

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 مولکول های RNA کوتاهی با طول ۱۹ تا ۲۳ نوکلئوتید هستند که از طریق کنترل بیان ژن های مختلف به عنوان تنظیم کننده های اصلی گستره وسیعی از فرآیندهای بیولوژیکی شامل: تکامل اولیه، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز عمل می کنند. 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

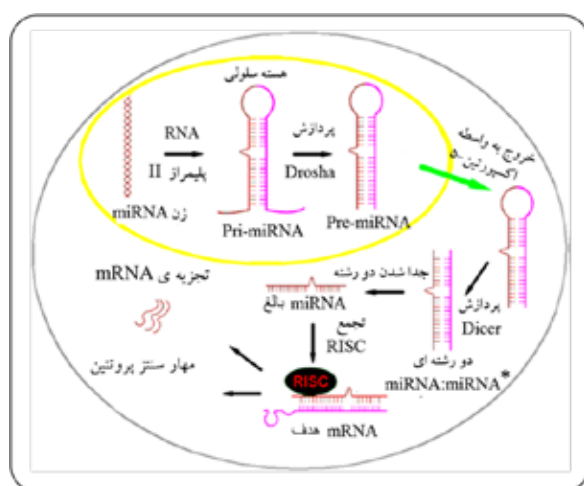
و ویروس ها، عمل می کنند. تولید miRNA ها فرآیندی چند مرحله ای است. همانطور که در شکل ۱ نشان داده شده است، ابتدا miRNA ها در هسته سلول از روی نواحی بین ژنی یا درون ژنی به وسیله RNA پلیمراز II به فرم miRNA های اولیه با طول ۱ تا ۳ کیلوباز، رونویسی می شوند. در ادامه این miRNA های اولیه در هسته به وسیله آنزیم 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 ۲۴ 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)، ملحق می شود. این در حالی است که رشته دیگر، 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



مؤثر باشد. در سال های اخیر روش های تشخیص و آنالیز miRNA ها به سرعت توسعه یافته است. با این حال آنالیز miRNA ها با توجه به بسیاری از ویژگی های منحصر به فرد آن ها مانند سایز کوچک، فراوانی پایین و شباهت در توالی بین اعضای یک خانواده نیازمند شرایط ویژه ای است.



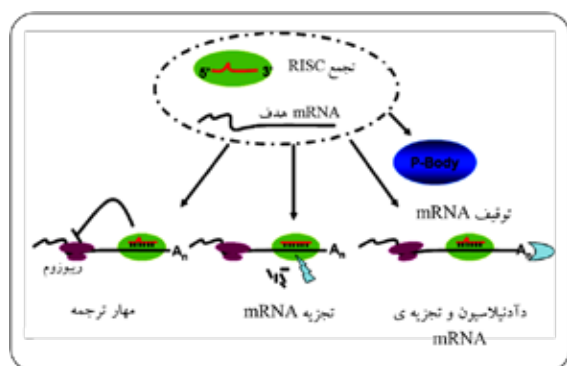
شکل ۱: بیوژنز و عملکرد miRNA ها. Pri-miRNA های تولید شده به وسیله RNA پلیمراز II، در هسته به وسیله اندونوکلاز Drosha به pre-miRNA پردازش می شوند. در ادامه Pre-miRNA ها به سیتوپلاسم منتقل شده و در آن جا به وسیله اندونوکلاز Dicer به miRNA های بالغ شکسته می شوند. سپس miRNA های بالغ به کمپلکس RISC ملحق شده و با اتصال به توالی های مکملشان در mRNA هدف منجر به مهار ترجمه و یا تجزیه آن ها می شوند (۲).

سایز کوچک miRNA ها بسیاری از روش های سنجش آن ها، که بر پایه PCR و یا هیبریداسیون است را پیچیده کرده است، زیرا پرایمرهای استفاده شده در بسیاری از PCR های معمولی از نظر طول به miRNA ها شبیه اند، در نتیجه پرایمرهای خیلی کوتاهی برای سنجش آن ها نیاز است که این عامل خود بر روی راندمان PCR تاثیر گذار است. همچنین در روش های تشخیصی بر پایه هیبریداسیون، نشان دار کردن پروب کوتاه برای شناسایی miRNA ها دشوار است در ضمن دمای ذوب دو رشته ای

عمل کرده و تخریب یا ممانعت از ترجمه و یا جداسازی mRNA از ماشین ترجمه را سبب می شود (شکل ۲) (۸). بیشتر miRNA های حیوانی به صورت ناقص با mRNA هدف خود جفت می شوند و بنابراین مکانیزم ممانعت از ترجمه برای بسیاری از miRNA ها صادق است. در نتیجه این مکانیسم اتصال، سطح پروتئین کاهش یافته و تاثیرات عمیقی بر روی هومئوستازی سلولی می گذارد که این مهم ترین موضوع برای فهم نقش miRNA ها به عنوان سرکوبگر تومور و بیومارکر است. تا کنون بیش از ۲۶۰۰ miRNA در انسان شناسایی شده است که می توانند بیشتر از ۳۰٪ از ژنوم انسان را مورد هدف قرار دهند (۹ و ۱۰). نکته قابل توجه این است که یک ژن می تواند به وسیله چندین miRNA تنظیم شود این در حالی است که یک miRNA نیز ممکن است بر اساس جفت شدن ناقص با هدفش، بیش از یک هدف داشته باشد. شواهد روز افزون نشان دهنده این موضوع است که miRNA ها نقش تنظیمی حیاتی را در گستره وسیعی از فرایندهای بیولوژیکی شامل: تکامل اولیه، تمایز سلولی، تکثیر، آپوپتوز و... ایفا می کنند. بنابراین بیان تغییر یافته miRNA ها با بیماری های متعددی در ارتباط است. مطالعات بیشماری ارتباط بین بیان ناهنجار miRNA ها و شروع و پیشرفت بیماری های انسانی، اختلالات ژنتیکی و تغییر عملکرد سیستم ایمنی، را نشان داده اند. miRNA ها می توانند هم به عنوان انکوژن و هم سرکوبگر تومور عمل کنند که نشان دهنده اهمیت آن ها در سرطان های انسانی است. بنابراین پروفایل بیانی miRNA ها می تواند به عنوان بیومارکر برای شروع بیماری به کار رود (۲). همچنین می توان از miRNA ها در ژن درمانی برای اختلالات ژنتیکی استفاده کرد. از طرف دیگر تلاش های بسیاری به منظور توسعه روش های درمانی بر پایه miRNA ها از طریق بازگرداندن بیان آن ها به میزان طبیعی، در سلول های سرطانی صورت گرفته است. با گسترش حوزه miRNA، توسعه استراتژی های تشخیصی کارآمد و قابل اعتماد برای miRNA ها در جهت درک عملکرد آن ها در مسیرهای تنظیمی مختلف، ضروری است که این عامل می تواند در گسترش روش های درمانی بر پایه miRNA ها در تست های تشخیصی در سطح مولکولی،

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 (۴). 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 توموری 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، دآدنیلایسیون و قرارگیری در اجسام پردازش کننده^۱ که در آن ها mRNA هدف miRNA از ماشین ترجمه جدا می شود (۲).

۲.۱، ۲.۱، ۲.۱ تنظیم miRNA ها در فرآیندهای فیزیولوژیکی مختلف
۲.۱، ۲.۱ miRNA ها و تکامل سلولی
عملکرد miRNA ها با کشف دو lin-4، miRNA و let-7، که در کنترل زمان تکامل لارو در C elegans

پروپ و هدفش نیز پایین است که به شدت باعث کاهش میزان هیپریداسیون و افزایش تلاقی هیپریداسیون می شود. بنابراین به کارگیری استراتژی های جدید در جهت افزایش اختصاصیت اندازه گیری 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 miRNA ها 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 می تواند 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 تقریباً به صورت کامل با miRNA جفت شود، شکسته و تجزیه می شود در غیر این صورت از ترجمه آن جلوگیری می شود. miRNA اصولاً از ناحیه 3'-UTR به ژن هدف متصل می شود ولی بررسی ها 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

1- processing body (P-body)



miRNA های مختلفی در مهار پرتوانی^۳ 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 ویژگی های 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 (۳۴). miRNA ها نقشی کلیدی در تنظیم تکامل و عملکرد سلول های ایمنی ذاتی دارند. بیان ثابت miRNA-155 می تواند تعداد گرانولوسیت های نابالغ را در *in vivo*، افزایش دهد. بررسی ها نشان داده اند که سطح بیان

miRNA-17-5P، miRNA-20a، miRNA-106a، miRNA-92-17 و خانواده های miRNA-106a-92 در طی تمایز سلول های پیش ساز همتوپوئیتیک 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 همتوپوئیتیک، miRNA ها با

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 (۶).

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. آزمایش ها نشان داده اند که miRNA-218، miRNA-126، miRNA-143 و miRNA-145 مسئول کنترل تکامل عروق و خون هستند. تکامل سلول های خونی نیز وابسته به عملکرد miRNA ها است.

۲،۱،۲. miRNA ها و تمایز سلولی

miRNA ها نقش چشمگیری در تمایز سلول های بنیادی جنینی^۱ دارند. برای مثال بیان miRNA-296 و دسته miRNA-290~295 در طول تمایز سلول های 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^۲، اندکی برطرف می شود (۲۹). از طرف دیگر

1- Embryonic stem (ES) cells

2- ES cell-specific cell cycle regulating miRNAs

3- pluripotency

تنظیم پاسخ ایمنی نیز در ارتباط اند. miRNA-155 می تواند به دنبال فعال شدن سلول های B در مرکز ژرمینال، افزایش بیان پیدا کند. miRNA-150 پروفایل بیانی دینامیکی را در طی تکامل لنفوسیت ها دارد. این miRNA در سلول های B و T بالغ بر خلاف سلول 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 آستانه سیگنالینگ گیرنده سلول های T، تغییر می کند و در نتیجه بر روی حساسیت سلول های T به آنتی ژن ها تاثیر می گذارد. علاوه بر این تنظیم دینامیک miRNA-181a در طول تکامل و بلوغ سلول های T، با تغییر در حساسیت 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 جایی که عملکرد miRNA ها در تنظیم فرآیندهای زیستی حیاتی، ضروری است به نظر می رسد که miRNA ها با پیش بینی، پیشرفت و علت بروز سرطان در ارتباط اند (۳۷). تغییر پروفایل بیانی miRNA ها یکی از ویژگی های معمول همه تومورهای انسانی است (۲). برای مثال miRNA-126، miRNA-143، miRNA-145 و miRNA-21 در نمونه های سرطانی در مقایسه 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 بیومارکری برای پیش بینی، تشخیص تقسیم بندی، پیشرفت و پاسخ به درمان در سرطان به کار می روند.

شواهد بسیاری نشان داده اند که miRNA-15a و miRNA-16-1 که در لوکوس 13q14 قرار دارند، در اکثر موارد CLL، کاهش بیان داشته و یا حذف شده اند. این دو miRNA به عنوان تنظیم کننده های منفی پروتئین BCL2، عمل می کنند، که این امر می تواند نشان دهنده مکانیسم مولکولی باشد که در نتیجه حذف miRNA-15a

و 16-1 miRNA می تواند منجر به CLL شود (۹). اختلال در بیان miRNA ها در سرطان ها می تواند در نتیجه چهار مکانیسم مختلف شامل: ناهنجاری های کروموزومی، جهش های ژنومی و پلی مورفیسم، تغییرات اپی ژنتیکی و تغییر در تولید miRNA ها، باشد. تومورهای مختلف از نظر برخی از ویژگی های مربوط به بیان miRNA ها به هم شبیه اند. اول از همه، پروفایل miRNA ها در سلول های 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 سرطان است. علی رغم این که برخی از miRNA ها افزایش می یابند، بیشتر آن ها در سرطان ها در مقایسه با بافت سالم، مهار می شوند. علاوه بر این تغییر در پروفایل بیانی، مربوط به یک miRNA نیست، که نشان دهنده این موضوع است که سرطان زایی و پیشرفت سرطان با تمامی miRNA سلول (miRNAome) در ارتباط است. دوم این که به نظر می رسد که پروفایل بیانی miRNA ها، در تومورهایی که منشا تکاملی یکسان دارند، تغییرات یکسانی دارند، که این امر خود می تواند به عنوان ابزاری برای پیش بینی و تشخیص سرطان 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 بدخیمی ها تغییر می کنند، شرکت دارند (۸).

۲.۲.۲ عملکرد miRNA ها به عنوان انکوژن

افزایش یا کاهش بیان miRNA ها می تواند به عنوان انکوژن و یا سرکوبگر تومور عمل کند. به عنوان مثال، miRNA-155 تنها miRNA ای است که به تنهایی می تواند تومورزایی را القا کند. مطالعات نشان داده اند که موش ترانس ژنیک با افزایش بیان miRNA-155 به لیمفوما در سطح بالا مبتلا می شود (۱۰). افزایش بیان miRNA-155 در بسیاری از بدخیمی های سلول های B مانند لیمفوما CLL، Hodgkin، تهاجمی و برخی از لیمفوماهای بورکیت گزارش شده است.



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

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 می کند. مرحله اول در میکرو آرایه miRNA، خالص سازی RNA یا miRNA از سلول ها یا بافت است. پروتکل های بسیاری به منظور استخراج RNA با کیفیت بالا، توسعه یافته اند. اگر چه امکان استفاده از کل RNA برای آنالیز میکروآرای وجود دارد، از آن جایی که miRNA ها تنها در حدود ۰،۱٪ 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

یکی از اولین miRNA های انکوژنیک شناخته شده، خوشه 92-17-miRNA است. این خوشه در انسان بر روی جایگاه کروموزومی 3q13 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 و miRNA-17-5p

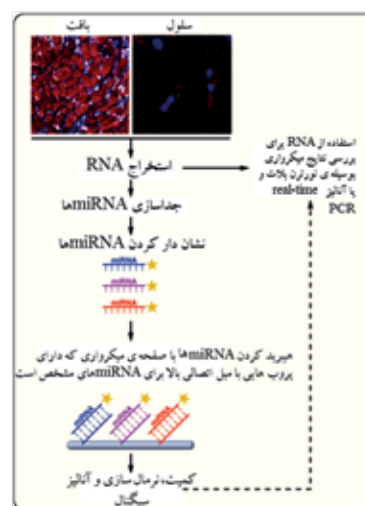
پردازش می شود (۱۴). خوشه 92-17-miRNA در انواع مختلفی از سرطان ها شامل لیمفوماها، سرطان های ریه و بسیاری دیگر، افزایش بیان پیدا می کنند. miRNA-21 مثال دیگری از miRNA های انکوژنی است که در بسیاری از انواع سرطان ها افزایش بیان دارد.

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 احتمالاً 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

شده با فلوروفور به انتهای 3' miRNA، نشان دار شوند. (شکل ۳)

در شناسایی miRNA ها با استفاده از آنالیز میکرواری، طراحی پروب مناسب بسیار ضروری است. در همه میکرواری های بیان ژن، الیگونوکلوئید های سنتزی و یا قطعات cDNA که دارای اختصاصیت و تمایل بالایی برای هر رونوشت هستند، به کار می روند. از آن جایی که miRNA ها خیلی کوتاه هستند (nt 19-23) طراحی پروب برای شناسایی آن ها با محدودیت هایی همراه است و براساس توالی miRNA دمای ذوب آن ها بین ۴۵°C و ۷۴°C در تغییر است. از آن جایی که میل ترکیبی miRNA های مختلف متفاوت است، اصولاً نباید برای شرایط کمی به کار رود ولی بهتر است برای مشخص کردن تغییرات نسبی بیان بین دو حالت مانند بیمار در برابر سالم و یا مشخص کردن حضور یک miRNA به کار رود. به هر حال بر اساس ویژگی های شیمی فیزیک یک miRNA، افزایش و یا کاهش طول یک پروب می تواند منجر به تعادل بهتر در دماهای ذوب پروب های miRNA شده و در نتیجه باعث می شود که آنالیز دقیق تری صورت بگیرد.



شکل ۳: آنالیز میکروارایه miRNA ها. اولین مرحله برای انجام آنالیز میکروارایه، خالص سازی miRNA های بالغ از سلول ها و یا بافت های تازه و یا فیکس شده است. miRNA ها بعد از استخراج با استفاده از یک رنگ، نشان دار شده و سپس مستقیماً با آرایه های دارای

پروب های اختصاصی برای miRNA ها هیبرید می شوند. قطعات دو رشته ای حاصل می توانند به آسانی شناسایی شوند. سپس از miRNA ها و یا tRNA برای نرمال سازی، تایید و مقایسه داده ها استفاده می شود. همچنین آنالیز qRT-PCR و نورترن بلات می تواند به منظور بررسی داده های میکروارایه به کار رود (۱۳).

بسیاری از تغییرات می توانند پایداری دوپلکس miRNA و پروب را افزایش دهند. تغییرات 2'-O-methyl در نوکلئوتیدها تمایل هیبریداسیون را افزایش می دهد. علاوه بر این به کار گیری LNA ها بسته به جایگاه بخش LNA در الیگونوکلوئید، به ازای هر مونومر LNA، دمای ذوب را بین ۵°C تا ۸°C بالا می برد و می تواند تمایل اتصال پروب به دام افتاده را افزایش دهد. اگر چه آنالیز میکروارایه نیازمند به بهینه سازی است، ابزاری مفید برای بررسی بیان یا بیان نابجای miRNA ها در بافت مورد نظر است. به هر حال اطلاعات حاصل از میکرواری باید با استفاده از روش های تشخیصی دیگر، تایید شود (۴۵).

۳.۲. Real-Time PCR

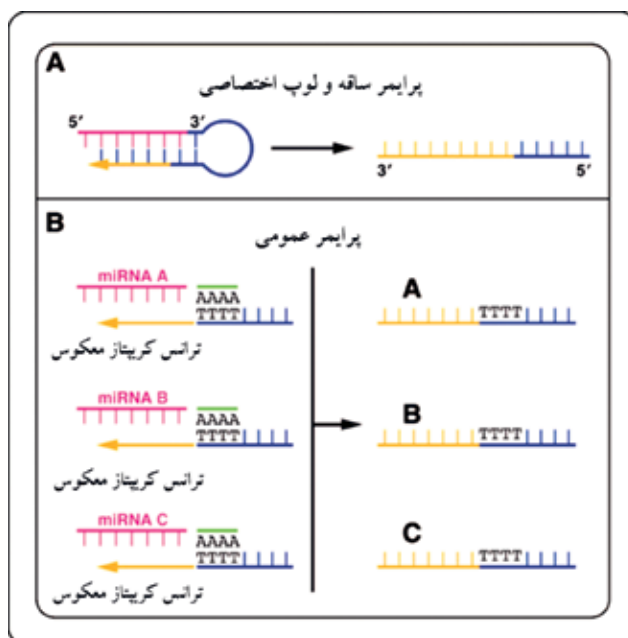
اگرچه روش های پروفایل بیانی برای ایجاد دید کلی در مورد حضور و یا تنظیم miRNA ها مفید هستند، لازم است دقت این داده ها به وسیله روش های خاص miRNA، تایید شوند. رایج ترین تکنیک برای تشخیص miRNA ها، آنالیز real-time PCR است. واکنش real-time PCR، miRNA ها با رونویسی معکوس RNA به cDNA، آغاز می شود. طول کوتاه miRNA ها، فقدان دم پلی A و این واقعیت که توالی miRNA بالغ در pri-miRNA و pre-miRNA نیز وجود دارد، چالش های متعددی را برای رونویسی معکوس ایجاد می کند. با این حال امروزه از دو روش متفاوت برای رونویسی معکوس استفاده می شود: رونویسی معکوس اختصاصی و یا عمومی miRNA ها (شکل ۴). در روش اول، هر miRNA به وسیله پرایمرهای ساقه و لوپ اختصاصی به صورت معکوس رونویسی می شوند. پرایمرهای ساقه و لوپ دارای سه بخش مختلف اند: بخش تک رشته ای کوتاه، که مکمل توالی شناخته شده در انتهای 3'،

1- Stem-loop primers



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 مشترک متصل شده به پرایمر در انتهای 5' است و برای آغاز رونویسی معکوس و تکثیر توالی های هدف در واکنش qPCR به کار می رود (شکل 4B). اگرچه روش های متعددی برای رونویسی معکوس یک miRNA وجود دارد، اختصاصیت و حساسیت سنجش های real-time وابسته به طراحی پرایمرهای اختصاصی miRNA است. زیرا تمایل اتصال یک پرایمر که به وسیله توالی و میزان CG، miRNA مشخص می شود، تعیین کننده دمای ذوب توالی مکمل پرایمر اختصاصی miRNA است (۱۱-۱۳).

miRNA است، قسمت دو رشته ای (ساقه) و لوپ که توالی عمومی متصل شونده به پرایمر است. cDNA حاصل سپس به وسیله یک پرایمر اختصاصی miRNA و یک پرایمر عمومی، برای PCR کمی به کار می رود. طراحی پرایمرهای ساقه و لوپ بسیار سخت است ولی ساختار آن ها اتصال پرایمر به pre-miRNA و pri-miRNA را کاهش داده و در نتیجه اختصاصیت روش را افزایش می دهند (شکل 4A). در روش دوم یک توالی عمومی به همه miRNA ها اضافه شده و سپس miRNA به وسیله پرایمرهای عمومی به صورت معکوس رونویسی می شود. این روش بسیار کاربرد دارد به خصوص زمانی که به آنالیز چندین miRNA مختلف با کمک مواد اولیه



شکل ۴: رونویسی معکوس miRNA (A) در اولین روش هر miRNA به وسیله پرایمرهای ساقه لوپ که به صورت اختصاصی عمل می کنند رونویسی معکوس می شوند. این پرایمرها به فرمی طراحی شده اند که دارای سه بخش هستند: یک ناحیه تک رشته ای کوتاه که مکمل توالی شناخته شده در انتهای 3'، miRNA است، قسمت دو رشته ای (ساقه) و لوپ که توالی عمومی متصل شونده به پرایمر است. cDNA سپس به عنوان الگو، به وسیله یک پرایمر اختصاصی miRNA و یک پرایمر عمومی، برای PCR کمی به کار می 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 شود. این روش بسیار 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 مشترک متصل شده به پرایمر در انتهای 5' است و برای آغاز رونویسی معکوس و تکثیر توالی های هدف در واکنش qPCR به کار می رود (۱۳).

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*.

