ریزRNA : کوچک اما راهبردی و پر رمز و راز *(مقاله مروری)*

دکتر محمدرضا نوری دلویی[1*]
احسان الوندی[1]

۱. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

چکیده

ریزRNA ها دسته ای از مولکول های کوچک از جنس RNA می باشند که از روی آنها پروتئینی ساخته نمی شود. طولی در حدود ۲۳-۲۱ نوکلئوتید دارند و تا کنون بیش از ۱۶۰۰ نمونه از آنها در گیاهان و جانوران و حتی چند نمونه در ویروس ها شناسایی شده اند و به عنوان بازدارنده، نقش مهمی را در تنظیم بیان ژن ها ایفا می کنند. این RNA ها با اثر بر mRNA هدف، چه با قطع آن و چه از طریق مهار ماشین ترجمه، از تولید پروتئین ممانعت به عمل می آورند. با این که این موضوع به مدت طولانی از دید پژوهشگران پنهان مانده بود، مطالعات انجام شده در پنج سال اخیر کمک شایانی به شناسایی گونه های مختلف و نیز نحوه عملکرد آنها داشته است. در این مقاله مروری، با استفاده از ده ها منبع معتبر و روزآمد، مطالبی پیرامون تاریخچه، سازوکار مولکولی تولید و ژن های بیان کننده ریزRNA و نیز چگونگی پردازش آنها در انسان، جانوران و گیاهان ارائه شده است. به علاوه، پیرامون نامگذاری، تنوع عملکردی و به ویژه رابطه آنها در بروز بیماری ها (به طور مشخص سرطان) و شباهت ها و تفاوت های آنها با siRNA ها، جدیدترین اطلاعات جاری مورد تاکید قرار گرفته است. در انتها چشم انداز این مولکول های راهبردی، فوق العاده جالب و شگفت انگیز، مورد توجه قرار گرفته است.

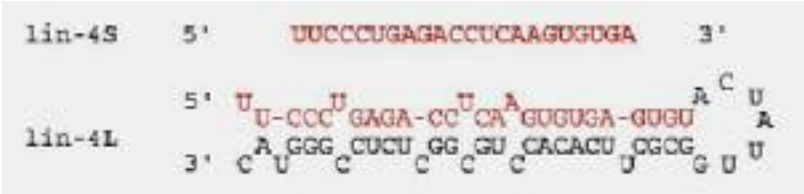
کلمات کلیدی: ریز RNA، بیان ژن، تمایز سلول بنیادی، سرطان

نشانی: تهران، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تلفن: ۸۸۹۵۳۰۰۵، پست الکترونیک: nooridaloii@tums.ac.ir

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

تاریخچه و مقدمه

نخستین بار در سال ۱۹۹۳، به هنگام مطالعه ژن های دخیل در نمو کرم نماتود Caenorhabditis elegans ، Lee و همکاران موفق به کشف RNA ی lin-4 شدند [۱]. جهش در این ژن با برهم زدن نظم در مراحل رشد و نمو، موجب عدم تغییر سلول های جنینی از اولین مرحله لاروی (L1) به مراحل بعدی می شود. این پژوهشگران دریافتند که از ژن lin-4 پروتئینی سنتز نمی شود و به جای آن دو نوع RNA کوچک ساخته می شود: یک RNA کوتاه ۲۲ نوکلئوتیدی (lin-4s) و RNA دیگری که طول بیشتری در حدود ۶۰ نوکلئوتید دارد (lin-4l). آنها همچنین در یافتند که RNA بلندتر در هنگام تا شدن، ساختار ساقه- حلقه پیدا می کند (شکل ۱).



شکل ۱- دو نوع RNA ی تولید شده از ژن lin-4

مطالعات بعدی توسط Wightman نشان دادند که ژن lin-4 تنظیم کننده منفی ژن lin-14 می باشد. ژن اخیر پروتئینی با عمر کوتاه تولید می کند و در نمو جنین کرم نقش دارد. نکته جالب، تلاقی زمانی کارکرد تنظیمی و غیر مداوم lin-4 RNA و بیان پروتئین LIN-14 می باشد. در واقع با حضور lin-4 RNA ، میزان پروتئین LIN-14 سلول ها تا بیست برابر کاهش می یابد [۲]. تحقیقات هر دو گروه Ambros و Ruvukun بیان کننده این واقعیت بودند که در بخش ´3 UTR (ناحیه غیر قابل ترجمه :´3 Untranslated region) در mRNA ی ژن lin-14 ، قسمت های مختلفی وجود دارند که از نظر توالی مکمل توالی lin-4 RNA می باشند[۱و۲].

پیگیری آزمون ها توسط Ruvukun و همکاران منجر به این کشف این نکته شد که اتصال بین این دو مولکول RNA ، دلیل اصلی اثر منفی lin-4 RNA بر lin-14 mRNA می باشد. به علاوه، اتصال ذکر شده تنها موجب کاهش میزان پروتئین LIN-14 می شود و بر مقدار lin-14 mRNA هیچ تاثیری ندارد[۱]. مطالعات انجام شده بر روی کرم C. elegans در واقع افق جدیدی را در زمینه کنترل بیان ژن باز کرد.

برای مدت هفت سال (۲۰۰۰-۱۹۹۳)، lin-4 تنها مولکول RNA ی شناخته شده‌ای بود که با اتصال به مولکول RNAی دیگر، بیان پروتئین آن را مهار می کرد. اما در سال ۲۰۰۳ پژوهش‌های Reinhart و همکاران منجر به کشف RNA جدیدی به نام let-7 در نماتود C. elegans شد که نقشی مشابه lin-4 داشت [۳]. همانند lin-4 ، جهش در ژن let-7 موجب بر هم ریختن نظم ترتیبی مراحل نموی کرم، از مرحله سوم لاروی (L3) به بلوغ شد. پژوهش ها نشان دادند که ژن let-7 دقیقا مانند ژن lin-4 دو نوع RNA با همان مشخصات تولید می کند با این تفاوت که این RNA با اتصال به mRNA ژن lin-41 و در محل ´3 UTR و موجب مهار تولید پروتئین از آن می شود. همچنین بیان ژن let-7 با کاهش میزان پروتئین LIN-41 در مرحله سوم لاروی سازگار است. به دلیل نقش موقتی این دو RNA در مهار تولید پروتئین های ذکر شده،

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

آنها بـه stRNA (small temporal RNA) کوچـک و مـوقتی شهرت یافتند.

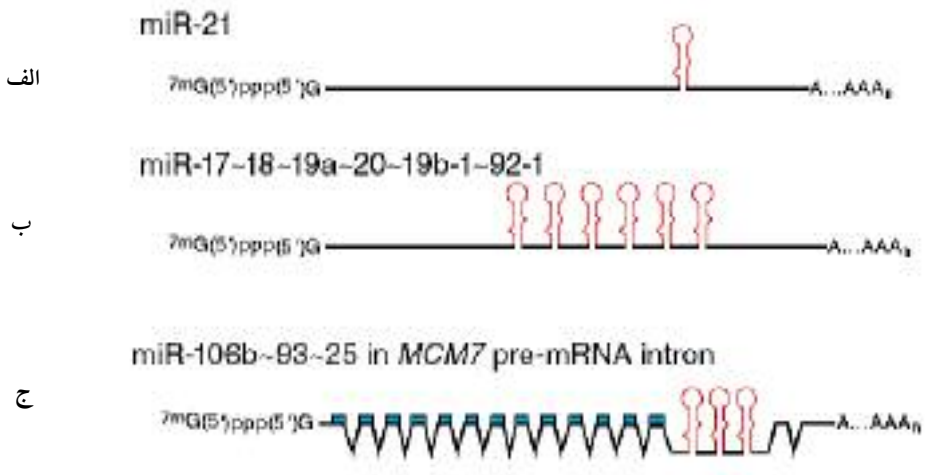
پژوهش‌های گروه Pasquinelli، با بررسی احتمال وجـود ایـن نوع RNA در سایر موجودات دنبـال شـد. در نتیجـه، ژن هـم ساخت let-7 در مگس سرکه و حتی موش و انسان نیز کشف شـد [۴]. جسـتجو هـای بعـدی دانشـمندان در زمینـه کشـف RNAهایی با ویژگی‌های ذکر شده، منجر به یـافتن در حـدود ۶۰ نمونه در نماتود C. elegans ، ۲۰ نمونه در مگس سرکه و ۳۰ نمونه در انسان گردید که بسـیاری از آنهـا در گونـه هـای نزدیک، توالی های یکسان داشتند.

همین امر موجب شد که از واژه microRNA (ریـز RNA) یـا به اختصار miRNA استفاده شود. ریـزRNA ، در واقـع بـه آن دسته از مولکول های RNA اطـلاق مـی شـود کـه طـولی در حدود ۲۱ تا ۲۳ نوکلئوتید دارند و به طور معمول با اتصال بـه بخش 3′ UTR یـک mRNA هـدف، تولیـد پـروتئین از آن را کاهش می دهد یا متوقف می‌کند [۷-۵].

در سال های بعد با پیشرفت ابزار و فنـون متنـوع، ایـن تعـداد افزایش یافت و پیش بینی احتمالی mRNA هدف هـر یـک از ریزRNA ها نیز میسر گشت. این فرضیه نیـز مطـرح شـد کـه ریزRNA هـا، بخـش عمـده ای از شـبکه تنظـیم بیـان ژن در جانوران را تشکیل می دهند. تا کنون بـیش از ۱۶۰۰ نمونـه از آنها در جانوران ، گیاهان و حتی چنـد نمونـه در ویـروس هـا شناسایی شده اند. تخمین زده می شود که ژنوم انسان، چیـزی در حدود ۸۰۰ تا ۱۰۰۰ ریزRNA را در خود جای داده اسـت که بسیاری از آنها ویژه انسان هستند [۸].

ژن های بیان کننده ریزRNA ها

ژن ریزRNA ها، توسط RNA پلیمراز II بیان می شود و در موجودات مختلف ژن‌های بیان کننده شمار زیـادی از آنهـا در کنار توالی‌های کد کننده پروتئین یافت نمی‌شوند. این ژن هـا، به طور کلی یا بـه صـورت مجـزا از یکـدیگر و یـا در شـکل گروهی و پشت سرهم (دارای یک پروموتر و واحد تنظیمـی) دیده می شوند [۹]. با آنکه اکثریت ژن‌هـای ریـزRNA هـا در کرم‌ها و انسان به طور مجزا قرار گرفته اند، در حدود نیمـی از این ژن‌ها در مگس سرکه در حالت گروهی دیده می شوند که اغلب دارای عملکرد مشابهی می باشند[۱۰] (شکل ۲).



شکل ۲- شکل‌های متفاوت جایگاه های ریز RNA ، این مثال ها از ژنوم انسان انتخاب شده اند

الف) ژن miR-21 به صورت منفرد با واحد تنظیمی مستقل

ب) کنار هم قرار داشتن جایگاه ۶ ریز RNA با یک واحد تنظیمی مشترک

ج) موقعیت ۳ جایگاه ریز RNA درون اینترون ژن MCM7

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

شایان تاکید است که در حدود نیمی از ریزRNA های شناخته شده پستانداران، در درون اینترون های ژن های کد کننده پروتئین قرارگرفته اند که نمایانگر بیان همزمان آنها و پروتئین مربوطه می باشد و حتی می تواند نشان دهنده نقش تعاملی این دو باشد [۱۱].

بسیاری از ریزRNA ها در میان جانوران خویشاوند مانند انسان و موش و نیز در نماتودهای C. elegans وC. briggase، مشترک هستند. علاوه بر این، ژن هم ساخت حدود یک سوم از ریزRNA های یافت شده در نماتود ها در انسان نیز مشاهده شده اند. به عنوان مثال از خانواده ژن let-7 ، در نماتودها ۴ عضو و در انسان ۱۵ عضو شناسایی شده است. این امر می تواند شاهدی بر مسیر های تکامل زیستی جانوران باشد[۱۰].

پردازش ریزRNA ها در جانوران

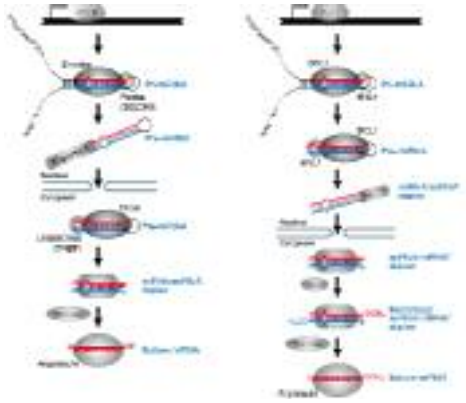
ریزRNA در ابتدا به شکل یک مولکول ریزRNA ی اولیه (primary miRNA: pri-miRNA) بیان می‌شود. طول این مولکول از حدود چند صد تا چند هزار نوکلئوتید متفاوت است و در آن ساختار های ساقه- حلقه نیز دیده می شود[۱۲].

تولید ریزRNA بالغ در دو مرحله انجام می گیرد (شکل ۳- الف). در هر یک از این مراحل یک آنزیم ریبونوکلئاز نوع III (RNase III) به همراه یک پروتئین واجد قلمرو متصل شونده به RNA دو رشته‌ای(double stranded RNA Binding Domain: dsRBD) شرکت دارند. در مرحله اول، در درون هسته آنزیم Drosha به عنوان یک RNase III با بریدن قسمت هایی ازpri-miRNA، مولکولی دارای ساختار ساقه-حلقه در حدود ۷۰ نوکلئوتید به نام پیش ریزRNA (precursor miRNA: pre-miRNA) تولید می- کند [۱۳]. Drosha بر اساس وجود یک حلقه انتهایی با طولی بیش از ۱۰ نوکلئوتید، یک ساقه دو رشته ای با ساختار مارپیچی و ساختار های تک رشته ای در ابتدای این مارپیچ، pri-miRNA را شناسایی می کند[۱۴].

Drosha برای برش دقیق و کارآمد pri-miRNA به یک پروتئین dsRBD احتیاج دارد. این پروتئین با نام Pasha در مگس سرکه، Pash-1 در نماتود C. elegans و DGCR8 در پستانداران شناسایی شده است. به مجموعه تشکیل یافته از مجموع دو پروتئین Drosha و dsRBD، میکروکمپلکس یا «ریز مجموعه» گفته می‌شود [۱۵].

pre-miRNA حاصله در ساختار خود دارای یک انتهای ´5 فسفاته و یک انتهای ´3 هیدروکسیله می باشد. همچنین در انتهای´3 آن ۲ یا ۳ نوکلئوتید به صورت آزاد و جفت نشده قرار دارند. ویژگی‌های ذکر شده، شاخص‌های برش و پردازش آنزیم‌های RNase III می‌باشد. در ادامه پروتئینی به نام Exportin 5/Ran GTP ، به نحو اختصاصی، pre-miRNA ها را بر اساس شاخص های گفته شده، شناسایی کرده و آنها را از هسته به سیتوپلاسم منتقل می کند [۱۶].

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]



شکل ۳-پردازش microRNA الف- در جانوران، ب- در گیاهان.

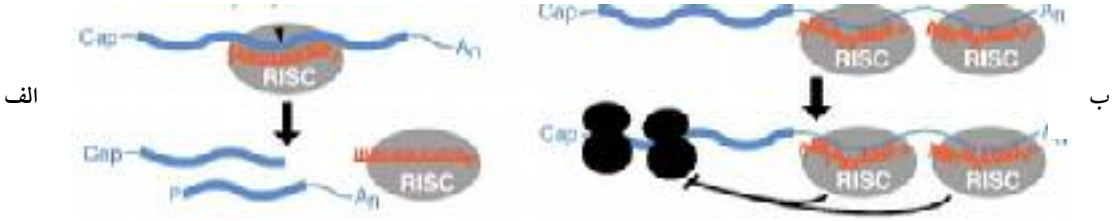
در سیتوپلاسم، RNase III دیگری به نام Dicer به همراه یک پروتئین dsRBD به نام Loquacious در مگس سرکه یا TRBP در انسان به pre-miRNA متصل می شود و با بریدن آن، مولکول *miRNA/miRNA را تولید می کنند. این مولکول فاقد ساختار حلقه ای می باشد و در واقع یک مولکول RNA دو رشته ای می باشد که در هر دو پایانه آن یک انتهای ´5 فسفاته و یک انتهای ´3 هیدروکسیله دیده می شود. به علاوه در انتهای ´3 دو یا سه نوکلئوتید به صورت آزاد دیده می شوند. از دیگر ویژگی های مهم *miRNA/miRNA آن است که در ساختار آنها لزوما تمام بازها با هم جفت نشده اند و در واقع در قسمت دو رشته ای این مولکول، اتصال های ناکاملی بین دو رشته دیده می شوند [۹].

رشته miRNA از دوپلکس *miRNA/miRNA ، وارد مجموعه ای می شود که در نهایت به همراه آن، تولید پروتئین از mRNA هدف را مهار می کند. رشته دیگر(*miRNA) از بین می رود. این مجموعه RISC نام دارد (مجموعه خاموش کننده : RNA-induced Silencing Complex). شناسایی رشته miRNA بوسیلهRISC بر اساس پایداری دمایی دو سر دوپلکس *miRNA/miRNA انجام می شود. در واقع رشته ای که انتهای ´5 آن با پایداری کمتری به رشته دیگر جفت شده باشد به درون مجموعه RISC منتقل می شود. این انتها، به طور معمول حاوی بازهای یوراسیل می‌باشد[۱۷].

فعالیت اصلی مجموعه RISC، هدایت ریزRNA بالغ به سمت mRNA هدف و قطع تولید پروتئین از آن می‌باشد. پروتئین اصلی این مجموعه Argonaute نام دارد. Argonaute علاوه بر اتصال مستقیم به ریزRNA بالغ، نقشی بنیادین در مجموعه RISC ایفا می کند. در صورت بروز جهش در این پروتئین، ریزRNA بالغ قادر به هیچ گونه عملکردی نیست.

اتصال بین ریزRNA بالغ (microRNA) و mRNA هدف به دو شکل دیده می شود. چنانچه این اتصال به طور کامل صورت بگیرد، mRNA هدف توسط مجموعه RISC بریده می شود و اگر این دو به شکل کامل به یکدیگر متصل نشوند، بیان پروتئین هدف مهار می شود. در حالت دوم (که رایج تر است) بدون کاهش میزان mRNA در سلول، میزان پروتئین حاصله از آن کاهش می یابد [۱۰] (شکل ۴).

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]



شکل ۴- قطع تولیدپروتئین توسط RISC ؛ الف. برش mRNA هدف و ب. مهار بیان پروتئین

به تازگی در سیتوپلاسم سلول های انسانی ناحیه هایی به نام P-body (Processing body) شناسایی شده اند که در واقع کانون فعالیت RISC ، microRNA و mRNA می باشند [۱۸]. در نماتود C. elegans ، پروتئینی به نام AIN-1 در P-body شناسایی شده است که با اتصال به یکی از اعضای مجموعه RISC به نام ALG-1 ، موجب انتقال RISC به P-body می شود[۱۹].

پردازش ریزRNA ها در گیاهان و مقایسه آن با جانوران به طور کلی پردازش ریزRNA ها در گیاهان همانند جانوران می‌باشد، گرچه تفاوت هایی نیز به چشم می‌خورد. نخست آن که در گیاهان آنزیم Drosha وجود ندارد و به جای آن RNase III دیگری به نام DCL1 در هسته عمل پردازش را انجام می دهد. به علاوه DCL1 به جای Dicer نیز عمل می‌کند. پروتئین dsRBD در گیاهان، HYL1 نام دارد. در نتیجه پردازش pri-miRNA تا تشکیل *miRNA/miRNA ، در درون هسته انجام می شود. سپس این دوپلکس توسط پروتئین HST از هسته خارج می شود. نکته دیگر این که انتهای ´3 دوپلکس *miRNA/miRNA ، هیدروکسیله نیست و توسط متیل ترانسفرازی به نام HEN-7 متیله می‌شود [۲۰] (شکل ۳- ب).

در گیاهان توالی بیشتر ریزRNA ها به طور کامل مکمل mRNA هدف آنهاست [۲۱]. پس از این اتصال، RISC همانند یک اندونوکلئاز، mRNA را برش می‌دهد. محل اتصال ریزRNA می‌تواند در بخش کد کننده RNA مانند miR-166 و mRNA ژن PHABULOSA و یا در بخش غیر کدکننده مثل miR-156 و mRNA ژن SPLA4 باشد. تا کنون در جانوران نیز دست کم هشت ریزRNA شناسایی شده است که به طور کامل به mRNA ی هدف خود متصل می‌شوند[۹].

بر خلاف گیاهان، اتصال بین ریزRNA و mRNA هدف در جانوران در بیشتر موارد به ´3 UTR مولکول mRNA هدف محدود می شود. پژوهش های اخیر نشان می دهند که نوکلئوتید های دوم تا هشتم از انتهای ´5 مولکول ریزRNA (به نام seed region) به طور کامل به mRNA هدف متصل می شوند. رخداد جهش در این ناحیه موجب عدم شناسایی mRNA هدف توسط ریزRNA مربوطه می شود[۱۰]. اما در خارج از این ناحیه، اتصال به طور کامل صورت نمی گیرد و همین امر موجب می شود که RISC ، mRNA هدف را برش ندهد و تنها مانع از ترجمه آن به پروتئین گردد. در این حالت بدون کاهش میزان mRNA سلولی، میزان پروتئین آن کاهش یافته و حتی قطع می شود [۹].

لازم به تاکید است که با وجود مطالعات وسیع انجام شده، همچنان بسیاری از موارد جزئی یا حتی کلی مسیر پردازش، تعیین هدف و نیز مهار تولید پروتئین توسط ریزRNA ها ناشناخته باقی مانده است. اما با عنایت به آن که ارابه پژوهش ها، با سرعتی شگرف در حال پیشروی است، بدون تردید در آینده ای نه چندان دور، حقایق شگفت آور دیگری نیز بر یافته های اخیر افزوده خواهند شد.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

نامگذاری

با شناسایی شمار زیادی از ریزRNA ها، پژوهشگران تصمیم گرفتند که از سامانه نامگذاری واحدی برای مشخص نمودن هر یک از آنها استفاده کنند. بر این اساس به هر یک از این مولکول ها یک شماره حداکثر سه رقمی تعلق می گیرد. چنانچه از یک ریزRNA خاص، دو نسخه یکسان در دو لوکوس مختلف ژنوم یک موجود قرار گرفته باشد، در نامگذاری آنها از پسوند عددی، به عنوان مثال miR-6-1 و miR-6-2 در مگس سرکه، استفاده می گردد. نیز اگر اختلاف توالی دو ریزRNA در حد یک یا دو نوکلئوتید باشد، از پسوند الفبایی، به عنوان نمونه miR-181a و miR-181b در موش، استفاده می شود [۲۲]. پایگاه اطلاع رسانی ویژه ای برای کسب اطلاعات در مورد هر یک از ریزRNA ها اختصاص داده شده است، که آدرس اینترنتی آن: http://www.sanger.ac.uk/Software/Rfam/mirna می باشد.

تنوع کارکرد

ریزRNA ها در انجام بسیاری از فعالیت های سلول های متفاوت جانوری و گیاهی سهیم هستند. شواهد اولیه این امر از بررسی جهش در اجزای مسیر پردازش و تعیین هدف آنها بدست آمده است. جهش در ژن های Drosha ، Dicer و Argonaute منجر به طیف وسیعی از اختلالات نمو جنینی مشتمل بر موارد زیر می شود: اختلالات گاسترولاسیون، شکل گیری مغز و قلب در Zebrafish، اختلالات مریستمی گیاه Arabidopsis ، تاخیر و بی نظمی در تقسیم سلول های بنیادی مگس سرکه، اختلال در دستگاه تو لید مثل، عقیمی، بی نظمی در نمو و حتی مرگ لارو کرم C. elegans و تمایز ناقص سلول های جنینی و مرگ زودرس جنینی در موش[۲۱و۲۶-۲۳]. موارد فوق الذکر همگی نشان دهنده نقش غیر قابل انکار این مولکول های کوچک در مراحل مختلف نمو جنینی گیاهان و جانوران می باشد.

پی بردن به نقش ریزRNA های شناسایی شده، از طریق mRNA هدف آنها میسر می باشد. از آنجایی که در گیاهان اتصال بین ریزRNA و mRNA هدف به طور کامل صورت می پذیرد، تعیین نقش ریزRNA آسان تر است. عوامل رونویسی در حدود نیمی از هدف های ریزRNA های گیاهان را تشکیل می دهند. به طور کلی در شمار زیادی از اعضای یک خانواده، عامل های رونویسی همزمان توسط یک ریزRNA منفرد مهار می شوند. همه این عوامل در تعیین الگو های رشد و نمو جنینی، تکثیر سلولی و واکنش های محیطی و هورمونی سلول نقش دارند [۲۷]. به عنوان مثال می توان به نقش miR-159 در نمو برگ گیاه Arabidopsis با اثر بر عامل رونویسی MYB33 [۲۸] و نیز اثر miR-172 بر عامل رونویسی AP2 و نقش آن در رشد و نمو گل و تنظیم زمان گل دهی اشاره کرد[۲۹].

مطالعات انجام شده در جانوران نشان داده است که ریزRNA های مختلف می توانند به یک mRNA ویژه متصل شوند و میزان بیان پروتئین آن را در درجات مختلف کاهش دهند، در نتیجه احتمال اثر تجمعی ریزRNA های مختلف در مهار بیان یک پروتئین ویژه وجود دارد [۱۰].

تعیین نقش ریزRNA های جانوری بر این اساس انجام می شود که شدت میزان بیان یک ریزRNA ویژه در یک رده سلولی خاص، نشان دهنده عملکرد آن ریزRNA در آن رده سلولی است. به عنوان نمونه بیان تشدید یافته[1] miR-181 در سلول های لنفوئیدی B (و نه سلول های T) مغز استخوان موش، منجر به کشف این واقعیت شد که miR-181 در تمایز سلول های خونی در مسیر تولید سلول های B نقشی اساسی دارد . حتی با بیان ترانس ژنی miR-181 ، در شرایط In vitro و In vivo ، میزان سلول های B حاصله تا میزان بالایی

1- amplification

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

افزایش یافت و میزان سلول های T تا حدود ۸۸٪ کاهش پیدا کردند[۳۰].

مطالعات Poy و همکاران در سال ۲۰۰۴ به کشف miR-375 در سلول های جزایر لانگرهانس پانکراس منجر گردید. آنها نشان دادند که افزایش بیان این مولکول با اثر بر تولید پروتئین متیوتروفین (Mtpn) ، تولید انسولین را مهار می کند و به عکس مهار عملکرد miR-375 ، موجب افزایش ترشح انسولین می شود. شایان ذکر است که فعالیت miR-375 با میزان متابولیسم گلوکز خون در ارتباط نیست. این امر خود می تواند زمینه ای را برای درمان های دارویی جدید دیابت فراهم کند [۳۱].

در مطالعه دیگری Zhao و همکاران در سال ۲۰۰۵ نشان دادند که miR-1-1 و miR-1-2 به شکل اختصاصی در سلول های پیش ساز عضلات قلبی و اسکلتی موش بیان می شوند. بیان این دو ریزRNA توسط عامل های تنظیم کننده تمایز سلول های عضلات به نام MyoD و Mef2 تحریک می شود. میزان بیان Hand2 ، یک عامل رونویسی دخیل در افزایش عروق سلول های ماهیچه ای، توسط miR-1-1 و miR-1-2 کاهش می یابد. در نتیجه ژن های miR-1 در کنترل تعادل تمایز و تکثیر سلول های عضلات قلب و در شکل گیری آن نقش دارند [۳۲].

در مطالعه Schratt و همکاران در سال ۲۰۰۶ ، به وجود miR-134 در هیپوکامپ مغز موش اشاره شده است. این ریزRNA در دندریت های این سلول ها تجمع پیدا می کند. ممانعت از فعالیت miR-134 ، رشد ناقص دندریت ها را به همراه دارد. miR-134 مانع از بیان پروتئین Limk1 می شود. این پروتئین عملکرد رشته های اکتین موجود در دندریت ها را تنظیم می کند. بیان بیش از حد miR-134 و ممانعت کامل از بیان Limk1 ، موجب ایجاد شکل غیر طبیعی دندریت ها و کاهش طول آنها می شود. نکته جالب آنکه خاموشی Limk1 mRNA توسط miR-134 تنها در مسیر انتقال این پروتئین به پایانه های دندریت ها صورت می پذیرد. از آنجا که اندازه دندریت های سلول های عصبی با میزان تحریک پذیری آنها ارتباط مستقیم دارد، می توان نتیجه گرفت که این ریزRNA در انتقال پیام های عصبی نورون های مغزی نقش موثری ایفا می کند [۳۳].

یکی از ریزRNA های مگس سرکه به نام bantam اثر مثبتی بر رشد سلول و اثر بازدارنده ای بر آپوپتوز سلول‌ها دارد. افزایش بیان bantam موجب رشد بال ها و چشم در مگس سرکه می شود و کاهش آن موجب جثه کوچک با تعداد سلول کمتر می گردد. پژوهش های بعدی نشان دادند این مولکول بیان یک پروتئین محرک آپوپتوز به نام Hid را کاهش می‌دهد[۳۴].

در ماهی Zebrafish ، miR-430 تنها چهار ساعت پس از لقاح بیان می شود و نقش بسزایی در شکل گیری مغز جانور دارد[۳۵]. در جدول ۱ تعدادی از ریزRNA های جانوری که نقش آنها ثابت شده، معرفی شده اند.

تا کنون در حدود ۲۰۰ مولکول ریزRNA در انسان شناسایی شده است. هر چند که به جز تعدادی بسیار اندک، تا به امروز نقش آنها ناشناخته باقی مانده است. به عنوان مثال، ۳۶ مورد ریزRNA در سلول های بنیادی جنینی شناسایی شده که هنوز عملکرد آنها بر ما معلوم نیست [۳۶].

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

جدول ۱- تعدادی از ریز RNAهای جانوری و نقش آنها

نقش	mRNA ی هدف	ریزRNA	
تمایز سلول های بنیادی	lin-14, lin-28	lin-4	C. elegans
تمایز سلول های بنیادی	lin-41, hbl-1, daf-12, pha-4	let-7	C. elegans
تمایز سلولهای بنیادی	hbl-1	miR-48, miR-84, miR-241	C. elegans
تقسیم و تمایز سلولی و اندام زایی	let-60	miR-84	C. elegans
عدم تقارن نورون های حسی چپ و راست بدن	cog-1	lsy-6	C. elegans
عدم تقارن نورون های حسی چپ و راست بدن	die-1	miR-273	C. elegans
تنظیم رشد سلولی و آپوپتوز	hid	bantam	D. melanogaster
شکل گیری الگوهای جنینی	E(spl)/bHLH, bearded family	miR-2a, -2b, -6, -7	D. melanogaster
شکل گیری قلب	Hand2	miR-1	M. musculus
تنظیم ترشح انسولین	Myotrophin (Mtpn)	miR-375	M. musculus

ریزRNA ها و نقش آنها در بروز بیماری و به ویژه سرطان با توجه به نقش های متفاوتی که ریزRNA ها در تنظیم رشد و تقسیمات سلولی ایفا می کنند، می توان این فرضیه را مطرح کرد که این مولکول ها می توانند نقش مهمی در بروز سرطان در انسان داشته باشند. الگوی بیان طبیعی بسیاری از ریزRNA ها در مراحل ابتدایی تشکیل تومورهای مختلف تغییر می یابد. به علاوه، ژن های بسیاری از ریزRNA های انسانی در قسمت هایی از ژنوم یافت شده اند که با بروز سرطان های مختلف در ارتباطند [۳۷].

به عنوان مثال می توان به مجموعه ژن های miR-17 در موقعیت 13q31 اشاره کرد. هفت ریزRNA شامل آن به صورت گروهی و پشت سرهم قرار دارند و به طور همزمان بیان می شوند. دقیقا همین ناحیه در لنفوم سلول B بزرگ، لنفوم فولیکولار، لنفوم سلول Mantle و بسیاری از سرطان های دیگر دچار فزون سازی می شود. تمام این سرطان ها از سلول های B منشا می گیرند. پژوهش ها نشان داده اند که بیان این هفت ریزRNA در سلول های سرطانی ذکر شده تا حد قابل توجهی افزایش می یابند. افزایش بیان مجموعه miR-17 در سلول های بنیادی جنینی موش نیز گزارش شده است. بنابراین می توان این فرضیه را مطرح کرد که بیان افزایشی این مجموعه با سوق دادن سلول به سمت رفتارهای مشابه سلول های بنیادی، دلیل بروز این اختلالات است [۳۸].

مطالعات بعدی نشان دادند که miR-17-5p و miR-20a از این مجموعه، با اثر بازدارندگی مستقیم، بیان عامل رونویسی E2F1 را تنظیم می کنند. E2F1 در عبور سلول از مرحله G_1 به مرحله S چرخه سلولی نقش بسزایی دارد. همچنین بیان مجموعه miR-17 نیز در کنترل مستقیم عامل رونویسی C-Myc قرار دارد و افزایش بیان C-Myc موجب افزایش بیان مجموعه miR-17 می شود. با این حال سازوکار دقیق بروز سرطان در نتیجه افزایش بیان C-Myc و مجموعه miR-17 هنوز ناشناخته است [۳۹].

در ۵۰٪ موارد لوسمی لنفوسیتیک مزمن (CLL)[1] که شایع ترین لوسمی در بزرگسالان است، یک حذف کروموزومی در ناحیه 13q14 ژنوم شناسایی شده است. به علاوه در سرطان میلومای چند گانه و سرطان پروستات نیز حذف های مختلفی در این ناحیه مشاهده شده اند. با وجود تمام مطالعات وسیع انجام شده، هیچ یک از ژن های موجود در این ناحیه، دلیل بروز سرطان های ذکر شده نمی باشند. درست در همین ناحیه ژن‌های بیان کننده miR-15 و miR-16 قرار دارند. بررسی ها

1- Chronic Lymphocytic Leukemia

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

نشان می‌دهند در ۶۸٪ موارد CLL و درصد بالایی از سایر سرطان های ذکر شده، ژن‌های این دو ریزRNA حذف شده‌اند یا میزان بیان آنها کاهش یافته است. جالب تر آن که در بسیاری از موارد CLL ، تجمع pre-miR-15 دیده می‌شود [۴۰].

کارسینوم پاپیلاری تیروئید شایع ترین سرطان غدد درون ریز است. با این که پژوهش های زیادی در زمینه پیدایش تومور در این سرطان به انجام رسیده اند، ژن های کشف شده عامل درصد کمی از موارد این سرطان می باشند. به تازگی مطالعه ای در زمینه نقش ریزRNA ها در این سرطان انجام شده و مشخص شده است که miR-221 ، miR-222 و miR-146 در تومورهای تیروئید نسبت به بافت تیروئیدی سالم، بیان تشدید یافته ای دارند. به علاوه miR-221 در بافت های سالم تیروئید افراد مبتلا به کارسینوم پاپیلاری تیروئید مشاهده شده است. از این مطلب می توان استنباط کرد که بیان افزایش یافته miR-221 از رخدادهای اولیه ایجاد این تومور است. این سه ریزRNA بیان پروتئین KIT را مهار می کنند. KIT یک گیرنده تیروزین کینازی است که در تمایز و رشد سلول های مختلف نقش دارد و در سرطان های مختلف نیز به عنوان یک انکوژن مطرح می باشد [۴۱].

ریزRNA ها می توانند نقش انکوژنی داشته باشند. به عنوان نمونه وجود miR-372 و miR-373 در بروز تومورهای سلول های زاینده بیضه ثابت شده است. مطالعات نشان داده اند که بیان این دو ریزRNA و فعالیت بیش از حد CDK ها[1] ارتباط مستقیمی وجود دارد. این دو ریزRNA بیان پروتئین LATS2 را مهار می کنند. این پروتئین دارای فعالیت سرین- ترئونین کینازی است و در گروه عامل های سرکوبگر تومور قرار می گیرد. LATS2 مانع از عملکرد مجموعه Cyclin E / CDK2 می شود و در نبود آن تکثیر بی رویه سلول و در نتیجه تومورزایی صورت می پذیرد. ریزRNA های miR-372 و miR-373 با جلوگیری از تولید پروتئین LATS2 ، نقش بازدارنده آن را خنثی می کنند و در نتیجه سلول به سمت تومورزایی پیشروی می کند. نکته جالب آن که حتی در حضور پروتئین p53 طبیعی نیز، به دلیل عدم اعمال نقش آن بر مجموعه Cyclin E / CDK2 ، سلول رفتار غیرطبیعی پیدا می کند. در این شرایط p53 وجود دارد اما تنظیم مولکول های پایین دست از کنترل آن خارج می شود[۴۲].

شاهد دیگری از ارتباط بین ریزRNA ها و بیماری، وجود پروتئین DGCR8 به عنوان کوفاکتور آنزیم Drosha در سلول های انسانی می باشد. ژن DGCR8 در موقعیت 22q11.2 قرار دارد و در حدود ۹۰٪ موارد سندرم دی جورج نیز همین ناحیه خذف می شود. افراد مبتلا به سندرم دی جورج دارای اختلالات مادرزادی گوناگونی مانند اختلالات قلبی، چهره ای، دستگاه ایمنی و بی نظمی مراحل نموی می باشند. بر اساس نقش غیر قابل انکار ریزRNA های متعدد در مراحل رشد و نمو جنین، این فرضیه محتمل است که به هنگام فقدان پروتئین DGCR8 و به دلیل بر هم خوردن مسیر پردازش ریزRNA های مختلف سلول، طیف وسیع اختلالات بالینی در مبتلایان به سندرم دی جورج دیده می شود[۴۳].

مقایسه microRNA و siRNA

مطالعات انجام شده در مورد ریزRNA ها، به موازات مطالعاتی در زمینه تداخل RNA[2] ،پیشرفت کرده است. RNAi به مسیری گفته می شود که در آن مولکول های siRNA[3] در خاموشی بیان یک ژن نقش دارند.

ریزRNA و siRNA دو رده از مولکول های RNA کوچک هستند که از نظر ساختار شیمیایی شباهت هایی با یکدیگر دارند. هر دوی این RNAها در حدود ۲۲ نوکلئوتید طول دارند و دارای پایانه های ′5 فسفاته و انتهای ′3 هیدروکسیله

1- Cyclin-dependent Kinase

2-RNAi: RNA interference
3- Small interfering RNA

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

می باشند و بر اساس میزان جفت شدن نوکلئوتید های آنها با mRNA هدف، می توانند از طریق برش mRNA یا مهار ماشین ترجمه، مانع تولید پروتئین شوند.

با وجود شباهت های ذکر شده بین دو مولکول ریزRNA و siRNA ، این مولکول ها از نظر مسیر پردازش و اساس تنظیم پروتئین های هدف خود از یکدیگر متفاوت هستند. ریزRNA ها از مولکول های pri-miRNA که دارای ساختار ساقه و حلقه می باشند، منشا می گیرند و بخشی از مسیر پردازش آنها در سلول انجام می گیرد. همچنین بر اساس نوکلئوتید های دوم تا هشتم انتهای ′5 خود، mRNA های هدف را تشخیص می دهند و هر ریزRNA می تواند به تنهایی بر روی ده ها و یا حتی صدها mRNA هدف اثر بگذارد. برعکس siRNA ها از RNA های دو رشته ای حاوی صد ها یا هزاران نوکلئوتید، فاقد ساختار ساقه و حلقه منشا می گیرند و به طور معمول به حالت اگزوژن (خارج از ژنوم میزبان و به طور مصنوعی) بیان می شوند. توالی mRNA هدف siRNA ها تا حد زیادی مشابه توالی منشا آنهاست و حتی در برخی موارد توالی منشا و هدف یکسان است [۴۴].

چشم انداز

بیش از یک دهه از کشف ریزRNA ها می گذرد. امروزه این مولکول های کوچک نوع متمایزی از کنترل بیان ژن را چه در دوران جنینی و چه پس از آن به خود اختصاص داده اند. در حال حاضر یافتن کارکردهای مختلف هر یک از ریزRNA ها چالش اصلی مطالعات را تشکیل می دهند. کشفیات در پیش رو می تواند متوجه این نکته باشد که بسیاری از این مولکول ها به صورت شبکه ای عمل می کنند و با یکدیگر در موارد خاصی همکاری دارند. با این همه هنوز در ابتدای راه شناخت سازوکار و عملکرد آنها قرار داریم، امید می رود با تلاش پژوهشگران و تداوم مطالعات در این زمینه، افق های جدیدتری در زمینه کشف، پیشگیری و حتی درمان بیماری ها به ویژه سرطان گشوده شود.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

References

1. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75: 843-854.
2. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in C. elegans. *Cell* 1993; 75: 855-862.
3. Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, et al. The 21 nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in Caenorhabditis elegans. *Nature* 2003; 403: 901–906.
4. Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 2000; 408: 86-89.
5. Lee RC, Ambros V. An extensive class of small RNAs in Caenorhabditis elegans. *Science* 2000; 294: 862-864.
6. Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in Caenorhabditis elegans. *Science* 2001; 294: 858-862.
7. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 2001; 294: 853-858.
8. Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, et al. Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 2005; 37: 766-770.
9. Du T, Zamore PD. MicroPrimer: an introduction to microRNA. *Development* 2005; 132: 4645-4652.
10. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; 116: 281-297.
11. Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res* 2004; 14: 1902-1910.
12. Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. *Mol Cell* 2004; 16: 861-865.
13. Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, et al. The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 2003; 425: 415-419.
14. Zeng Y, Yi R, Cullen BR. Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *EMBO J* 2004; 24: 138-148.
15. Denli AM, Tops BB, Plasterk RH, Ketting RF, et al. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 2004; 432: 231-235.
16. Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev* 2003; 17: 3011-3016.
17. Khvorova A, Reynolds A, Jayasena SD. Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 2003; 115: 209-216.
18. Liu J, Valencia-Sanchez MA, Hannon GJ, Parker R. MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P bodies. *Nat Cell Biol* 2005; 7: 719-723.
19. Ding L, Spencer A, Morita K, Han M. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the Argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P Bodies in C. elegans. *Mol Cell* 2005; 19: 437-447.
20. Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, et al. Methylation as a crucial step in plant microRNA biogenesis. *Science* 2005; 307: 932-935.
21. Baulcombe D. RNA silencing in plants. *Nature* 2004; 431: 356-363.
22. Griffiths-Jones S. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: D109-D111.
23. Giraldez AJ, Cinalli RM, Glasner ME, Enright AJ, et al. MicroRNAs regulate brain morphogenesis in zebrafish. *Science* 2005; 308: 833-838.
24. Hatfield SD, Shcherbata HR, Fischer KA, Nakahara K, et al. Stem cell division is regulated by the microRNA pathway. *Nature* 2005; 435: 974-978.
25. Grishok A, Pasquinelli AE, Conte D, Li N, et al. Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control C. elegans developmental timing. *Cell* 2001; 106: 23-34.
26. Bernstein E, Kim SY, Carmell MA, Murchison EP, et al .Dicer is essential for mouse developpment. *Nat Genet* 2003; 35: 215-217.
27. Kidner CA, Martienssen RA. The developmental role of microRNA in plants. *Curr Opin Plant Biol* 2005; 8: 38-44.
28. Palatnik JF, Allen E, Wu X, Schommer C, et al. Control of leaf morphogenesis by micro-RNAs. *Nature* 2003; 425: 257–263.
29. Aukerman MJ, Sakai H. Regulation of flowering time and floral organ identity by a MicroRNA

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

and its APETALA2-like target genes. *Plant Cell* 2003; 15: 2730–2741.
30. Chen CZ, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differenttiation. *Science* 2004; 303: 83-86.
31. Poy MN, Eliasson L, Krutzfeldt J, Kuwajima S, et al. A pancreatic islet-specific microRNA regulates insulin secretion. *Nature* 2004; 432: 226-230.
32. Zhao Y, Samal E, Srivastava D. Serum response factor regulates a muscle-specific microRNA that targets Hand2 during cardiogenesis. *Nature* 2005; 436: 214-220.
33. Schratt GM, Tuebing F, Nigh EA, Kane CG, Sabatini ME, Kiebler M, Greenberg ME. A brain-specific microRNA regulates dendritic spine development. *Nature* 2006; 439: 283-289.
34. Brennecke J, Hipfner DR, Stark A, Russell RB, et al. Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in Drosophila. *Cell* 2003; 113: 25-36.
35. Chen PY Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev* 2005; 19: 1288-1293.
36. Suh MR, Lee Y, Kim JY, Kim SK, et al. Human embryonic stem cells express a unique set of microRNAs. *Dev Biol* 2004; 270: 488-498.
37. Alvarez-Garcia I, Miska EA. MicroRNA function: animal development and human disease. *Development* 2005; 132: 4653-4662.
38. He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, et al. MicroRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 2005; 435: 828-833.
39. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, et al. C-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 2005; 435: 839-843.
40. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 15524-15529.
41. He H, Jazdzewski K, Li W, Liyanarachchi S, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 52: 19075–19080.
42. Voorhoeve PM, Sage C, Schrier M, Gillis JM, et al. A Genetic Screen Implicates miRNA-372 and miRNA-373 As Oncogenes in Testicular Germ Cell Tumors. *Cell* 2006; 124: 1169–1181.
43. Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA Biogenesis and Cancer. *Cancer Res* 2005; 65: 3509-3512.
44. Tomari Y, Zamore PD. Perspective: machines for RNAi. *Genes Dev* 2005; 19: 517-529.

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]

Tehran University Medical Journal; Vol. 64, No. 6, Sep 2006:5-18

microRNA: small but full of mystry and use

M.R. Noori Daloii [1*]
E. Alvandi[1]

1- Department of Medical Genetics, School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

* School of Medicine, Tehran University of Medical Sciences, Tel: +98 (21) 88953005,
E-mail: nooridaloii@tums.ac.ir

Abstract

MicroRNAs form a class of small non-coding RNA molecules. With only 21-23 nucleutide in length, they have an important role in gene expression. These molecules bind to their target mRNA molecules and repress the protein expression via mRNA degradation or blocking the translation machine of the cell. From the advent of molecular biology microRNA molecules were out of focus, however huge amount of studies in the past few years revealed a lot of facts about their nature. Nowadays around 1600 different microRNA are discovered in human, animals, plant and even viruses. In this review article the most recent data in the history, genes, expression and process of these molecules are introduced. Furthermore, the findings about diverse roles of these molecules in normal and abnormal conditions, cancer in particular, are shown. Finally, the differences to siRNA molecules and the prospect of microRNA have been explained .

***Keywords*:** micro RNA, gene expression, stem cell deferentiation, cancer

[Downloaded from journals.tums.ac.ir on 2024-07-30]