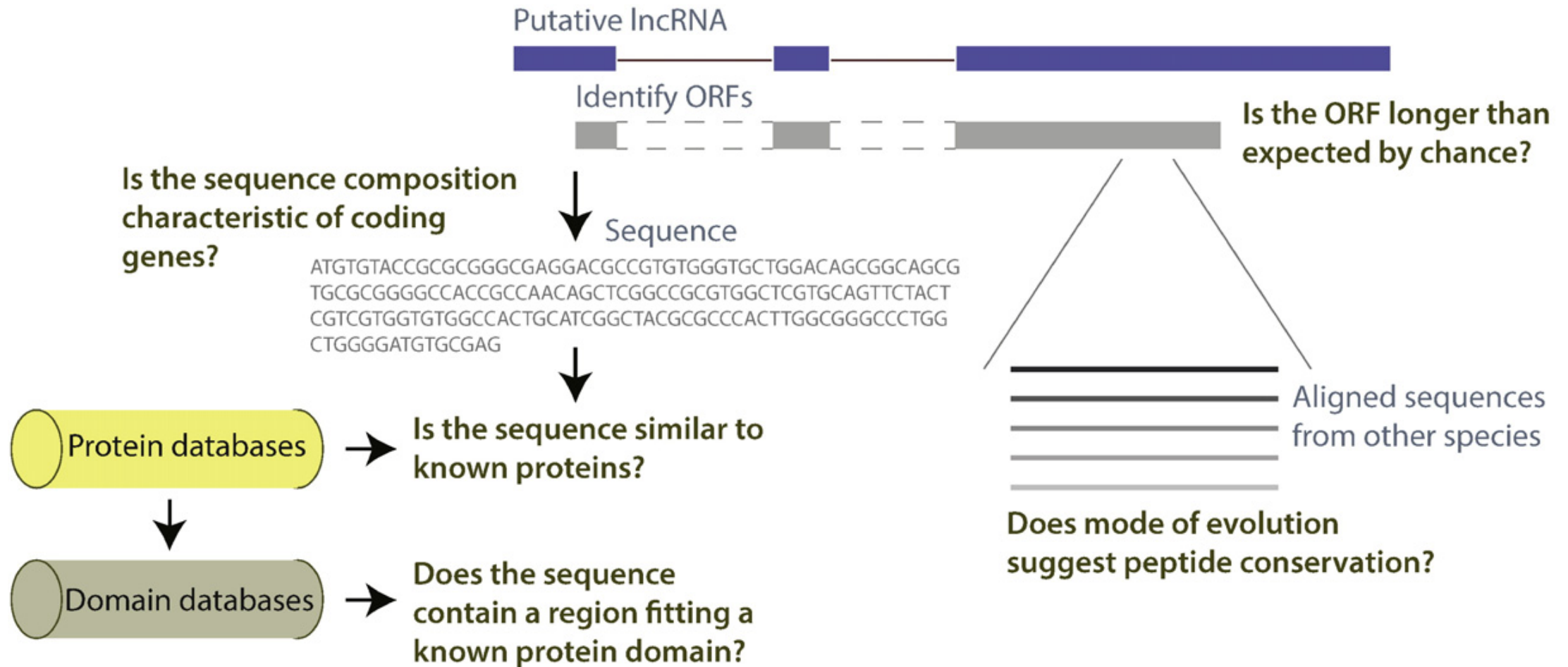
- Like mRNAs, many lncRNAs are transcribed by RNA polymerase II (Pol II) from genomic loci with similar chromatin states to mRNAs
- They are often 5' capped, spliced and polyadenylated;
- They expressed at relatively low levels and exhibit poor primary sequence conservation
- Located in all sub-cellular compartments
- In most instances, they lack any biochemical distinction from mRNAs besides the absence of a translated ORF.



Υπολογιστικοί μέθοδοι για τη διάκριση μεταξύ mRNAs και lncRNAs γονιδίων

- Το μήκος του ανοιχτού πλαισίου ανάγνωσης (>300 νουκλεοτίδια ώστε να μην θεωρείται τυχαίο)
- Η σύσταση νουκλεοτιδίων, κωδικονίων (σε σχέση με τα mRNAs του κάθε οργανισμού).
- Η συχνότητα και η τοποθεσία σημειακών μεταλλάξεων (σύσταση αμινοξέων σε σχέση με τα mRNAs του κάθε οργανισμού).
- Η παρουσία αλληλουχιών που κωδικοποιούν λειτουργικές δομικές περιοχές πρωτεϊνών (Pfam)
- Ομολογία με αλληλουχίες γνωστών πρωτεϊνών (GenBank, Ensembl) - συνήθως δεν αρκεί καθώς πρέπει να υπάρχει και το απαραίτητο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης.
- Άλλα κριτήρια - Βαθμός συντήρησης (τα lncRNAs εξελίσσονται πιο γρήγορα -> λιγότερο συντηρημένα από τα mRNAs – ωστόσο υπάρχουν αρκετές εξαιρέσεις)

Υπολογιστικοί μέθοδοι για τη διάκριση μεταξύ mRNAs και lncRNAs γονιδίων



Παραδείγματα γονιδίων που δεν περνάνε ένα από τα κριτήρια ώστε να χαρακτηριστούν ως lncRNAs

A reconstructed transcript at chr9:139,141,488-139,168,372 |-----| 10 kb



LINC00371 |-----| 10 kb



RP11-460N11.2 |-----| 1 kb



```
#HMM      r kHtgekpyeCplCgktFk
#MATCH   r Htgek++C+ Cg+ F
#PP      67*****996
#SEQ     SRHTGBKPPKCKBCGQFP
```

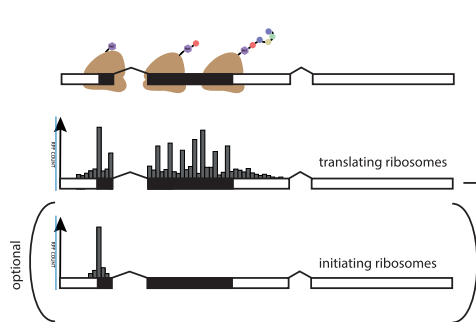
```
#HMM      nLrHlrkHtgekpyeCplCgktFkt
#MATCH   +Lr H+ Ht ekpy+C+ gk Fk+
#PP      79*****85
#SEQ     HLRQHQLHTBEKPYQCBEYGKDFK
```

```
#HMM      LrHlrkHtgekpyeCplCgktFkt
#MATCH   L+ H r Ht+e+py+C+ C+k+Fk+
#PP      778889*****95
#SEQ     LTIHGRIHTKERPYKCEECDKAFK
```

Πειραματικές μεθοδολογίες σχολιασμού μακρών μη-κωδικοποιών RNAs

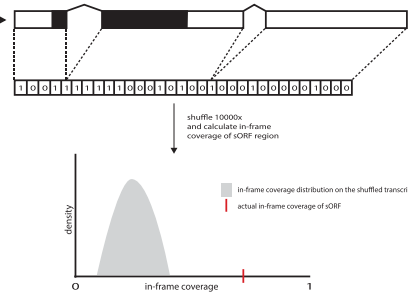
Ribosome-Sequencing

TIS-calling



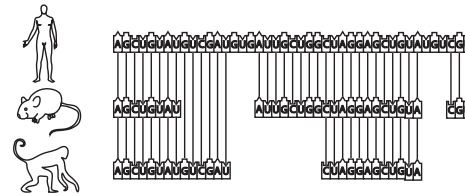
Computational filtering based on statistical characteristic of PCGs

noise filtering



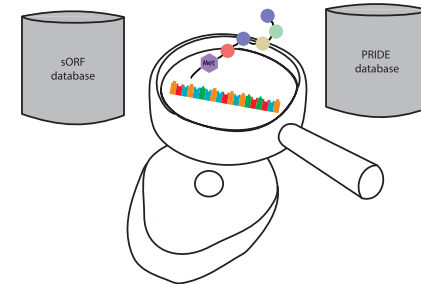
Computational annotation (alignment across species)

inner-BLAST

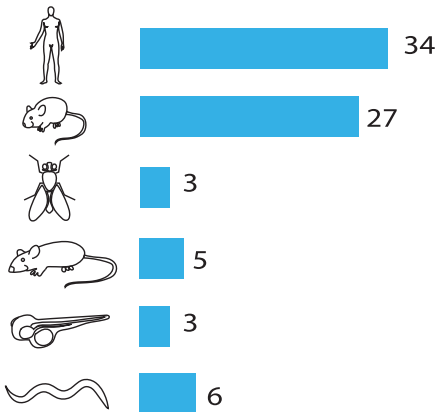


Peptides from Mass Spec data

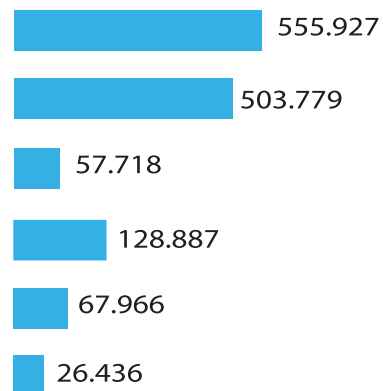
PRIDE-ReSpin



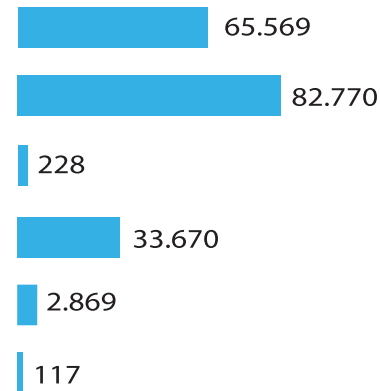
datasets



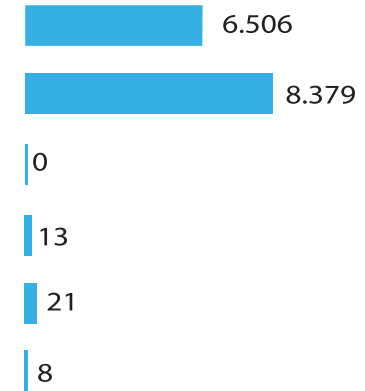
unique sORFs



sORFs with sequence similarity



PRIDE-ReSpin sORFs



Αποτελούνται από: Κανονικά και μη-κανονικά μικρά RNAs

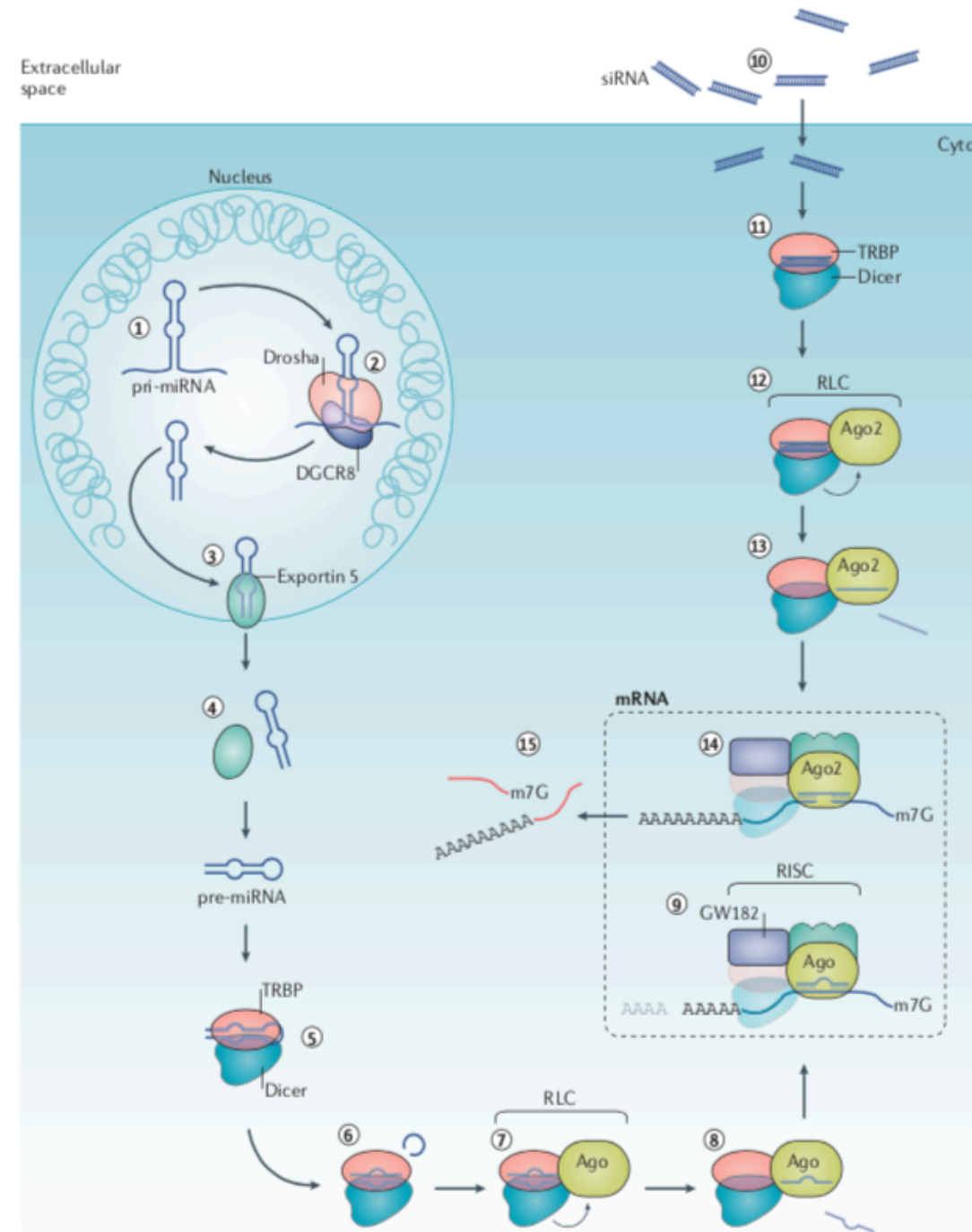
- Κανονικά μικρά RNAs:
 - Ribosomal RNAs
 - Small nuclear RNAs (snRNAs)
 - Small nucleolar RNAs (snoRNAs)
 - microRNAs (miRNAs),
 - endogenous small interfering RNAs (siRNAs)
So far, endogenous siRNAs have not been identified in mammals.
 - Piwi-interacting RNAs (piRNAs)
- Μη-κανονικά RNAs:
 - Promoter-associated small RNAs (PASRs)
 - transcription start site associated RNAs (TSSa-RNAs)
 - transcription initiation RNAs (tiRNAs)

Βιογένεση των μικροRNAs (microRNA, miRNA)

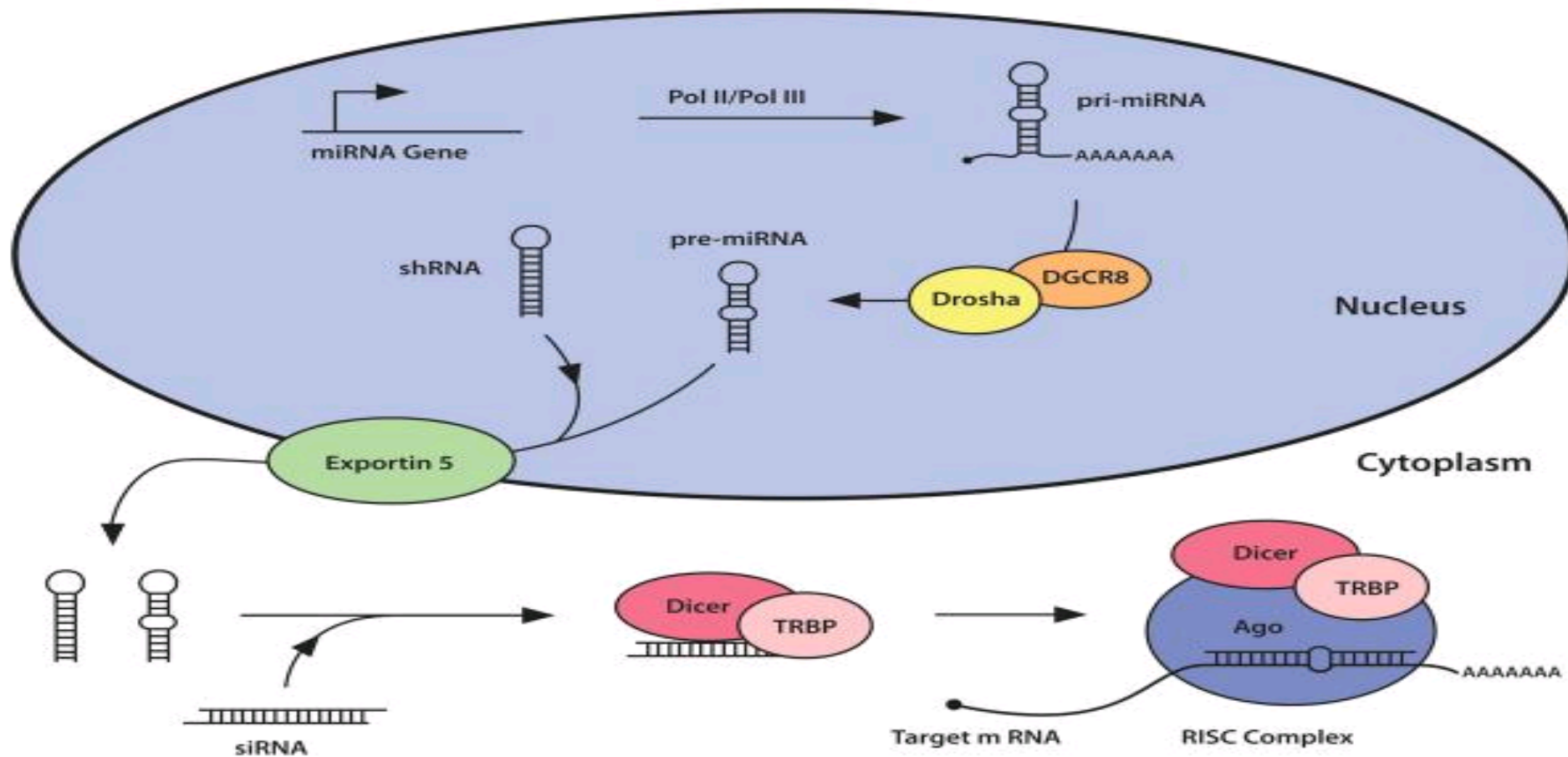
- Τα miRNAs είναι μονόκλιωνα RNAs (ssRNAs) μήκους ~22 nt που δημιουργούνται από ενδογενή μετάγραφα σε σχήμα φουρκέτας.
- Τα miRNAs λειτουργούν ως μόρια οδηγοί στη μετε-μεταγραφική ρύθμιση της γονιδιακής ρύθμισης μέσω ζευγαρώματος βάσεων με τα mRNAs στόχους, συνήθως στη 3' μη-μεταφραστική περιοχή (3' 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.

Μονοπάτια βιογένεσης των miRNAs και επεξεργασίας των συνθετικών

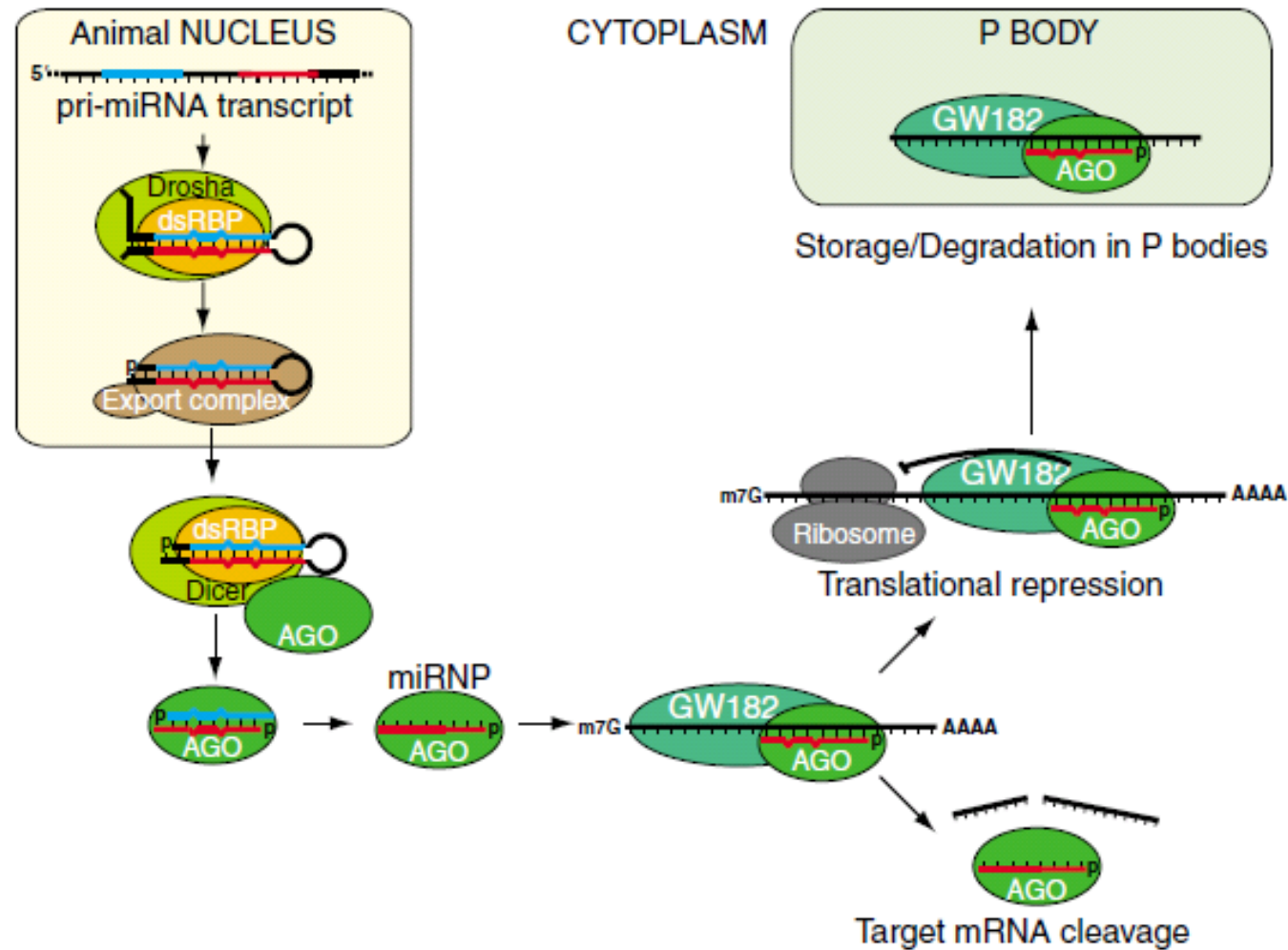
(1) Στα θηλαστικά, τα πρωτογενή microRNA (primary microRNA, pri-miRNA) (pri-miRNA) μεταγράφονται στον πυρήνα και κόβονται από το σύμπλοκο του μικροεπεξεργαστή (Drosha-DGCR8) ώστε να παράγει (~30 bp) μικρές φουρκέτες RNAs (shRNAs) που ονομάζονται pre-miRNA. (3) Η Exportin 5 προσδένει και μεταφέρει τα pre-miRNA στο κυτταρόπλασμα (4) όπου και αποδεσμεύονται από την exportin (6) Η Dicer αποκόπτει τον τερματικό βρόχο του pre-miRNA (7) και επάγει τη δημιουργία του συμπλόκου ενεργοποίησης από RNA και αποσιώπησης (RNA-induced silencing complex, RISC) – συμπλόκου φόρτωσης (loading complex, RLC) με μία από τις πρωτεΐνες Argonaute (Ago1–Ago4). (8) Μία αλυσίδα οδηγός (αντινοσηματική, antisense) επιλέγεται και φορτώνεται στις Ago1–Ago4 και η αλυσίδα επιβάτης απορρίπτεται (9) Το ώριμο RISC μπορεί να ρυθμίσει τη γονιδιακή έκφραση αναστέλλοντας τη μετάφραση του mRNA, επάγοντας κατακράτηση του σε κυτταροπλασματικά οργανίδια χωρίς μεμβράνη (σωμάτια P (P-bodies) και/ή σωμάτια GW (GW-bodies), προωθώντας αποικοδόμηση του mRNA και ενορχηστρώνοντας τη γονιδιακή αποσιώπηση του γονιδιακού τόπου υπό στόχευση. Οι πρωτεΐνες Αργοναυτών και GW182 και η αλυσίδα οδηγός είναι απολύτως απαραίτητα για τη γονιδιακή αποσιώπηση. Οι πρωτεΐνες TRBP και DICER αποδεσμεύονται από το ώριμο RISC μετά από τη φόρτωση της αλυσίδας οδηγού. Εφτά (7) βάσεις συμπληρωματικότητας στην περιοχή του πυρήνα στα mRNAs στόχους είναι αρκετές (βάσεις 2–8 από το 5' άκρο) των αλυσίδων οδηγών μπορούν να επηρεαστούν από το μηχανισμό RNAi35. (10) Συνθετικά μικρά παρεμβαλλόμενα RNAs (siRNAs) εισέρχονται στο κυτταρόπλασμα με ενδοκυττάρωση (11) Τα siRNAs στη συνέχεια αλληλοεπιδρούν κατευθείαν με τις πρωτεΐνες του κυτταροπλασματικού (RNAi) (Dicer και TRBP) (12) Για να σχηματιστεί το RLC μέσω μονοπατιών εξαρτημένων από την Dicer (13) και την επιλογή της αλυσίδας οδηγού ώστε να σχηματιστεί το ώριμο and RISC. (14) Οι αλυσίδες οδηγοί siRNA συνήθως έχουν πλήρη συμπληρωματικότητα με ένα mRNA στόχο ώστε να επαχθεί ένα αποτελεσματική αλλά πολύ ειδική γονιδιακή αποσιώπηση (15) Η Ago2 είναι ιδιαίτερα σημαντική στους μηχανισμούς του RNAi επειδή έχει ενδογενή δραστηριότητα «κόφτη»



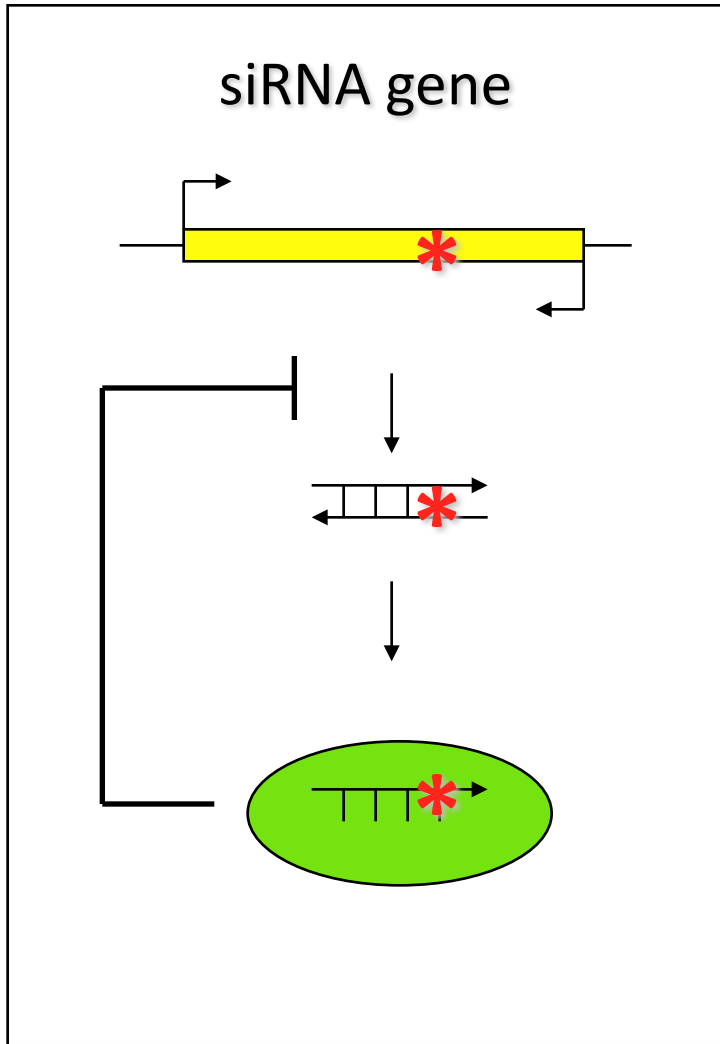
Το μονοπάτι miRNA/siRNA



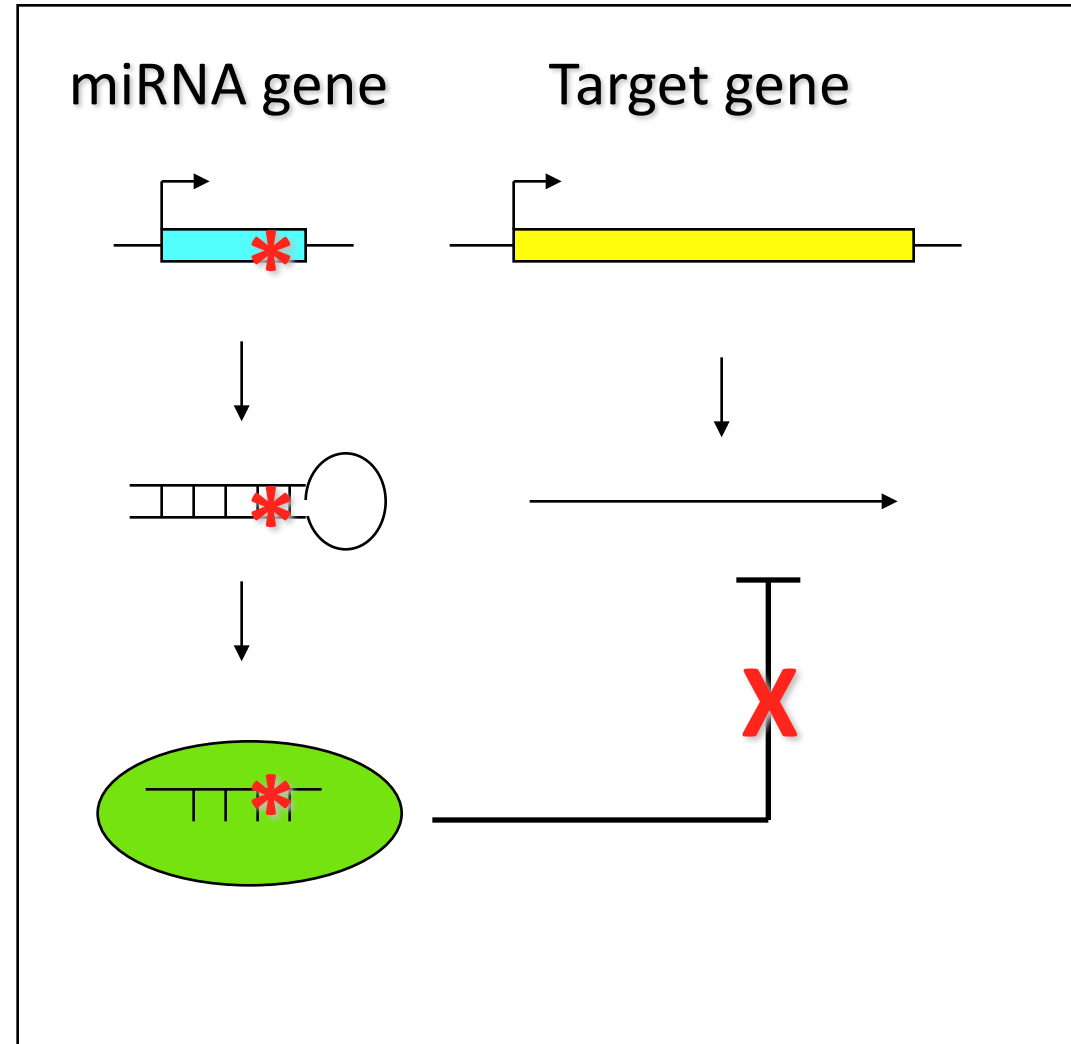
Μετα-μεταγραφική ρύθμιση μέσω miRNAs



Auto- and hetero-silencers evolve at different rates



No conservation



Selection and conservation

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

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

Μέθοδοι αναγνώρισης των miRNAs II

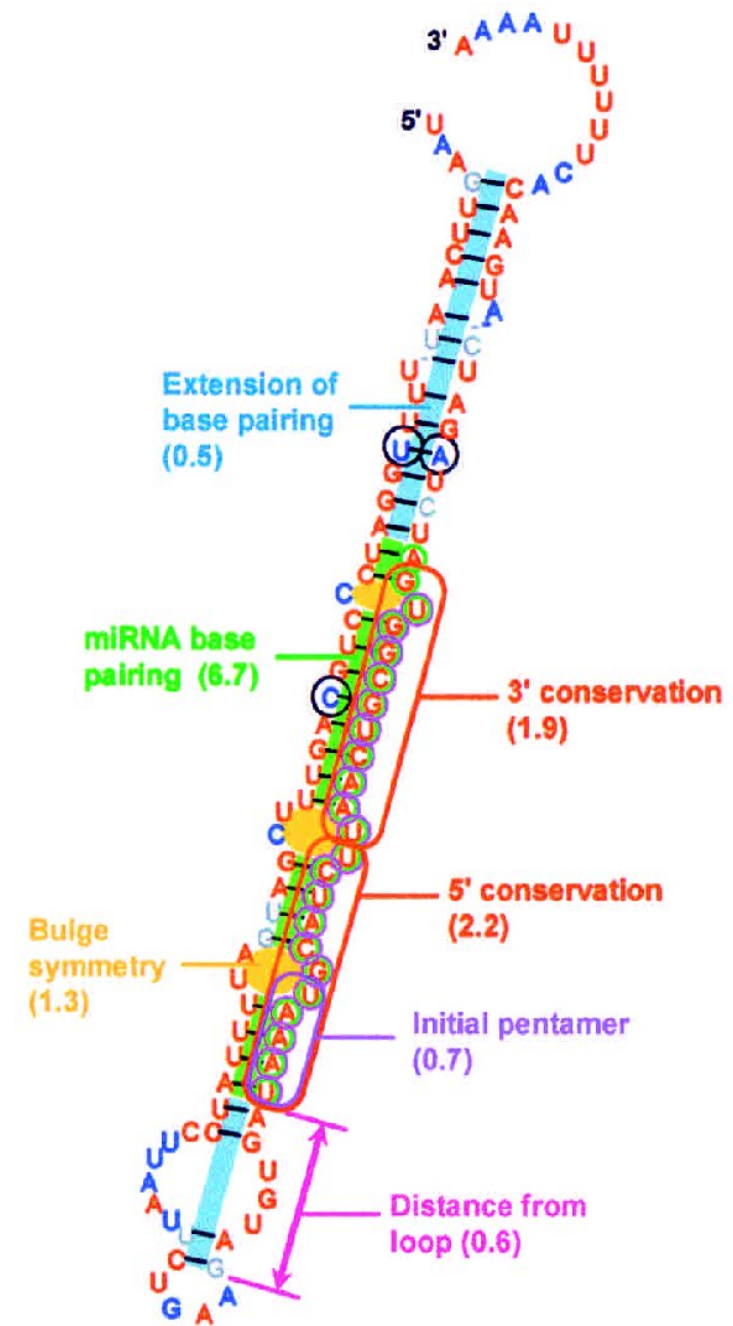
- Μέθοδοι βασισμένες στην υβριδοποίηση
 - Μικρο-συστοιχίες για miRNAs είναι εμπορικά διαθέσιμες
- Πλεονεκτήματα/Μειονεκτήματα
 - +Οι υπάρχουσες τεχνολογίες μειώνουν τη διακύμανση στην T_m και αυξάνουν της ειδικότητα των δεικτών
 - + Δεν απαιτεί εμπλουτισμό των μικρών RNAs
 - - Περιορισμός στα γνωστά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

Μέθοδοι αναγνώρισης των miRNAs II

- 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

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

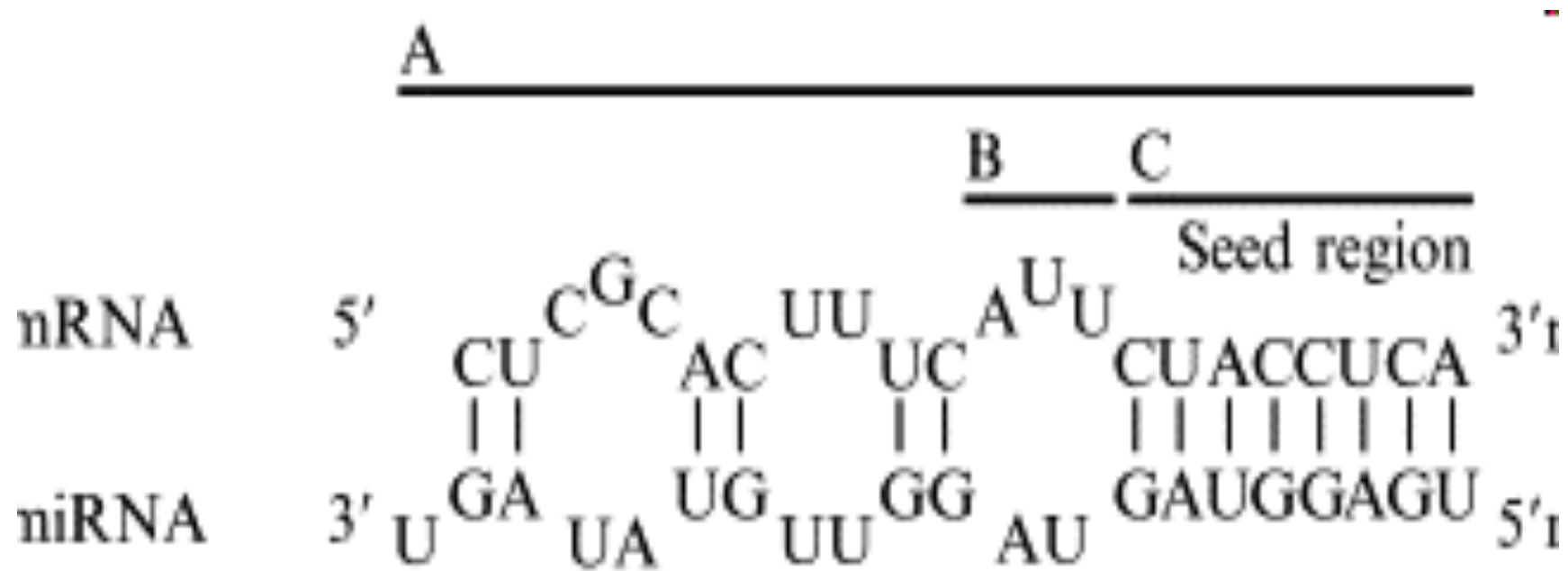


Υπολογιστικά εργαλεία πρόβλεψης στόχων miRNAs

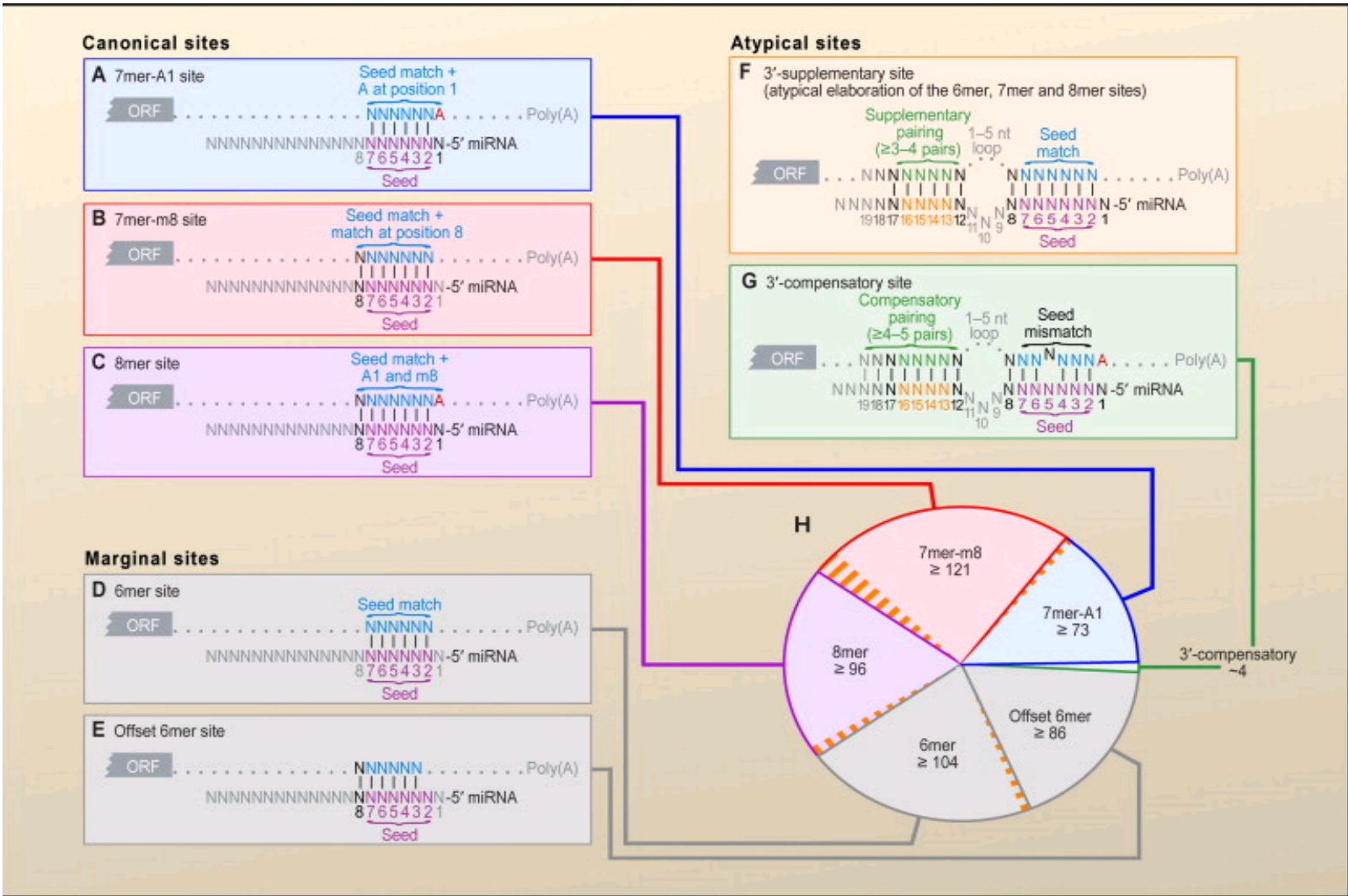
Name of the software	URL or availability	Supported organism(s)	Reference(s)
TargetScan, TargetScanS	http://genes.mit.edu/targetscan/	Vertebrates	[Lewis 2003] and [Lewis 2005]
miRanda	http://www.microna.org/	Flies, vertebrates	[Enright 2003] and [John 2004]
DIANA-microT	http://diana.pcbi.upenn.edu/DIANA-microT/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

The seed “rule”

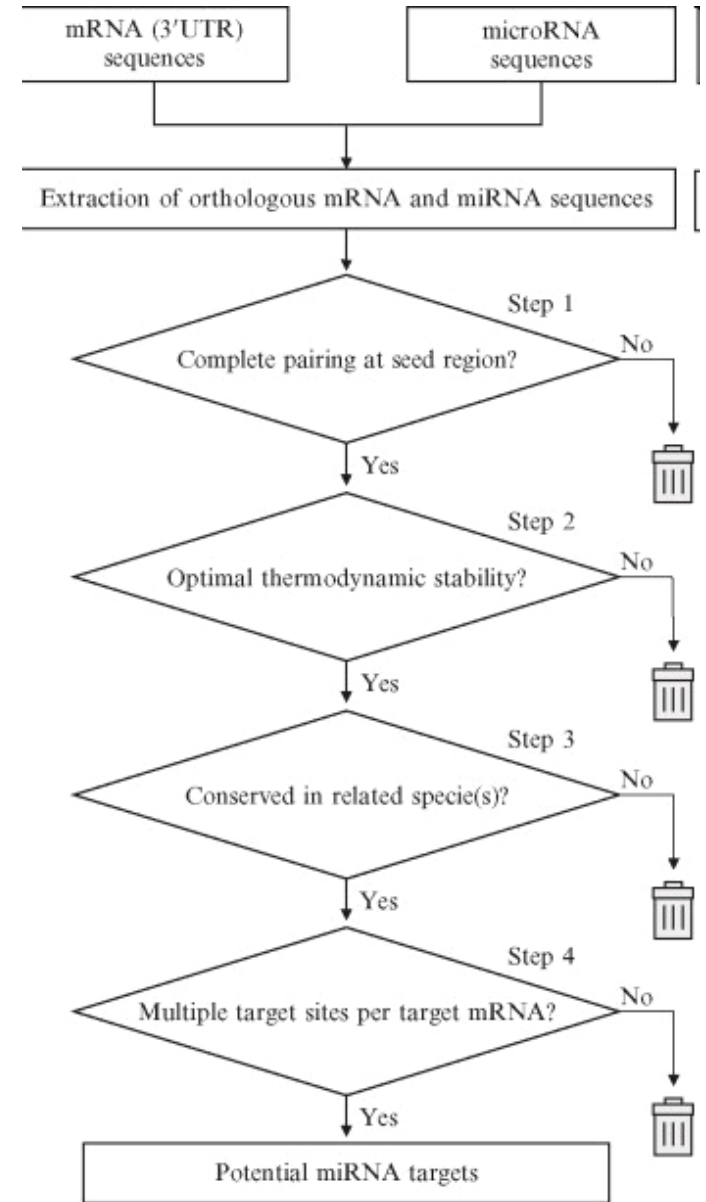
- The seed 'rule' states that contiguous Watson–Crick base-pairing to the 5' miRNA at nucleotides 2–7 is required for activity in ways that are predictive of bona fide miRNA target sites.



Types of miRNA Target Sites

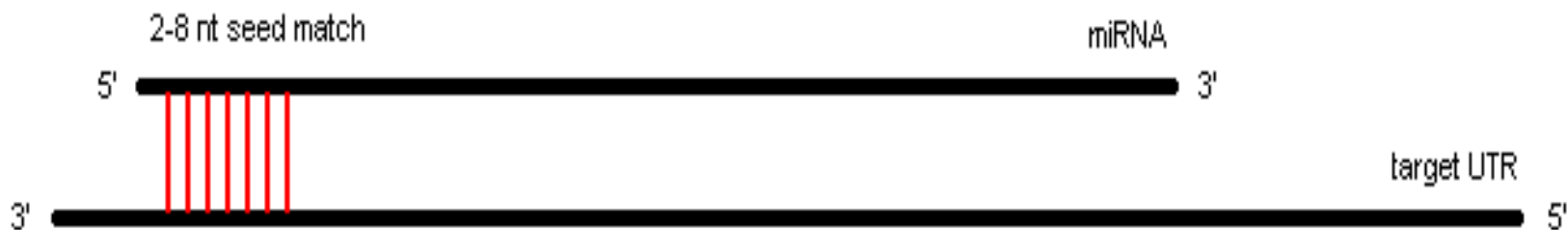


A pipeline for miRNA target prediction



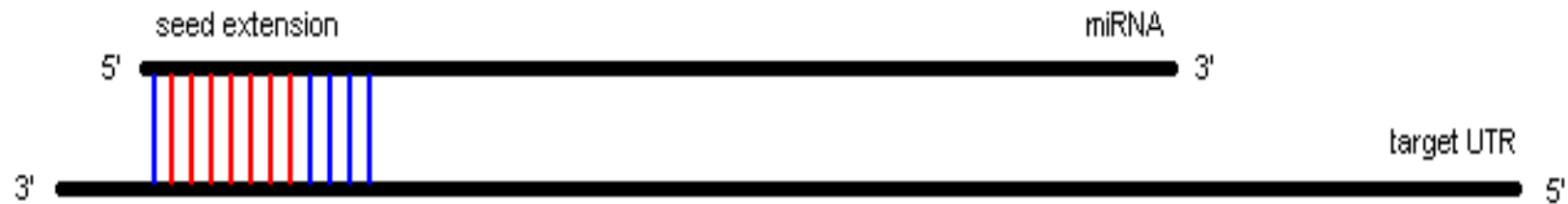
TargetScan Algorithm by Lewis et al 2003

- The Goal – a ranked list of candidate target genes
- Stage 1: Search UTRs in one organism
- Bases 2-8 from miRNA = “miRNA seed”
- Perfect Watson-Crick complementarity
- No wobble pairs (G-U)
- 7nt matches = “seed matches”



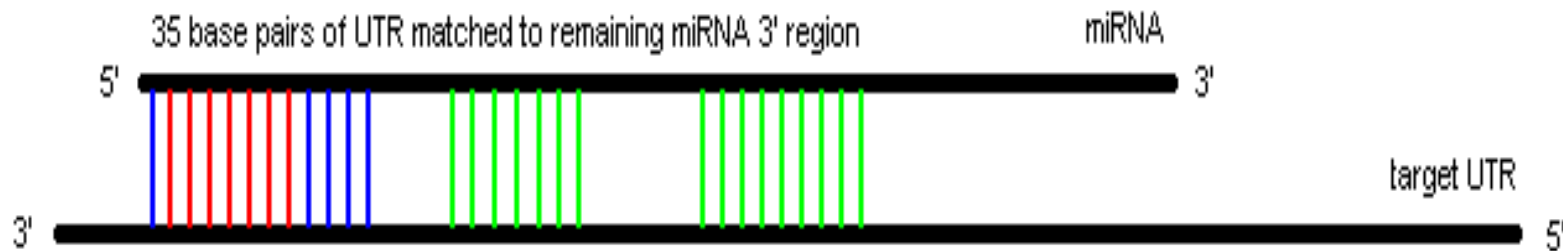
TargetScan Algorithm

- Stage 2: Extend seed matches
- Allow G-U (wobble) pairs
- Both directions
- Stop at mismatches



TargetScan Algorithm

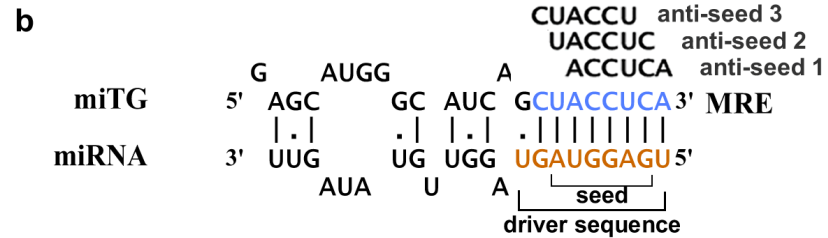
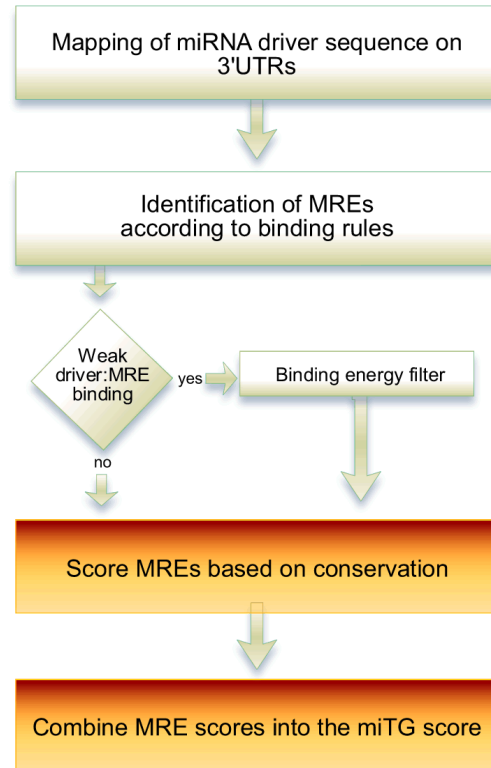
- Stage 3: Optimize basepairing
- Remaining 3' region of miRNA
- 35 bases of UTR 5' to each seed match
- RNAfold program (Hofacker et al 1994)



TargetScan Algorithm

- Stage 4: Folding free energy (G) assigned to each putative miRNA:target interaction
- Assign rank to each UTR
- Repeat this process for each of the other organisms with UTR datasets

The DIANA-microT 3.0 algorithm

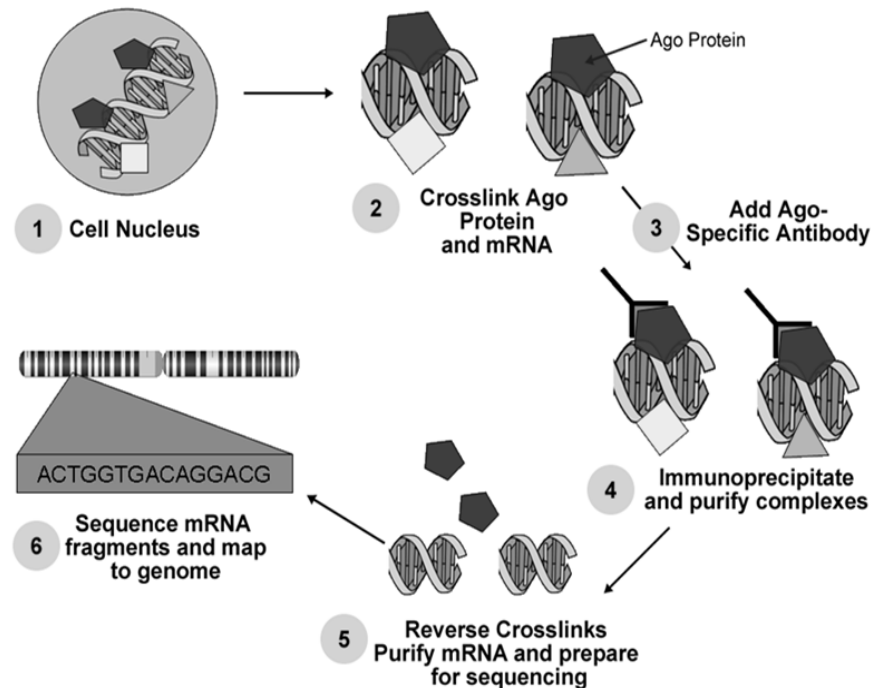


c

MRE category	8mer	7mer	9mer
human			
mouse			
rat			
dog			
⋮	⋮	⋮	⋮
fish			
Species Conserved	12	2	0
MRE Score	6	3	1
miTG Score	(3 x 6)	+ (2 x 3)	+ (4 x 1) = 29

Πειραματική επικαιροποίηση στόχων miRNAs

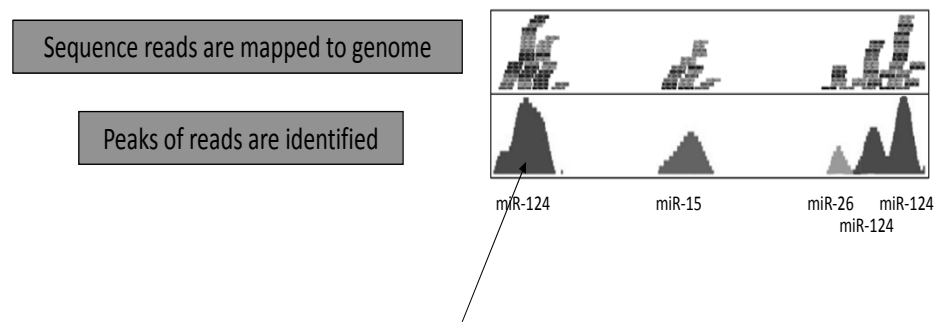
CLIP data (Chi *et al.* 2009, Hafner *et al.* 2010)



Note

PAR-CLIP (Hafner *et al.* 2010), HITS-CLIP (Chi *et al.* 2009).
T->C mutation on the tags specifies binding sites within a region of 5 nts.

How CLIP data are processed



Peaks indicate binding sites BUT do not specify by which miRNA

For this, the genomic location of the peak is aligned against all known miRNAs and the **best matching miRNA** is chosen

Out of 17310 peaks 5057 overlap with an MRE at the UTR and 6057 overlap with an MRE at the CDS.

DIANA tools

- <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>

The screenshot shows the DIANA TOOLS website interface. At the top, there is a red header with the text "DIANA TOOLS" on the left and three logos on the right: "Univ. of Thessaly", "IMIS Athena RC", and "BSHC AL Farming". Below the header is a navigation bar with buttons for "HOME", "SOFTWARE" (which is highlighted), "PUBLICATIONS", and "CONTACT".

On the left side, there is a "Software" section with a login form. The form includes fields for "Username *" and "Password *", a "Remember me next time" checkbox, and a "Login" button. Below the form are links for "Forgot your password?" and "Sign up for free!" or "take a tour". At the bottom of this section, it states "Available features for registered users:" followed by a list: "Download databases", "History", and "Bookmarks". Below this, it says "Login is not required to access the site!" and displays logos for the European Union, NSRF (2007-2013), and the Ministry of Education and Religious Affairs, Culture & Sports.

The main content area is titled "WEB SERVICES" and contains a paragraph about "Web Services at DIANA-LAB" and links to "mirPath", "microT v4", "microT-CDS", "Tarbase v6.0", and "DIANA Taverna Plug-in". Below this is a "SOFTWARE TO DOWNLOAD" section with a button for "DIANA Taverna Plug-in".

The "WEB APPLICATIONS" section features a grid of application cards:

- TarBase v.8 - NEW!**: A database of experimentally supported miRNA:gene interactions.
- microT-CDS - UPDATED!**: Search for targets of annotated miRNAs based on the popular microT-CDS algorithm.
- MirPath v.3**: A miRNA pathway analysis Web server.
- LncBase v.2**: Elaborated info for predicted & exp. verified miRNA-lncRNA interactions.
- Automated Pipelines**: Pipelines to analyse user data from small scale & high-throughput experiments.
- MR-microT (beta) UPDATED!**: Near-real time miRNA target prediction on the Cloud.
- mirPub**: Search for miRNA-related publications.
- miRGen v.3**: Accurate characterization of miRNA promoters & their regulators.
- MirExTra v2.0**: Uncovering microRNAs and transcription factors with crucial roles in NGS expression data.

At the bottom, there is a section for "Older Versions".

Πειραματική επικαιροποίηση στόχων miRNAs

Before

Experimentally identified binding sites

Limited number -> cannot extract statistically significant features

Specific for few miRNAs

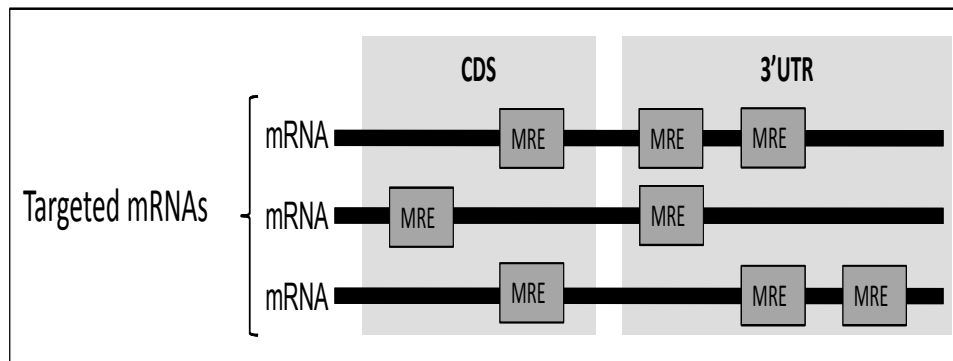
Microarrays (mRNA level) or proteomics (protein level)

Target genes are specified but binding sites remain unknown

Now - Sequencing data (PAR-CLIP, HITS-CLIP)

Specify location of thousands of binding sites

Enable statistical evaluation of several features



• Specific Techniques

- Reporter genes
- Northern blotting
- qPCR
- Western blotting
- ELISA
- Immunohistochemistry

• High Throughput Techniques

- Microarrays
- RNA-Seq
- Proteomics (such as pSILAC)
- CLIP-Seq (HITS-CLIP, PAR-CLIP, iCLIP)
- CLASH
- PARE-Seq
- Degradome-Seq

Overview of approaches for experimentally identifying microRNA targets

- Overview of approaches for experimentally identifying microRNA targets. microRNA regulation of translation is a multi-faceted process that allows several entrances for experimentally identifying the targets regulated by a specific microRNA. Reports address this issue through: (1) Analysis of mRNAs degraded as a consequence of overexpressing the microRNA and subsequent analysis of sequence motifs, (2) immunoprecipitation of tagged or endogenous RISC complex and analysis of associated mRNAs, (3) Affinity purification of tagged microRNAs and microarray analysis of associated mRNAs, (4) by using the observation that some microRNA targets move in the polysomal distribution upon microRNA targeting and analyzing differences in polysomal associated mRNAs with and without the microRNA, (5) analyzing protein production following labeling of proteins and mass spectrometry.

