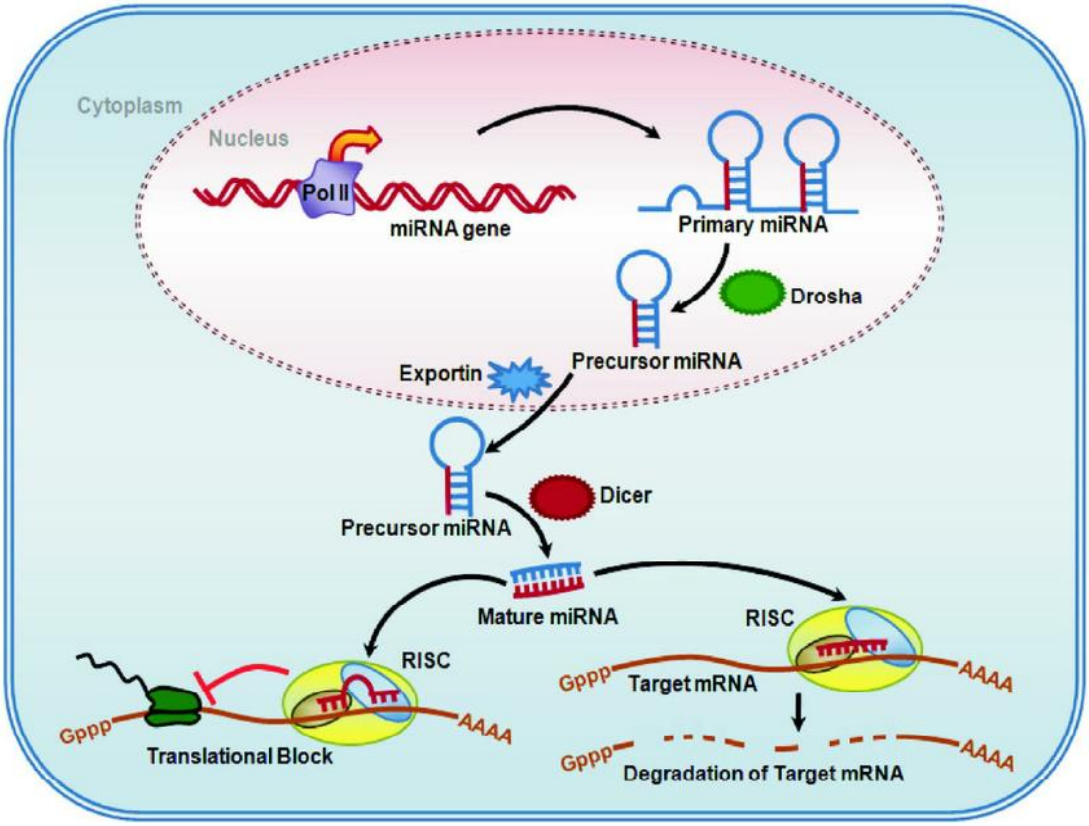
Micro M.RNA، مارکری برای تشخیص سرطان

الهام پوییده [۱]، دکتر احسان عارفیان [۲]، دکتر عباس اخوان سپهی [۳]

۱- کارشناس ارشد میکروبیولوژی دانشگاه علوم تحقیقات، تهران، ایران

۲- استادیار بخش ویروس‌شناسی، دانشکده زیست‌شناسی، پردیس علوم پایه، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۳- استاد گروه میکروبیولوژی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران



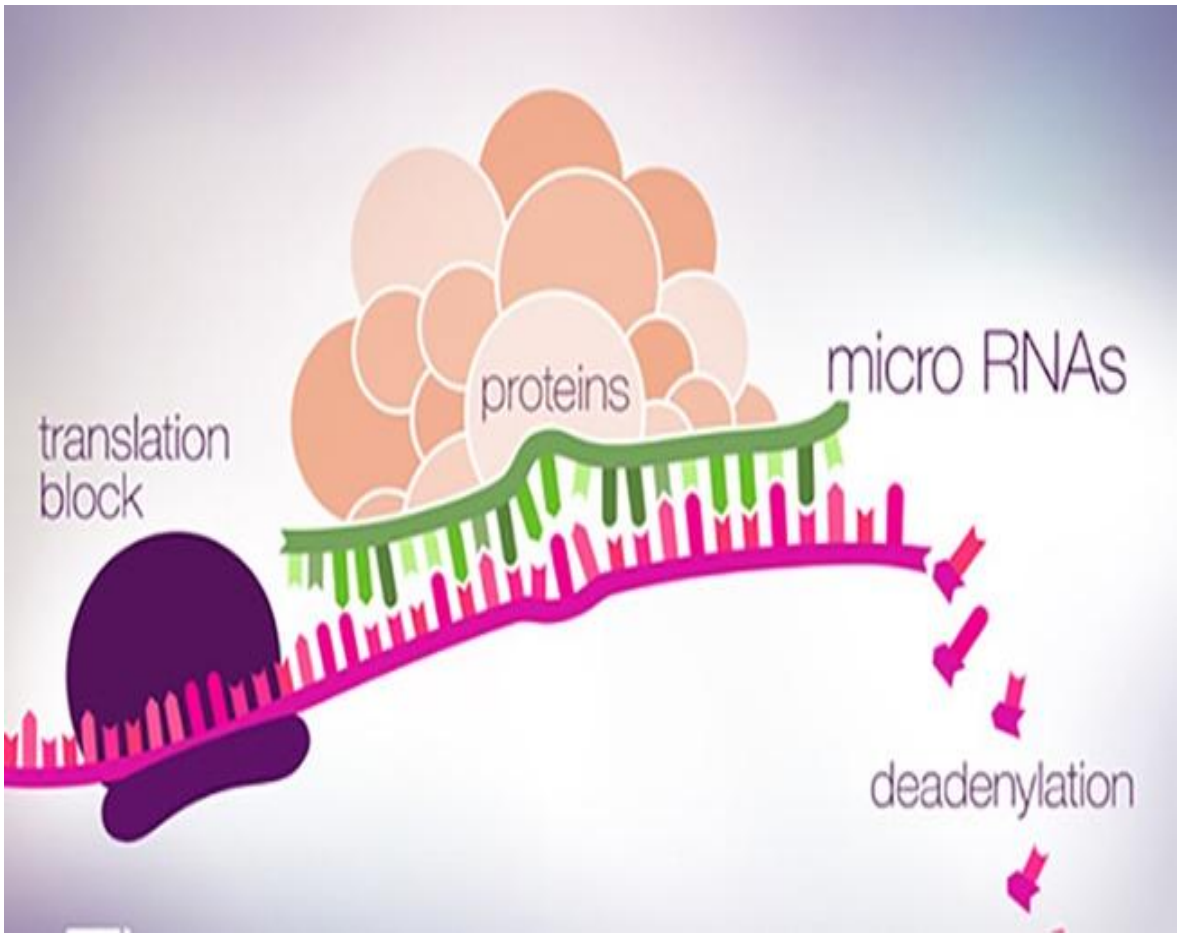
مقدمه

microRNAها (miRNAs)، RNAهای کوچک غیرکدگذار ۱۹ تا ۲۵ (معمولاً ۲۲) نوکلئوتیدی هستند که از پیش‌سازهای سنجاق‌سری ۷۰ الی ۱۰۰ نوکلئوتیدی، بریده شده‌اند. آن‌ها می‌توانند بیان ژن را از طریق تحریک تخریب مستقیم mRNA یا مهار ترجمه‌ی آن تنظیم نمایند؛ درواقع روی شبکه‌های بیان ژنی از طریق مهار mRNAهای هدف از راه میانکنش‌های جفت شدن‌های اختصاصی تأثیر می‌گذارند. miRها در یک رفتار اختصاصی برای بافت بیان شده و فاکتورهای حیاتی را در تنظیم مسیرهای مختلف درگیر در رشد و نمو، تمایز سلولی، تکثیر و آپوپتوز، تنظیم می‌کنند. حجم زیادی از اطلاعات نشان می‌دهد که miRها در بدخیمی‌های انسانی از تنظیم خارج شده‌اند. پیشنهاد شده که برخی از آن‌ها می‌توانند عملکردهای انکوژنی یا مهارگر توموری داشته باشند.

همگام با این عقیده، هردوی بیان بیش‌ازحد (overexpression) و خاموش شدن miRهای خاص، در برخی بیماری‌های قلبی عروقی و نیز بسیاری از انواع سرطان‌ها گزارش شده است؛ مثلاً کاهش بیان miRNAها در تومورها در مقایسه با بافت‌های نرمال دیده شده که نشان می‌دهد برخی از miRNAها به‌عنوان مهارگرهای توموری بالقوه عمل می‌کنند. برخی از مکانیسم‌هایی که در تنظیم بیان miRNAها دخیل هستند شامل تنظیمات خاص در سطح رونویسی، مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی از جمله متیلاسیون و داستیلاسیون هیستون‌ها و موتاسیون‌های ژنی است که روی پروتئین‌های شرکت‌کننده در پردازش و بلوغ miRNAها اثر می‌گذارند یا باعث تنظیم پایداری miRNAها می‌شوند.

مطالعات جدید نشان می‌دهند که بیان miRNAها می‌تواند توسط مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مختلفی از جمله متیلاسیون نابجا و غیرطبیعی نواحی پروموتری یا تغییرات هیستونی تنظیم شوند، بنابراین یکی از روش‌های خاموش‌سازی رونویسی miRها، می‌تواند مکانیسم‌های اپی‌ژنتیکی مرتبط با متیلاسیون DNA به‌صورت نابجا در 5`UTR باشد که این مسئله در بسیاری از انواع معمول TSGها دیده شده است. اتصال miRNA به mRNA باعث جدا شدن (splitting) اختصاصی، دآدنیلاسیون یا مهار ترجمه می‌شود. miRNAها ترجمه‌ی حدود ۶۰٪ از تمام ژن‌های غیرکدگذار انسانی را تنظیم می‌کنند. یک mRNA می‌تواند چند منطقه‌ی اتصال (binding site) برای یک یا چند miRNA داشته باشد، بنابراین اثر miRNAها روی مهار ترجمه‌ی mRNA، تشدید می‌شود.

بسیاری از ژن‌های miRها، درون اینترون‌های ژن‌های کدگذار پروتئین‌ها قرار دارند (و نتیجتاً از یک ترانسکریپت اولیه مشترک با ژن میزبان منشأ می‌گیرند)، بنابراین می‌توان پیش‌بینی کرد که به مهار رونویسی توسط متیلاسیون نابجای یک CpG island درون 5`UTR ژن میزبان حساس هستند. در برخی از موارد فرض شده که تنظیم رونویسی بیان ژن miR می‌تواند توسط تغییرات اپی‌ژنتیکی عناصر تنظیمی ژن میزبان به دست آید که می‌تواند دور از لوکوس miR، واقع شده باشد.



تولید (biogenesis) میکرو RNAهای انسانی

ژنوم انسانی حاوی بیش از ۱۰۰۰ ژن miRNA است که بیشتر آن‌ها توسط RAN پلیمراز II رونویسی می‌شوند.

مسیر متعارف تولید miRNA شامل پردازش هسته‌ای miRNA اولیه (Pri-miRNA) به‌وسیله‌ی ریبونوکلئاز Drosha و پردازش سیتوپلاسمی (Pri-miRNA)ها به‌وسیله‌ی ریبونوکلئاز Dicer است.

(Pri-miRNA): کلاهک‌گذاری (capped)، پلی‌آدنیله و حاوی یک یا بیشتر ساختمان سنجاق‌سری (Hairpine) می‌شود. این ساختمان سنجاق‌سری برای Pri-miR منحصربه‌فرد است که شامل یک شاخه‌ی ۳۰ bp است. این ساختمان به‌وسیله‌ی یک کمپلکس میکروپروسور حاوی ریبونوکلئاز Drosha (RNase III)، پروتئین اتصالی RNA بنام DGCR8 و تعداد دیگری پروتئین تشخیص و برش داده می‌شود.

ساختار DNA انسانی

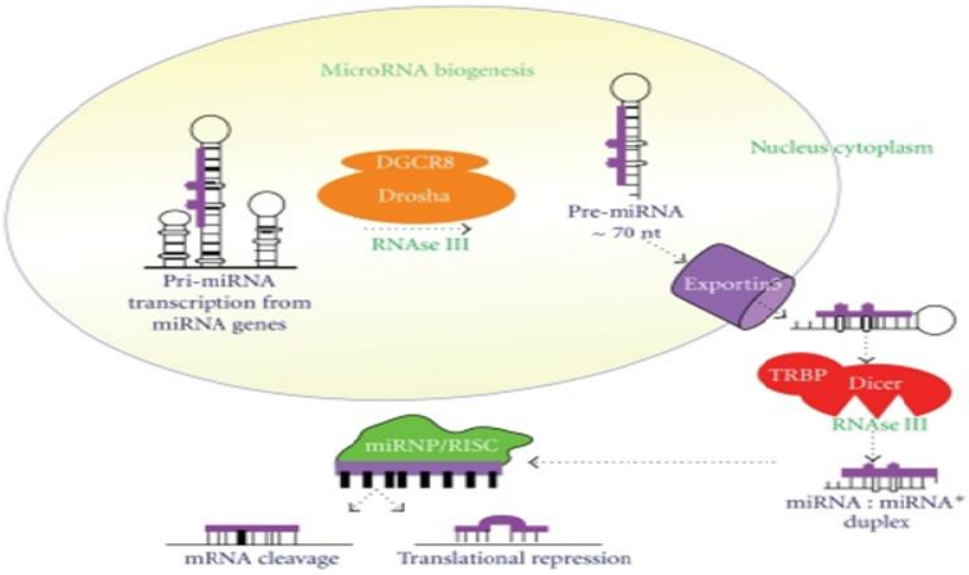
ماشین برش‌دهنده کمپلکس RISC، ریبونوکلئاز DICER یک RNase دیگر است که موجب تبدیـل Pre-miRNA به miRNA بـالغ می‌شود. که حاوی دو نوکلئوتید برآمده در دو انتهای ´ ۳ است.

DICER انسانی یک پروتئین ۲۰۰ Kd چند دومینی شامل دومین هلیکاز در انتهای N، یک دومین با عملکرد ناشناخته بنام DUF283 و یک دومین بنام PAZ و دو دومین حفاظت‌شده بنام‌های RIIIA و RIIIB و یک دومین اتصالی dsRNA در انتهای C است. اولین miRNA در سال ۱۹۹۵ مشخص شد، بااین‌حال عملکرد تنظیمی آن‌ها تا سال ۲۰۰۰ مشخص نبود. از آن زمان به بعد محققان نقش‌های مختلفی را در تأمین تنظیم منفی و تنظیم مثبت رونویسی و ترجمه کشف نمودند.

miRNAهای متفاوتی در سلول و بافت‌های مختلف بیان می‌شوند. هرگونه انحراف در بیان miRNAها موجب بیماری‌های متفاوت می‌شوند و در حال حاضر درمان با miRNA در حال بررسی و تحقیق است.

همان‌گونه که گفته شد میکرو RNAها کلاسی از RNAهای غیرکدکننده‌ی کوچک تک‌رشته‌ای هستند که بیان ژن را به‌صورت تنظیم منفی انجام می‌دهند. میکرو RNAها کنترل تجزیه miRNA یا مهار ترجمه را به‌وسیله‌ی اتصال به جایگاه‌های مکمل UTR'۳ ژن هدف به عهده دارند، بعلاوه میکرو RNAها نقش کلیدی را در چندین پروسه‌ی بیولوژیکی مانند کنترل سیکل سلولی، رشد و افتراق سلولی، اپوپتوزیس و تکامل جنین عهده‌دار

هستند، به همین صورت هرگونه اختلال در miRNAهای پروسه‌های فوق، موجب ایجاد بیماری مربوطه می‌شود، که به‌طورکلی به آن‌ها miR disease گفته می‌شود.



سیستم نام‌گذاری miRNAها

تحت یک سیستم نام‌گذاری استاندارد، miRNAها قبل از انتشار کشف آن‌ها می‌بایست نام‌گذاری و تأیید شوند؛ به‌طور مثال پسوند "mir" بعلاوه‌ی یک خط تیره و یک عدد می‌آید، مثل mir-123 که در این مثال " mir" اشاره دارد به pre-miRNA، درحالی‌که "miR" اشاره به شکل بالغ miRNA دارد.

miRNAهایی با توالی‌های مشخص نزدیک به هم با اختلاف ۲-۱ نوکلئوتید با حرف‌های کوچک مشخص می‌شوند، مثلاً mir-a۱۲۳ بسیار شبیه و مرتبط است با mir -b۱۲۳.

Pri-miRNAهای hsa-mir-194-1 و hsa-mir-194-2 دارای miRNAهای بالغ مثل هم هستند (hsa-mir-194)، اما آن‌ها در جایگاه‌های مختلف از ژنوم قرار گرفته‌اند.

منشأ گونه‌ی miRNA نیز با یک پسوند سه‌حرفی مشخص می‌شود، مثلاً hsa-mir-123 یک MiRNA انسانی است (homo sapiens) و oar-mir-123 یک میکرو RNA خوکی است (ovis aries).

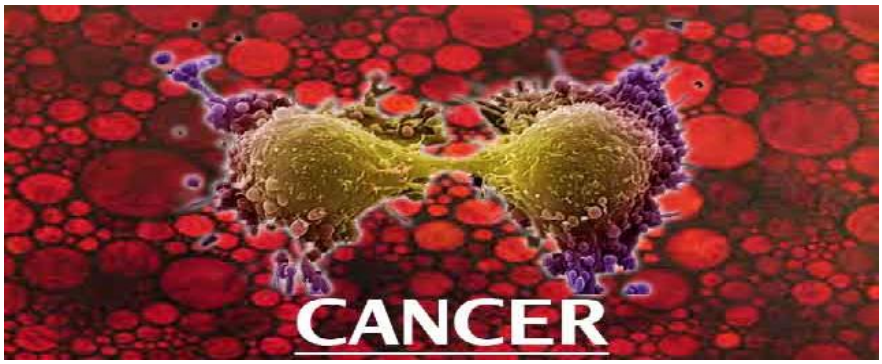
سایر حرف‌ها نیز بکار می‌رود، مثلاً پسوند "V" برای viral و پسوند "d" برای Drosophila. وقتی منشأ دو miRNA بالغ از بازوهای مقابل همان miRNA باشد با پسوند -p3 یا -p5 مشخص می‌شود.

امروزه با پیشرفت تکنیک‌های جدید مولکولی، امیدهای جدیدی در درمان بیماری‌های انسانی ظهور نموده است. یکی از این‌ها microRNAها هستند.

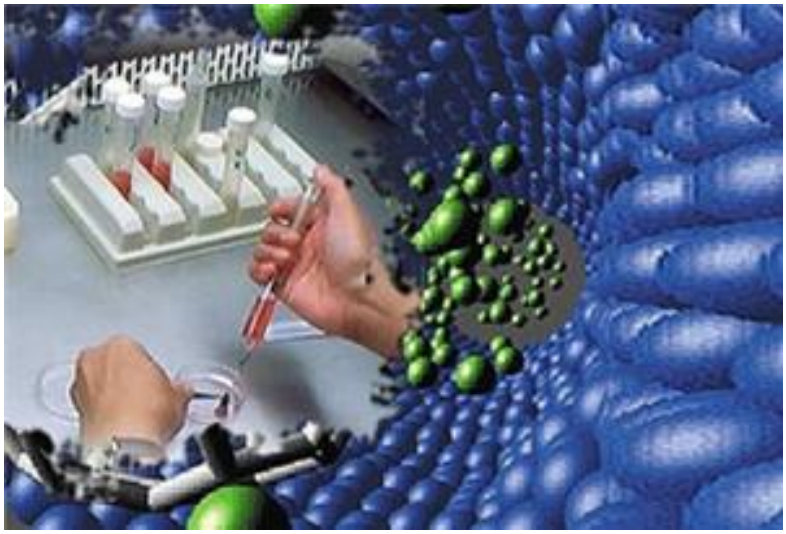
مطالعات جدید نشان داده‌اند که تا ۳۰٪ از ژن‌های انسانی و اغلب مسیرهای ژنتیکی توسط miRNAها تنظیم می‌شوند. بیش از ۵۰۰ miRNAی مختلف در سلول‌های انسانی شناخته شده است. در سال‌های اخیر microRNAها (miRNA) به‌عنوان عوامل مولکولی نوینی که در کارسینوژنز درگیر می‌شوند، شناسایی شده‌اند؛ به‌نحوی‌که از تنظیم خارج شدن بیان آن‌ها در سرطان‌های مختلف انسانی شناسایی شده است. کشف microRNAها، گروهی از RNAهای غیرکدگذار تنظیمی، دیدگاه جدیدی در مورد تشخیص و مدیریت سرطان نمایان کرده است. شرکت RNAهای غیرکدگذار در کارسینوژنز و پیشرفت تومور توسط بسیاری از مطالعات عملکردی در دهه‌های اخیر تأیید شده است. از میان تمام انواع ncRNAها، microRNAها به دلیل فراوانی از تنظیم خارج شدنشان در سرطان، بیش از همه موردتوجه قرار گرفتند. MiRها دسته‌ای بزرگ از RNAهای اندوژن کوچک غیرکدگذار سلول را تشکیل داده و بیان ژن را پس از رونویسی، تنظیم کرده و بسیاری از مکانیسم‌های مولکولی از جمله تمایز بافتی، تکثیر سلولی، تقسیم سلولی، تمایز سلولی، عدم تقارن نورونی، متابولیسم، مشخصه و ویژگی‌های سلولی، آپوپتوز و عفونت ویروسی را کنترل می‌نمایند. پیش‌بینی شده است که هر miRای تعداد زیادی mRNA را براساس جفت‌شدگی توالی آن‌ها با سکانس seed در 3`UTRاش، هدف‌گیری می‌نماید که این هدف‌گیری نتایج متمایزی دارد، بنابراین اختلال در بیان miRها می‌تواند از طریق هدف‌گیری تعداد زیادی mRNA، باعث سرعت بخشیدن به آغاز تومورزائی، تکثیر آن یا مهار آپوپتوز و نیز تهاجم شود.

MicroRNAها و اهمیت آن‌ها به‌عنوان مارکر در تشخیص سرطان

MicroRNAها، در پاتوژنز انواع مختلفی از سرطان‌ها دخیل هستند. شواهد زیادی پیشنهاد می‌کنند که miRها می‌توانند به‌عنوان انکوژن (oncomiR) یا ژن مهارگر تومور (tsmiR) عمل کنند و در مراحل اولیه‌ی کارسینوژنز دخیل باشند. الگوی بیان miRها می‌توانند برای طبقه‌بندی انواع مختلف سرطان مورداستفاده قرار بگیرند و پروفایل‌های بیانی آن‌ها می‌توانند کاربردهای prognostic و نیز درمانی داشته باشند.



در مقایسه با mRNA، تعداد کمتری از miRها می‌توانند برای اهداف کلینیکی کافی باشند. به‌طور جالب‌تری، miRها در بافت‌های مختلف به میزان زیادی دست‌نخورده باقی می‌مانند و عملاً به‌واسطه تخریب توسط RNA تحت‌تأثیر قرار نمی‌گیرند. تمام این مشخصه‌ها، miRهـا را یـک ابـزار بسـیار جالب و سودمند برای تشخیص زودهنگام تومور، تعیین پیش‌آگهی و درمان آن می‌سازد. دلیل بیان افتراقی گسترده‌ی miRها بین سلول‌های طبیعـی و سلول‌های توموری هنوز نامشخص اسـت. حـدوداً ۲۰ درصـد از تمـام miRهـا، درون CpG islandهـا قـرار دارنـد. کـم شـدن بیـان global در microRNAها، یک مشخصه‌ی شایع در سرطان است. از آنجائی که هایپرمتیلاسیون جزایر CpG مکانیسمی برای خـاموش‌سـازی miRهـا فـراهم می‌کند، اکثر محققین تنها گزارش کرده‌اند که miRNAها فقط با mRNAها در 3`UTRشان میـانکنش مـی‌کننـد، ولـی تحقیقـاتی هـم گـزارش شده‌اند که miRNAها به نواحی 5`UTR و یا CDS یک mRNA نیز متصل می‌گردند. اولین مرحله در پردازش miRNAهـا بـا بـرش خـوردن رونوشت‌های miRNAی اولیه یا pri-miRNAها توسط کمـپلکس Drosha/DGCR8 در هسـته انجـام مـی‌شـود. سـاختارهای سـاقه-حلقـه‌ی miRNA، می‌توانند در اینترون‌های ژن‌های کدگذار پروتئین یا ژن‌های RNAهای غیرکدگذار و یا در اگزون‌های ژن‌هـای غیرکدگـذار یـا در نـواحی بین‌ژنی باشند. اکثریت miRNAهای انسانی در اینترون‌ها قرار دارند. تقریبـاً ۱۰٪ از miRNAهـا از جملـه miR-137،miR-155، miR-146a، miR-22 و miR-34a، درون اگزون‌های ژن‌های غیرکدگـذار قـرار دارنـد. اطلاعـات کنـونی در مـورد پـردازش pri-miRNAهـا بیشـتر در مـورد miRNAهای اینترونی یا بین ژنی به‌دست‌آمده است. پردازش miRNAهـای اینترونـی همزمـان بـا رونویسـی در تعـاون و همکـاری بـا splicing رونوشت‌های اولیه انجام می‌شود. اجزای microprocessor و spliceosome، در یک کمپلکس قرار داشته و با همـدیگر پـیش‌سـازهای miRNA (pre- miRNA) و رونوشت‌هـای spliced شـده را از pri-miRNAهـای splice نشـده تولیـد مـی‌کننـد (۱). Splicing بـرای پـردازش pri-miRNAها لازم نیست، ولـی گرد هم آمدن spliseosome می‌تواند میـــــزان رها شدن pre-miRNAها را از اینتـرون‌هـای pri-miRNAای، افـــــــــــزایش دهـــــــــــد. بـــــــــــرای miRNAهـــــــــــای اگزونـــــــــــی، آزاد شـــــــــــدن pre-miRNAها، اگزون pri-miRNA را مختل کرده و روی تشکیل رونوشت‌های spliceشده، تأثیر می‌گذارد، بنابراین احتمالاً رونوشت‌هـای-pri miRNAی spliceنشده‌ی miRNAهای اگزونی، رونوشت‌های pre-miRNA یا spliceشده تولید می‌کننـد. پـردازش miRNAهـای اگزونـی هنوز با جزئیات دقیق مطالعه نشده است.



اغلب miRNAهای اگزونی درون ژن‌های RNAای غیرکدگذار قرار دارند که تنها عملکردشان این است که ژن میزبان آن miRNA باشند. همان‌طور که بیان شد، برخلاف miRNAهای اینترونی، فرایند پردازش رونوشت‌های pri-miRNA از miRNAهای اگزونی به pre-miRNAها، با فرایند طبیعی splicing رونوشت، تداخل می‌کند. عقیده بر این است که miRNAهای اگزونی نسبت به miRNAهای اینترونی، مسیرهای فیزیولوژیکی مهم‌تری را تنظیم می‌کنند، مثـــلاً miRNA-155 و miRNA-146a، برای اجزای تنظیمی پاسخ ایمنی و hematopoiesis و کارسینوژنز حیاتی بوده وmiRNA-22 ، نقش مهم در فرایند کارسینوژنز دارد. miRNA-137، یکی از مهم‌ترین این دسته از miRNAها بوده و به دلیل فعالیت ضدتوموری شایانی که داراست، نقش بسیار مهمی در کارسینوژنز کولورکتال دارد.

منابع:

1. Kataoka N, Fujita M, Ohno M. Functional association of the Microprocessor complex with the spliceosome. Molecular and cellular biology. 2009;29(12):3243-54.
2. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. Nature reviews Genetics. 2011;12(12):861-74.
3. Place RF, Li LC, Pookot D, Noonan EJ, Dahiya R. MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2008;105(5):1608-13.
4. Farazi TA, Spitzer JI, Morozov P, Tuschl T. miRNAs in human cancer. The Journal of pathology. 2011;223(2):102-15.
5. Salmena L, Poliseno L, Tay Y, Kats L, Pandolfi PP. A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? Cell. 2011;146(3):353-8.
6. Finnegan EF, Pasquinelli AE. MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. Critical reviews in biochemistry and molecular biology. 2013;48(1):51-68.

7. Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. Nature reviews Drug discovery. 2013;12(11):847-65.

8. Sundarbose K, Kartha R, Subramanian S. MicroRNAs as Biomarkers in Cancer. Diagnostics. 2013;3(1):84-104.

9. Li W, Zhang X, Zhuang H, Chen HG, Chen Y, Tian W, et al. MicroRNA-137 is a novel hypoxia-responsive microRNA that inhibits mitophagy via regulation of two mitophagy receptors FUNDC1 and NIX. The Journal of biological chemistry. 2014;289(15):10691-701.