بیولوژی، عملکرد و شناسایی microRNA ها

• دکتر صادق ولیان بروجنی
متخصص ژنتیک پزشکی، استاد ژنتیک دانشگاه اصفهان، رئیس مرکز ژنتیک پزشکی اصفهان
svallian@sci.ui.ac.ir

• پریسا خردمند
کارشناسی ارشد ژنتیک پزشکی، دانشگاه اصفهان، دانشکده علوم، گروه زیست شناسی، بخش ژنتیک

چکیده

microRNA ها یا به اختصار miRNA مولکول‌های RNA کوتاهی با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن های مختلف به عنوان تنظیم کننده‌های اصلی گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تکامل اولیه، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز عمل می‌کنند. بنابراین تغییر بیان miRNA ها نقش مهمی را در بروز بیماری های مختلف از جمله سرطان ایفا می کند. از این رو مطالعات بسیاری در جهت بررسی بیولوژی و عملکرد این دسته از RNA ها انجام شده است. همین طور تلاش های چشم گیری به منظور توسعه روش های تشخیص و سنجش آن ها صورت گرفته است. در این مقاله بیولوژی miRNA در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف مورد بحث و بررسی قرار خواهد گرفت و به برخی از تکنیک های شناسایی و تشخیص miRNA ها اشاره می شود.

کلمات کلیدی: microRNA، سرطان، میکرواری Real-Time PCR

۱. مقدمه

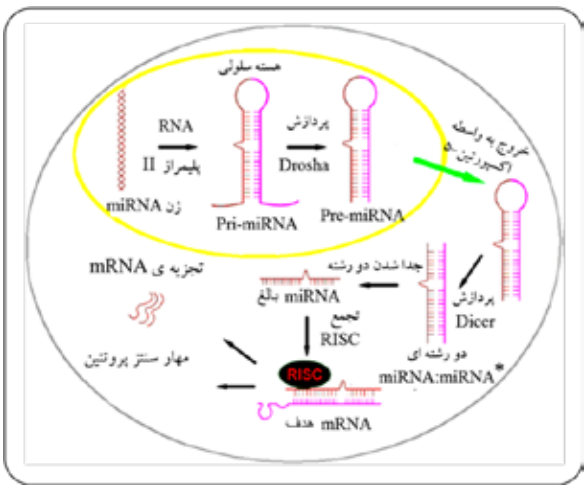
miRNA ها، گروهی از RNA های حفاظت شده تک رشته ای کوتاه (بین ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید) و غیر کدکننده هستند که به عنوان تنظیم کننده های بعد از رونویسی بیان ژن، در گستره وسیعی از حیوانات، گیاهان و ویروس‌ها، عمل می کنند. تولید miRNA ها فرآیندی چند مرحله‌ای است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ابتدا miRNA ها در هسته سلول از روی نواحی بین ژنی یا درون ژنی به وسیله RNA پلیمراز II به فرم miRNAهای اولیه با طول ۱ تا ۳ کیلوباز، رونویسی می شوند. در ادامه این miRNA های اولیه در هسته به وسیله آنزیم RNase III به نام Drosha و پروتئین متصل شونده به RAN دو رشته ای تحت عنوان pasha، به ساختارهای ساقه و لوپ با طول تقریبی ۷۰ تا ۱۰۰ نوکلئوتید که pre-miRNA ها نامیده می شوند، شکسته می شوند. pre-miRNA ها سپس به وسیله اکسپورتین-۵ از هسته به سیتوپلاسم منتقل می شوند و توسط آنزیم RNase III تحت عنوان Dicer به الیگونوکلئوتیدهای ۱۸ تا ۲٤ بازی دو رشته ای، شکسته می شوند و miRNA:miRNA* دو رشته ای بالغ ایجاد می شود (۱).

بعد از جدا شدن دو رشته از یکدیگر، یکی از رشته ها به عنوان مولکول miRNA بالغ عمل کرده و به کمپلکس خاموش کننده القا شده توسط RNA(RISC) [1]، ملحق می شود. این در حالی است که رشته دیگر [2]، اغلب تجزیه می شود و یا نقش عملکردی را در تنظیم هومئوستازی miRNA ایفا می کند (شکل ۱). کمپلکس RISC از طریق اتصال کامل و یا ناقص با mRNA هدف خود

1- RNA-induced silencing complex
2- Passenger miRNA strand

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

عمـل کرده و تخریب یا ممانعت از ترجمه و یا جداسـازی mRNA از ماشـین ترجمه را سبب می شود (شکل ۲)(۸). بیشتر miRNA های حیوانی به صورت ناقص با mRNA هدف خود جفت می شـوند و بنابرایـن مکانیزم ممانعت از ترجمه برای بسیاری از miRNA ها صادق است. در نتیجه این مکانیسـم اتصال، سـطح پروتئین کاهش یافته و تاثیرات عمیقـی بر روی هومئوسـتازی سـلولی می گـذارد که این مهـم ترین موضوع برای فهم نقـش miRNA ها به عنوان سـرکوبگر تومور و بیومارکر اسـت. تا کنون بیش از ۲۶۰۰ miRNA در انسان شناسایی شده است که می توانند بیشتر از ۳۰٪ از ژنوم انسـان را مورد هـدف قرار دهند (۹ و ۱۰). نکتـه قابل توجه این اسـت که یک ژن می تواند به وسـیله چندین miRNA تنظیم شـود این در حالی اسـت که یک miRNA نیز ممکن اسـت بر اسـاس جفت شدن ناقص با هدفش، بیش از یک هدف داشـته باشـد. شواهد روز افزون نشـان دهنده ایـن موضوع اسـت کـه miRNA ها نقش تنظیمی حیاتی را در گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی شـامل: تکامل اولیه، تمایز سـلولی، تکثیـر، آپوپتوز و... ایفا می‌کنند. بنابراین بیان تغییر یافته miRNA ها با بیماری‌های متعددی در ارتباط است. مطالعات بیشماری ارتباط بین بیان نابه‌جـای miRNAها و شـروع و پیشـرفت بیماری های انسـانی، اختلالات ژنتیکی و تغییر عملکرد سیستم ایمنی، را نشـان داده اند. miRNAها می توانند هم به عنوان انکوژن و هم سـرکوبگر تومـور عمل کنند که نشـان دهنده اهمیت آن ها در سـرطان های انسانی اسـت. بنابراین پروفایل بیانی miRNAها می تواند به عنوان بیومارکر برای شروع بیماری بـه کار رود (۲). همچنین می تـوان از miRNA ها در ژن درمانی برای اختلالات ژنتیکی اسـتفاده کرد. از طرف دیگر تلاش های بسـیاری به منظور توسعه روش های درمانی بر پایـه miRNA ها از طریـق بازگرداندن بیان آن ها به میزان طبیعـی، در سـلول های سـرطانی صورت گرفته اسـت. با گسترش حوزه miRNA، توسعه استراتژی های تشخیصی کارآمـد و قابـل اعتماد برای miRNA هـا در جهت درک عملکرد آن ها در مسیرهای تنظیمی مختلف، ضروری است که این عامل می‌تواند در گسترش روش های درمانی بر پایه miRNA ها در تسـت های تشخیصی در سطح مولکولی، مؤثر باشد. در سـال های اخیر روش های تشخیص و آنالیز miRNA ها به سرعت توسعه یافته است. با این حال آنالیز miRNA ها با توجه به بسـیاری از ویژگی های منحصر به فرد آن ها مانند سـایز کوچک، فراوانی پایین و شـباهت در توالی بین اعضای یک خانواده نیازمند شرایط ویژه ای است.



شـکل۱: بیوژنـز و عملکـرد miRNA هـا. Pri-miRNAهای تولید شـده به وسیله RNA پلیمراز II، در هسـته به وسـیله اندونوکلئـاز Drosha به pre-miRNA پردازش می شوند. در ادامه Pre-miRNA ها به سیتوپلاسم منتقل شده و در آن جا به وسیله اندونوکلئاز Dicer به miRNA های بالغ شکسـته می شـوند. سپس miRNA های بالغ به کمپلکس RISC ملحق شـده و با اتصال به توالی های مکملشان در mRNA هدف منجر به مهار ترجمه و یا تجزیه آن ها می شوند (۲).

سـایز کوچـک miRNA هـا بسـیاری از روش هـای سـنجش آن ها، که بر پایه PCR و یا هیبریداسـیون اسـت را پیچیـده کرده اسـت، زیرا پرایمرهای اسـتفاده شـده در بسـیاری از PCRهای معمولی از نظر طول به miRNAها شـبیه‌اند، در نتیجه پرایمرهای خیلی کوتاهی برای سـنجش آن ها نیاز اسـت که این عامل خـود بر روی راندمان PCR تاثیر گذار اسـت. همچنین در روش های تشـخیصی بر پایه هیبریداسـیون، نشـان‌دار کردن پروب کوتاه برای شناسـایی miRNA ها دشوار است در ضمن دمای ذوب دو رشته ای

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

پروب و هدفش نیز پایین است که به شدت باعث کاهش میزان هیبریداسیون و افزایش تلاقی هیبریداسیون می شود. بنابراین به کارگیری استراتژی های جدید در جهت افزایش اختصاصیت اندازه‌گیری پروفایل miRNA ها، ضروری است.

miRNA ها تنها بخش کوچکی از کل نمونه RNA را شامل می شوند، غلظت miRNA در سلول حتی می تواند در حد چند مولکول باشد (۳). فراوانی پایین miRNAها نیازمند روش های سنجش دقیق و حساس است این در حالی است که شباهت بالای توالی در بین اعضای یک خانواده، تشخیص آن ها را دشوار تر نیز می کند.

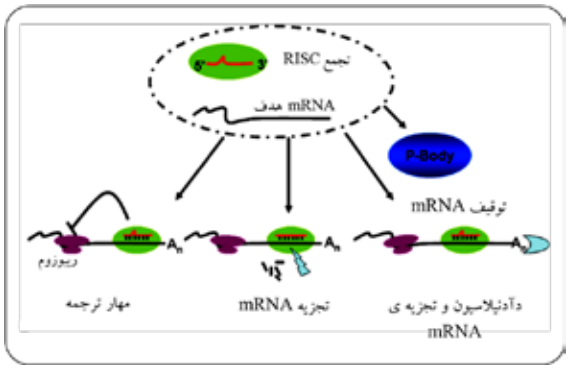
سطح بیان miRNA ها می تواند از چند کپی تا بیش از ۵۰۰۰۰ کپی در سلول تغییر کند، بنابراین شناسایی آن ها در گستره دینامیکی وسیع ضروری است. در ضمن یک ژن می‌تواند به طور همزمان به وسیله چندین miRNA تنظیم شود، بنابراین به کارگیری روش هایی ویژه برای تشخیص چندین miRNA به منظور درک اهمیت و پیچیدگی عملکرد این تنظیم کننده های کوچک لازم است.

در این مقاله بیولوژی miRNA در فرآیندهای فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی مختلف مورد بحث و بررسی قرار خواهد گرفت. همچنین به برخی از تکنیک های شناسایی و تشخیص miRNA ها اشاره می شود.

۲. عملکرد بیولوژیکی miRNA ها

میزان جفت شدن miRNA با هدفش فاکتور اصلی در تشخیص مکانیسم برهم کنش miRNA-mRNA است. در صورتی که mRNA هدف تقریبا به صورت کامل با miRNA جفت شود، شکسته و تجزیه می شود در غیر این صورت از ترجمه آن جلوگیری می شود. miRNA اصولا" از ناحیه 3'-UTR به ژن هدف متصل می شود ولی بررسی‌ها نشان داده است که miRNA ها می توانند به 5'-UTR و توالی های کد کننده نیز متصل شوند اما اطلاعات کمی در این زمینه در دسترس است. تخمین زده می شود که ژنوم انسان کد کننده بیش از ۲۶۰۰ miRNA است، این در حالی است که تعداد mRNA ها در حدود ۳۰۰۰۰ است. بنابراین یک miRNA ممکن است صدها mRNA را تنظیم کند و در نتیجه شبکه هایی از بیان ژن را تحت تاثیر قرار دهد (٤). آن چه واضح است این است که بیولوژی miRNA بسیار پیچیده و در عین حال سازمان یافته در جهت تنظیم بیان شبکه های ژنی است.

miRNA ها نقش مهمی را در همه فرآیندهای زیستی شامل تعیین سرنوشت سلولی، تکثیر و مرگ سلولی، ایفا می کنند. علاوه بر این فرآیندهای ضروری، miRNA ها در فعالیت های سلولی مختلف مانند پاسخ ایمنی، ترشح انسولین، سنتز نوروترانسمیترها و ریتم شبانه روزی شرکت دارند. miRNA ها همچنین می توانند مسیرهای انکوژنی و یا سرکوبگر تومور را کنترل کنند این در حالی است که خود miRNA ها می توانند به وسیله آنکوژن ها و یا سرکوبگرهای تومور تنظیم شوند (۵) (شکل ۲).



شکل ۲: مکانیسم های تنظیم بیان ژن miRNA ها. مهار ترجمه mRNA، تجزیه mRNA از طریق شکست، دآدنیلاسیون و قرارگیری در اجسام پردازش کننده[1] که در آن ها mRNA هدف miRNA از ماشین ترجمه جدا می شود (۲).

۲,۱. تنظیم miRNA ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف

۲,۱,۱. miRNA ها و تکامل سلولی

عملکرد miRNA ها با کشف دو miRNA، lin-4 و let-7، که در کنترل زمان تکامل لارو در C elegans

1- processing body (P-body)

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

نقش دارند، مشخص شد. تحقیقات متعددی نشان داده اند که miRNA ها نقش مهمی در تکامل عصبی، ماهیچه ای و رده زایشی دارند. برای مثال در مهره داران miRNA-124 تنظیم کننده اصلی تکامل عصبی، محسوب می شود. در in vitro، افزایش بیان miRNA-124 تکامل عصبی را راه اندازی می کند این در حالی است که کاهش بیان آن از تکامل عصبی جلوگیری می کند (۲۸). همچنین مشخص شده است که miRNA-124 در پیش ساز های عصبی و نورون های بالغ به فراوانی بیان می شود و تکامل عصبی را افزایش می دهد (٦).

نقش miRNA ها در تکامل قلب، بافت عروقی و خون به خوبی مطالعه شده است. miRNA ها نقش مهمی را در پاتولوژی های قلبی- عروقی متعدد مانند آریتمی (miRNA-1 و miRNA-133)، فیبروز (miRNA-21 و miRNA-29) و اختلالات متابولیکی (miRNA-33) ایفا می کنند. miRNA-1 فراوان ترین miRNA در سلول های ماهیچه ای قلب است و اولین miRNA دخیل در تکامل قلب به شمار می رود. آزمایش‌ها نشان داده اند که miRNA-126، miRNA-218، miRNA-143 و miRNA-145 مسئول کنترل تکامل عروق و خون هستند. تکامل سلول های خونی نیز وابسته به عملکرد miRNAها است.

۲،۱،۲. miRNA ها و تمایز سلولی

miRNA ها نقش چشمگیری در تمایز سلول های بنیادی جنینی[1] دارند. برای مثال بیان miRNA-296 و دسته miRNA-290~295 در طول تمایز سلول‌های بنیادی، کاهش می یابد، این در حالی است که بیان miRNA-21 و miRNA-22 در طی این فرآیند افزایش می یابد. اختلال در تکثیر سلول های بنیادی جنینی موش جهش یافته در Dgcr8، از طریق بیان خانواده miRNA- 290~295/302، که miRNA های تنظیم کننده چرخه سلولی خاص سلول های بنیادی جنینی نامیده می شوند[2]، اندکی برطرف می شود (۲۹). از طرف دیگر miRNA های مختلفی در مهار پرتوانی[3] در سلول های بنیادی تمایز یافته دخیل اند. برای مثال miRNA-145 بیان ژن های OCT4، SOX2 و KLF4 را در طی تمایز کاهش می دهد. علاوه بر این miRNA ها در کنترل سلول های بنیادی سرطانی نیز موثرند. Let-7 مثالی از miRNA هایی است که هم در سلول های بنیادی طبیعی و هم سرطانی نقش دارد. مطالعات نشان داده اند که Let-7 می تواند ویژگی‌های سلول های بنیادی را در سلول های آغاز کننده سرطان پستان، تنظیم کند (۷).

۲،۱،۳. miRNA و سیستم ایمنی

کنترل miRNA به عنوان عامل تنظیمی اصلی و ضروری در سیستم ایمنی پستانداران شناخته شده اند. جهش های ژنتیکی در miRNA ها به شدت تکامل سیستم ایمنی و همچنین پاسخ ایمنی را تحت تاثیر قرار می دهد و می تواند منجر به بروز بیماری های ایمنی مثل خود ایمنی و سرطان شود. miRNA ها در بسیاری از انواع سلول های ایمنی به صورت متفاوت بیان می شوند و همچنین در سلول های ایمنی فعال یا غیر فعال، پروفایل بیانی مجزایی دارند. برای مثال miRNA-155 به محض تحریکات التهابی مختلف، در مونوسیت ها، ماکروفاژها و سلول های دندریتیکی میلوئیدی، افزایش می یابد (۳٤). miRNA ها نقشی کلیدی در تنظیم تکامل و عملکرد سلول های ایمنی ذاتی دارند. بیان ثابت miRNA-155 می تواند تعداد گرانولوسیت‌های نابالغ را در in vivo، افزایش دهد. بررسی ها نشان داده اند که سطح بیان miRNA-106a، miRNA-20a، miRNA-17- 5P اعضای miRNA-17- 92 و خانواده‌های miRNA-106a-92 در طی تمایز سلول های پیش ساز هماتوپوئتیک به مونوسیت ها، کاهش می یابند. پاسخ التهابی ماکروفاژها به عفونت افزایش بیان miRNA های متعددی را شامل miRNA-147، miRNA-146، miRNA-155، miRNA-21 و miRNA-9، سبب می شود (۲۱). علاوه بر تنظیم تمایز رده سلولی هماتوپوئتیک، miRNA ها با

1- Embryonic stem (ES) cells
2- ES cell-specific cell cycle regulating miRNAs
3- pluripotency

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

تنظیم پاسخ ایمنی نیز در ارتباط اند. miRNA-155 می‌تواند به دنبال فعال شـدن سلول های B در مرکز ژرمینال، افزایش بیان پیدا کند. miRNA-150 پروفایل بیانی دینامیکی را در طی تکامل لنفوسـیت ها دارد. این miRNA در سلول های B و T بالغ بر خلاف سـلول های پیش ساز به میزان بالایی بیان می شوند از طرف دیگر بعد از تمایز بیشتر این سلول ها به T helper نوع یک و دو، بیان آن خاموش می شود (۷). در مطالعه ای دیگر مشخص شد که بیان miRNA-181a به منظور تنظیم قدرت و آسـتانه سـیگنالینگ گیرنده سلول های T، تغییر می کند و در نتیجه بر روی حساسـیت سلول هـای T به آنتی ژن ها تاثیر می گـذارد. علاوه بر این تنظیم دینامیـک miRNA-181a در طول تکامل و بلوغ سـلول های T، با تغییر در حساسـیت سلول های T به آنتی ژن ها در ارتباط است (۷).

۲,۲. تنظیم miRNA ها در فرآیندهای پاتولوژیکی مختلف

۲,۲,۱. بیان نابجای miRNA ها در سرطان

از آن جایـی کـه عملکـرد miRNA هـا در تنظیـم فرآیندهای زیستی حیاتی، ضروری است به نظر می رسد که miRNAها با پیش بینی، پیشـرفت و علت بروز سرطان در ارتباط اند (۳۷). تغییـر پروفایل بیانی miRNA ها یکی از ویژگ های معمول همه تومورهای انسـانی است (۲). برای مثال miRNA-126، miRNA-143 و miRNA-145 در نمونه های سـرطانی در مقایسـه با بافت نرمال، به میزان بسیار کمتری بیان می شوند، در حالی که miRNA-21 در بسیاری از نمونه های سرطانی، افزایش بیان پیدا می کند(۸). بنابراین miRNA ها به عنوان بیومارکرهایی برای پیش‌بینی، تشخیص تقسیم بندی، پیشرفت و پاسخ به درمان در سرطان به کار می روند.

شـواهد بسـیاری نشـان داده اند که miRNA-15a و miRNA-16 -1 کـه در لوکـوس 13q14 قرار دارند، در اکثر موارد CLL[1]، کاهش بیان داشـته و یا حذف شـده اند. ایـن دو miRNA به عنوان تنظیم کننده های منفی پروتئین BCL2، عمـل می‌کنند، که این امر می تواند نشـان دهنده مکانیسم مولکولی باشد که در نتیجه حذف miRNA-15a و miRNA-16 -1 می تواند منجر به CLL شود (۹).

اختـلال در بیان miRNA ها در سـرطان هـا می تواند در نتیجـه چهار مکانیسـم مختلف شـامل: ناهنجاری های کروموزومـی، جهش‌های ژنومی و پلی مورفیسـم، تغییرات اپـی ژنتیکـی و تغییـر در تولیـد miRNA هـا، باشـد. تومورهـای مختلف از نظـر برخی از ویژگـی های مربوط به بیان miRNAها به هم شـبیه انـد. اول از همه، پروفایل miRNAها در سـلول‌های توموری به میزان چشم گیری با سلول های نرمال همان بافت، متفاوت است که این موضوع به دلیل اهمیت بیولوژیکی عملکرد miRNA ها در پیشرفت سـرطان اسـت. علی رغم ایـن که برخـی از miRNAها افزایش می یابند، بیشـتر آن ها در سـرطان ها در مقایسـه با بافت سـالم، مهار می شـوند. علاوه بر این تغییر در پروفایل بیانی، مربوط به یک miRNA نیسـت، که نشان دهنده این موضوع است که سـرطان زایی و پیشرفت سرطان با تمامی miRNA سـلول (miRNAome) در ارتباط اسـت. دوم این که به نظر می رسـد که پروفایل بیانی miRNA ها، در تومورهایی که منشـا تکاملی یکسان دارند، تغییرات یکسانی دارنـد، که این امر خود می تواند به عنوان ابزاری برای پیش بینی و تشـخیص سـرطان به کار رود. سوم این که برخی از miRNA ها به دفعات و در بسیاری از سرطان ها تغییر بیان دارند که این می تواند نشان دهنده این موضوع باشد که این miRNA ها در مسیرهای سیگنالینگ اصلی که در بسیاری از انواع بدخیمی‌ها تغییر می کنند، شرکت دارند (۸).

۲,۲,۲. عملکرد miRNA ها به عنوان انکوژن

افزایـش یا کاهش بیان miRNA ها مـی تواند به عنوان انکـوژن و یا سـرکوبگر تومـور عمل کند. به عنـوان مثال، miRNA-155 تنها miRNA ای اسـت که به تنهایی می تواند تومورزایی را القا کند. مطالعات نشان داده اند که موش ترانـس ژنیک با افزایش بیان miRNA-155 به لیمفوما در سطح بالا مبتلا می شود (۱۰). افزایش بیان miRNA-155 در بسـیاری از بدخیمـی هـای سـلول‌های B ماننـد لیمفومای Hodgkin، CLL تهاجمی و برخی از لیمفوماهای بورکیت گزارش شده است.

1- Chronic lymphocytic leukemia

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

یکی از اولین miRNA های انکوژنیک شناخته شده، خوشه miRNA-17 -92 است. این خوشه در انسان بر روی جایگاه کروموزومی 3. 13q31 قرار گرفته و از یک رونوشت پلی سیسترونیک به هفت miRNA، شامل: miRNA-92-1 ،miRNA-19b-1، miRNA-20a، miRNA-19a، miRNA-18a، miRNA-17-3p miRNA-17-5p

پردازش می شود (١٤). خوشه miRNA-17 -92 در انواع مختلفی از سرطان ها شامل لیمفوماها، سرطان های ریه و بسیاری دیگر، افزایش بیان پیدا می کنند. miRNA-21 مثال دیگری از miRNA های انکوژنی است که در بسیاری از انواع سرطان ها افزایش بیان دارد.

۲,۲,۳. عملکرد miRNA ها به عنوان سرکوبگران تومور

برخلاف miRNA های انکوژنی، miRNA هایی که بیان آن ها در سلول های بدخیم کاهش می یابند می توانند از طریق مهار انکوژن ها و یا ژن هایی که تمایز سلولی و یا آپوپتوز را مهار می کنند، به عنوان سرکوبگر تومور عمل کنند. از جمله miRNA هایی که به عنوان سرکوبگر تومور عمل می کنند می توان به let-7، که تنظیم کننده منفی Ras و HMGA2 است، miRNA-15a و miRNA-16 -1، که تنظیم کننده منفی پروتئین BCL2 هستند و همچنین miRNA-34 که از طریق آسیب به DNA و استرس های انکوژنی در مسیر وابسته به p53، القا شده و منجر به آپوپتوز یا پیری سلولی می شود، اشاره کرد. Let-7 یکی از اولین miRNA های شناخته شده است. در انسان ۱۲ پارالوگ از let-7 وجود دارد. Let-7 احتمالا فراوان ترین miRNA است. بیان پایین let-7 در تومورهای ریه در مقایسه با بافت ریه طبیعی مشاهده شده است و بیان اجباری آن می تواند رشد سلول های سرطانی را در in vitro و in vivo مهار کند. علاوه بر این کاهش بیان let-7 با کوتاهی عمر بیمار بعد از عمل در بسیاری از سرطان ها در ارتباط است (۷).

مطالعات توضیح داده شده در بالا اهمیت ژن های miRNA را در بیماری زایی و پیشرفت سرطان های انسانی، پررنگ تر می کند. همچنین مطالعات بسیاری نشان داده اند که miRNA ها می توانند به طور مؤثر به تنهایی یا در ترکیب با داروهای ضد سرطان برای درمان سرطان به کار روند. به طور اختصاصی miRNA ها می توانند به طرز چشمگیری برای مقابله با مقاومت دارویی که یکی از دلایل اصلی عدم موفقیت در درمان سرطان است، به کار گرفته شوند.

۲,۲,۴. miRNA ها و نقش آن ها در دیگر فرآیندهای پاتولوژیکی

از آن جایی که miRNA ها در عملکردهای سلولی مختلفی شامل: پاسخ های ایمنی، ترشح انسولین، سنتز نوروترانسمیترها و ریتم شبانه روزی، شرکت دارند، نقش تنظیمی چشمگیری را در فرآیندهای پاتولوژیکی مرتبط، ایفا می کنند (۵). miRNA ها با تعدادی از شرایط پاتولوژیکی در سیستم اعصاب مرکزی مانند آلزایمر و پارکینسون در ارتباط اند. برای مثال میزان بیان miRNA -30d-5p و miRNA-144 -5p به طور چشمگیری در بیماران مبتلا به آلزایمر دستخوش تغییر شده و به ترتیب بیانشان افزایش و کاهش می یابد (۱۰). علاوه بر این نقش miRNA ها در فرآیندهای پاتولوژیکی قلب، بافت عروقی و خون به خوبی مطالعه شده است. (۱۱)

۳. روش های شناسایی miRNA ها

۳,۱. میکروآرایه miRNA[1]

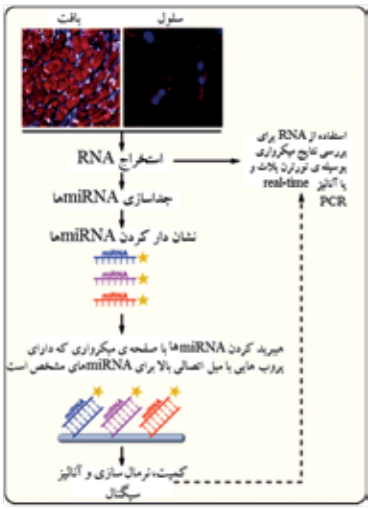
میکرو آرایه جزء موثرترین روش های مورد استفاده برای شناسایی miRNA ها است. این تکنولوژی امکان آنالیز همزمان هزاران miRNA را در طی یک آزمایش فراهم می‌کند. مرحله اول در میکرو ارایه miRNA، خالص سازی RNA یا miRNA از سلول ها یا بافت است. پروتکل‌های بسیاری به منظور استخراج RNA با کیفیت بالا، توسعه یافته‌اند. اگر چه امکان استفاده از کل RNA برای آنالیز میکرواری وجود دارد، از آن جایی که miRNA ها تنها در حدود ۰,۰۱٪ از کل RNA ها را تشکیل می دهند، جداسازی و استخراج miRNA ها دقت را بالا می برد. سپس miRNA های بالغ می توانند به صورت مستقیم با استفاده از RNA ligase T4 با اتصال یک یا دو نوکلئوتید نشان دار

1- miRNA Microarrays

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

شـــده با فلوروفور به انتهای 3′ miRNA، نشـــان دار شوند. (شکل ۳)

در شناسایی miRNA ها با استفاده از آنالیز میکرواری، طراحی پروب مناسب بسیار ضروری است. در همه میکرواری‌های بیان ژن، الیگونوکلئوتید های ســنتزی و یا قطعات cDNA که دارای اختصاصیت و تمایل بالایی برای هر رونوشــت هســتند، به کار می روند. از آن جایی که miRNA ها خیلی کوتاه هســتند (19 - 23 nt) طراحی پروب برای شناسایی آن ها با محدودیت‌هایی همراه است و براســاس توالی miRNA دمای ذوب آن ها بین ٤٥°C و ٧٤°C در تغییــر اســت. از آن جایــی کــه میل ترکیبی miRNA های مختلف متفاوت است، اصولا نباید برای شرایط کمی به کار رود ولی بهتر اســت برای مشــخص کردن تغییرات نســبی بیان بین دو حالت مانند بیمار در برابر سالم و یا مشخص کــردن حضور یک miRNA به کار رود. به هر حال بر اســاس ویژگی های شــیمی فیزیک یک miRNA، افزایش و یا کاهش طــول یک پروب می تواند منجر به تعادل بهتر در دماهای ذوب پروب های miRNA شــده و در نتیجه باعث می شود که آنالیز دقیق تری صورت بگیرد.



شــکل۳: آنالیز میکروارایــه miRNA ها. اولین مرحله برای انجام آنالیز میکروارایه، خالص سازی miRNAهای بالغ از ســلول ها و یــا بافت های تازه و یا فیکس شــده اســت. miRNA ها بعد از اســتخراج با استفاده از یک رنگ، نشــان‌دار شده و سپس مســتقیما با آرایه‌های دارای پروب‌هــای اختصاصی بــرای miRNA هــا هیبرید می شــوند. قطعات دو رشــته ای حاصل می توانند به آسانی شناسایی شوند. سپس از miRNA ها و یا tRNA برای نرمال ســازی، تایید و مقایســه داده ها اســتفاده می شود. همچنیــن آنالیز qRT-PCR و نورتــرن بلات می تواند به منظور بررسی داده های میکروارایه به کار رود (۱۳).

بسیاری از تغییرات می توانند پایداری دوپلکس miRNA و پــروب را افزایــش دهند. تغییــرات 2′-O-methyl در نوکلئوتیدها تمایل هیبریداســیون را افزایش می دهد. علاوه بر این به کار گیری LNA ها بســته به جایگاه بخش LNA در الیگونوکلئوتید، به ازای هر مونومر LNA، دمای ذوب را بین ٥°C تا ٨°C بالا می برد و می تواند تمایل اتصال پروب به دام افتاده را افزایش دهد. اگر چه آنالیز میکروارایه نیازمند به بهینه ســازی اســت، ابزاری مفید برای بررسی بیان یا بیان نابجــای miRNA ها در بافت مورد نظر اســت. به هر حال اطلاعات حاصل از میکرواری باید با اســتفاده از روش های تشخیصی دیگر، تایید شود (٤٥).

۳,۲. Real-Time PCR

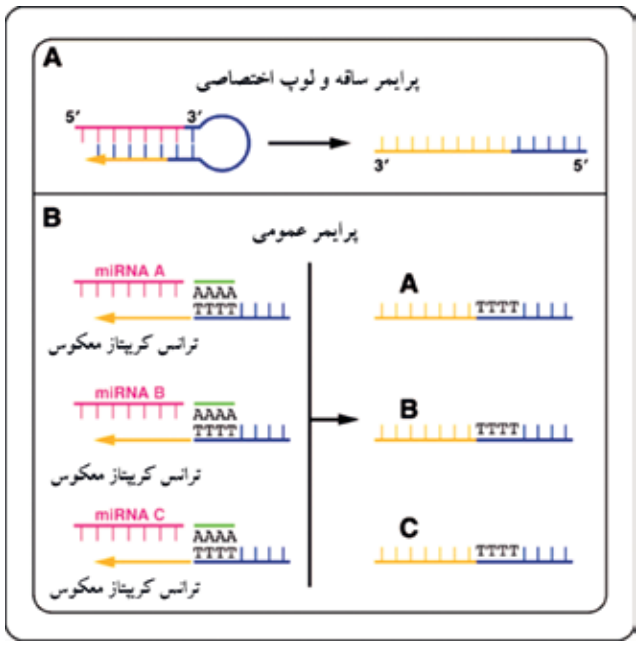
اگرچــه روش هــای پروفایــل بیانــی بــرای ایجــاد دیــد کلــی در مــورد حضــور و یــا تنظیــم miRNA هــا مفیــد هســتند، لازم اســت دقت ایــن داده ها به وســیله روش های خــاص miRNA، تاییــد شــوند. رایــج ترین تکنیــک برای تشــخیص miRNAهــا، آنالیــز real-time PCR اســت. واکنــش real-time miRNA، هــا بــا رونویســی معکوس RNA به cDNA، آغاز می شــود. طــول کوتاه miRNA ها، فقــدان دم پلــی A و این واقعیت که توالــی miRNA بالغ در pri-miRNA و pre-miRNA نیز وجود دارد، چالش های متعددی را برای رونویســی معکوس ایجاد می کند. با این حال امروزه از دو روش متفاوت برای رونویسی معکوس استفاده می شــود: رونویسی معکوس اختصاصی و یا عمومی miRNA ها (شــکل ٤). در روش اول، هر miRNA به وســیله پرایمرهای ساقه و لوپ[1] اختصاصی به صورت معکوس رونویسی می شوند. پرایمرهای ساقه ولوپ دارای سه بخش مختلف اند: بخش تک رشــته ای کوتاه، که مکمل توالی شــناخته شــده در انتهای 3′،

1- Stem–loop primers

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

miRNA اســت، قسمت دو رشته ای (ساقه) و لوپ که توالی عمومی متصل شونده به پرایمر است. cDNA حاصل سپس به وســیله یک پرایمر اختصاصی miRNA و یک پرایمر عمومی، بــرای PCR کمی به کار مــی رود. طراحی پرایمرهای ســاقه ولوپ بســیار سخت است ولی ســاختار آن ها اتصال پرایمر به pre-miRNA و pri-miRNA را کاهــش داده و در نتیجه اختصاصیت روش را افزایش می دهند (شــکل4A). در روش دوم یک توالی عمومی به همه miRNA ها اضافه شده و سپس miRNA به‌وســیله پرایمرهــای عمومی بــه صورت معکوس رونویســی می شود. این روش بســیار کاربرد دارد به خصوص زمانی که به آنالیز چندین miRNA مختلف با کمک مواد اولیه محدود نیاز باشد. به انتهای همه miRNA ها با استفاده از پلی A پلیمراز، دم پلی A اضافه می شود. هر پرایمر شامل یک توالی الیگو dT و یک توالی مشــترک متصل شده به پرایمر در انتهای 5′ اســت و برای آغاز رونویســی معکوس و تکثیر توالی های هدف در واکنش qPCR به کار می رود (شکل 4B).

اگرچــه روش های متعددی بــرای رونویســی معکوس یک miRNA وجود دارد، اختصاصیت و حساســیت سنجش های real-time وابسته به طراحی پرایمرهای اختصاصی miRNA اســت. زیــرا تمایــل اتصال یــک پرایمرکــه به وســیله توالی و میزان CG، miRNA مشــخص می شــود، تعیین کننده دمای ذوب توالی مکمل پرایمر اختصاصی miRNA است (۱۳-۱۱).



شــکل ۴: رونویســی معکوس miRNA. (A در اولین روش هر miRNA به وســیله پرایمرهای ساقه لوپ که به صورت اختصاصی عمل می کنند رونویســی معکوس می شــوند. این پرایمرها به فرمی طراحی شده اند که دارای سه بخش هســتند: یک ناحیه تک رشــته ای کوتاه که مکمل توالی شناخته شده در انتهای 3′ ، miRNA است، قسمت دو رشــته ای (ســاقه) و لوپ که توالی عمومی متصل شــونده به پرایمر است. cDNA سپس به عنوان الگو، به وسیله یک پرایمــر اختصاصــی miRNA و یک پرایمر عمومی، برای PCR کمی به کار مــی رود. B) در روش دوم یک توالی عمومی به همه miRNA ها اضافه شده و سپس miRNA به وسیله پرایمرهای عمومی به صورت معکوس رونویسی می شــود. این روش بســیار کاربرد دارد به خصوص زمانی که به آنالیز چندین miRNA مختلف با کمک مواد اولیه محدود نیاز باشد. به انتهای همه miRNA ها با استفاده از پلی A پلیمراز، دم پلی A اضافه می شود. هر پرایمر شامل یک توالی الیگو dT و یک توالی مشــترک متصل شــده به پرایمر در انتهای 5′ است و برای آغاز رونویسی معکوس و تکثیر توالی های هدف در واکنش qPCR به کار می رود (۱۳).

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]

References

1- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. cell, 116(2), 281-297.

2- Rusek, A. M., Abba, M., Eljaszewicz, A., Moniuszko, M., Niklinski, J., & Allgayer, H. (2015). MicroRNA modulators of epigenetic regulation, the tumor microenvironment and the immune system in lung cancer. Molecular cancer, 14(1), 34.

3- Baumjohann, D., & Ansel, K. M. (2013). MicroRNA-mediated regulation of T helper cell differentiation and plasticity. Nature Reviews Immunology, 13(9), 666-678.

4- Rameshwar, P. (2014). MicroRNA in Development and in the Progression of Cancer. S. R. Singh (Ed.). Springer.

5- Di Leva, G., Garofalo, M., & Croce, C. M. (2014). MicroRNAs in cancer. Annual review of pathology, 9, 287.

6- Qavi, A. J., Kindt, J. T., & Bailey, R. C. (2010). Sizing up the future of microRNA analysis. Analytical and bioanalytical chemistry, 398(6), 2535-2549.

7- O'Connell, R. M., Rao, D. S., Chaudhuri, A. A., & Baltimore, D. (2010). Physiological and pathological roles for microRNAs in the immune system. Nature Reviews Immunology, 10(2), 111-122.

8- Pauli, A., Rinn, J. L., & Schier, A. F. (2011). Non-coding RNAs as regulators of embryogenesis. Nature Reviews Genetics, 12(2), 136-149.

9- Mashima, R. (2015). Physiological roles of miR-155. Immunology.

10- Hata, A., & Lieberman, J. (2015). Dysregulation of microRNA biogenesis and gene silencing in cancer. Science signaling, 8(368), re3.

11- Pekarsky, Y., & Croce, C. M. (2015). Role of miR-15/16 in CLL. Cell Death & Differentiation, 22(1), 6-11.

12- Balatti, V., Pekarky, Y., & Croce, C. M. (2015). Role of microRNA in chronic lymphocytic leukemia onset and progression. Journal of hematology & oncology, 8(1), 12.

13- Wang, H., Li, J., Chi, H., Zhang, F., Zhu, X., Cai, J., & Yang, X. (2015). MicroRNA-181c targets Bcl-2 and regulates mitochondrial morphology in myocardial cells. Journal of cellular and molecular medicine.

[Downloaded from labdiagnosis.ir on 2023-06-10]