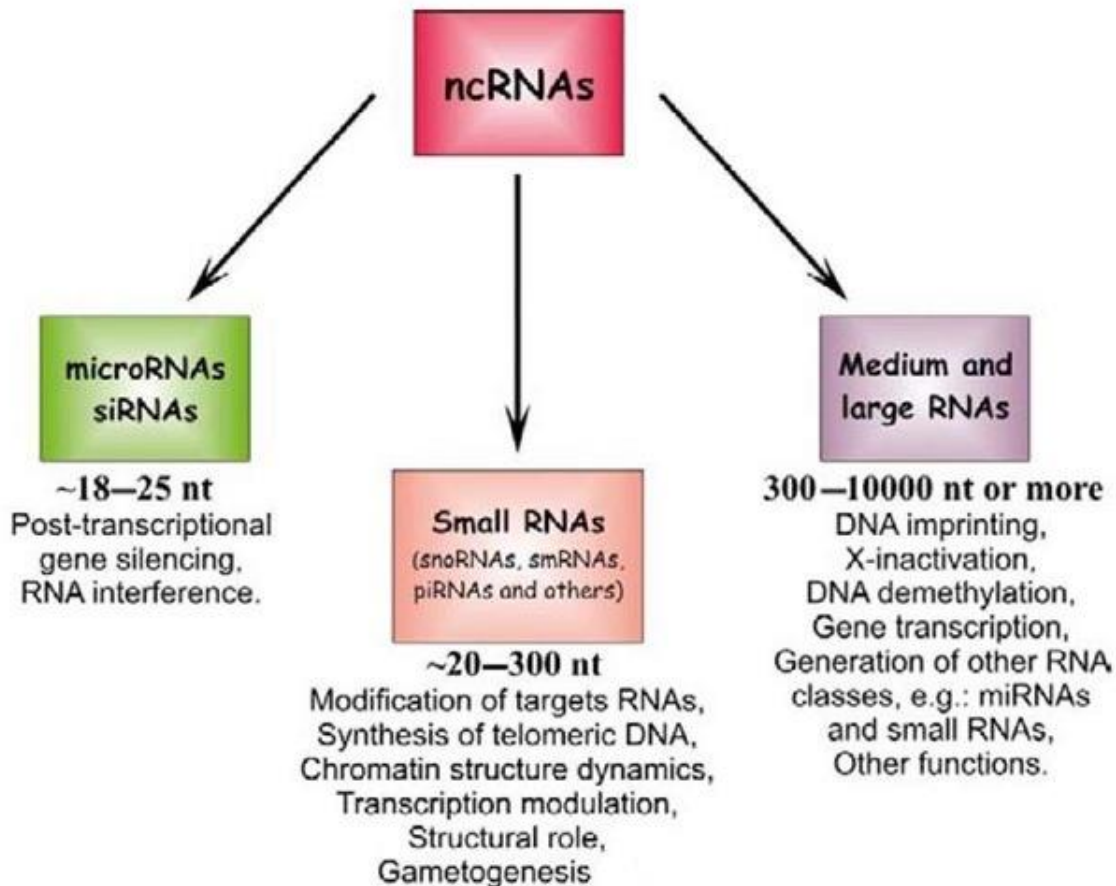


آشنایی با تاریخچه نحوه شناسایی آرناهای غیر کد کننده (non coding RNA یا ncRNA ها)



دیدگاه جدید در مورد ترانسکریپتوم پستانداران یک الگوی پیچیده ای از رونوشت‌های کدکننده^۱ و غیرکدکننده^۲ پروتئین که به صورت هم‌پوشان و غیر هم‌پوشان در ژنوم قرار دارند را نشان می‌دهد. جدیداً مشخص شده است که نواحی غیر کد کننده یا RNAهای غیر کد کننده^۳ پروتئین نقش اساسی در مکانیسم‌های مختلف تنظیم بیان ژن‌ها بازی می‌کند. استفاده از روش‌هایی که بر مبنای توالی‌یابی نسل دوم DNA استوارند (مثل RNA-seq) و نیز آنالیز ترانسکریپتوم

^۱Coding

^۲ Non-coding

^۳Non-coding RNAs (ncRNAs)

سراسری^۱ و نیز روش‌های tiling array نشان داده اند که ژنوم یوکاریوت‌ها، بالغ بر ۹۰٪ به ترانسکریپتوم رونویسی می‌شوند که این بیان کننده وجود مقدار عظیمی RNA غیر کد کننده (ncRNA) در سلول می‌باشد. همچنین این روش‌ها و تکنولوژی‌های نوین نشان داده‌اند که ژنوم یوکاریوت‌ها به واسطه تغییرات بزرگ ساختاری مثل حذف‌های بزرگ و درج شدگی‌های بزرگ^۲ بسیار پویا می‌باشد [۸].

بیش از یک دهه گذشته بر اساس اطلاعات حاصل از توالی‌یابی ESTها و دیگر تکنولوژی‌های آن زمان تصور بر این بود که ژنوم انسان شامل حدود ۲۰۰۰۰ تا ۳۰۰۰۰ ژن می‌باشد اما در حال حاضر با گشوده شدن پنجره جدیدی از ترانسکریپتوم به نام ncRNA این تخمین از ژن‌های انسانی به طرز قابل توجهی تغییر خواهد یافت. ارگانیسم‌هایی مثل کرم الگانس^۳ از لحاظ تعداد ژن‌های کد کننده پروتئین تقریباً همانند انسان می‌باشد و فقط اختلاف اندکی دارد که این اختلاف اندک نمی‌تواند توجیه کننده پیچیدگی عظیم بدن انسان در مقابل کرم الگانس باشد بنابراین می‌توان گفت که وجود گروه ncRNAها می‌تواند باعث بروز پیچیدگی‌های بیشتر در ژنوم انسان شده است [۹].

در گذشته محققان بر این باور بودند که قسمت کوچکی از ژنوم یوکاریوت‌ها به پروتئین کد می‌شود (حدود ۲٪) و قسمت کوچک دیگری هم به RNAهای ریبوزومی^۴ و RNAهای انتقالی^۵ تبدیل می‌شود و بقیه قسمت‌های ژنوم زاید می‌باشد. اما جدیداً ncRNAها طویل یا بزرگ^۶ که در تغییرات کروماتین دخالت دارند و RNAهای کوچکی که در نواحی پرموتور^۷ نسخه برداری می‌شوند و نیز RNAهایی که از نواحی تکراری نسخه -

^۱ Whole-Transcriptome Analysis

^۲ Large deletions and large insertions

^۳ *Caenorhabditis elegans*

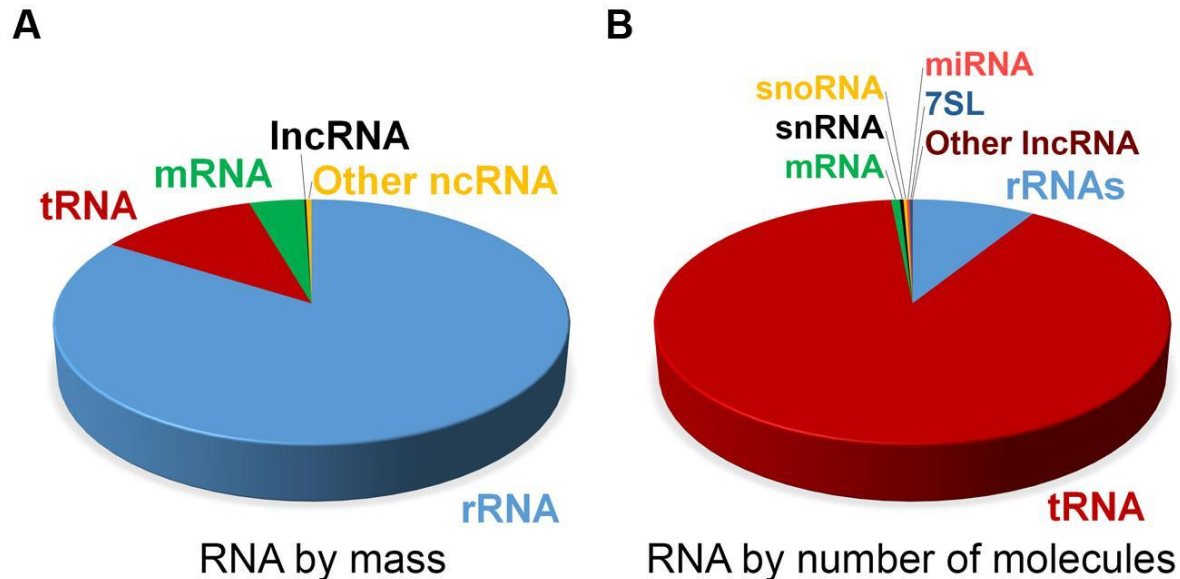
^۴ rRNA

^۵ tRNA

^۶ Long or Large ncRNA

^۷ Promoter

بررداری می‌شوند و همچنین ncRNA های میتوکندریایی نیز گزارش شده اند [۱۰].



اهمیت ncRNA ها وقتی بیشتر شد که کشفی در ارتباط با دخالت ncRNA ها در انتقال اطلاعات اپیژنتیکی از نسلی به نسل بعد در گیاهان و موش گزارش شد [۱۱، ۱۲]. اگرچه پدیده اپیژنتیک نسل‌های مختلفاً^۱ مبحث نوینی نیست و در گذشته مکانیسم‌هایی از قبیل تغییرات DNA و مارکرهای هیستونی در این باره گزارش شده بودند اما این کشفیات جدید دخالت ncRNA ها را در فصل جدیدی از قوانین وراثت نشان می‌دهد. و نیز با برخی از جنبه‌های نظریه لامارک سازگار است و از آن به عنوان لامارکیسم نرم^۲ یاد می‌شود. اثرات اپی ژنتیکی نسل‌های متفاوت پدیده‌ی پیچیده‌ای می‌باشد که ممکن است به واسطه RNA ها کنترل شود. یک مقاله کلیدی توسط Hejimens و همکاران در سال ۲۰۰۸ منتشر شد که اثبات کننده این مسئله می‌باشد که شرایط محیطی روزهای اولیه زندگی (رحم مادر) می‌تواند سبب تغییرات اپیژنتیکی پایه-ای در انسان بشود و این عوامل ایجاد تغییرات اپیژنتیکی می‌توانند ncRNA ها باشند فلذا این مقاله اهمیت فرضیه

^۱Trans generetional

^۲Soft-Lamarckism

دخالته RNA را در اپیژنتیک نسلها متفاوت اثبات می‌کند [۱۲].

نقش Deep Sequencing (مثل RNA-seq) در شناسایی آرناهای غیر کد کننده (non coding RNA یا ncRNAها) و میکروارناها

اطلاعات حاصل از Deep Sequencing جدیداً نشان داده است که ncRNAهای طویل و کوتاه از نظر تعداد بسیار بیشتر از RNAهای کد کننده پروتئین می‌باشند فلذا اثبات کننده‌ی این مسئله می‌باشد که ژنوم انسان برخلاف دیدگاه سابق از لحاظ نسخه برداری بسیار فعالتر می‌باشد [۱۳].

تکنولوژی‌های نوین توالی‌یابی DNA باعث فراهم شدن امکان دسترسی دقیقتر ترانسکریپت‌های یوکاریوت‌ها شده است [۱۴]. مطالعات متفاوت که مستقل از همدیگر از رویکردهای متفاوتی جهت بررسی ترانسکریپتوم استفاده کرده بودند به این نتیجه رسیده‌اند که مقدار ماده‌ی ژنتیکی رونویسی شونده موجود در سلول‌های یوکاریوتی بسیار بیشتر از آن چیزی است که در گذشته تصور می‌کرده‌اند [۱۵ تا ۱۸]. این یافته‌های جدید در مقابل دیدگاه‌های گذشته قرار می‌گیرد آنجا که می‌گفتند که نواحی غیر کد کننده ژنوم انسان نواحی زاید ساختاری هستند و یا به عنوان نواحی تنظیمی بیان ژنوم (یعنی افزایشنده‌ها^۱ و خاموش کننده‌ها^۲) می‌باشند. این مسئله که نواحی تنظیمی ژنوم مثل نواحی افزایشنده می‌توانند رونویسی بشوند بسیار فریبنده است [۱۹]. هنوز بر عملکرد تمام این ncRNAها اتفاق نظر وجود ندارد مخصوصاً به این خاطر که بیشتر آنها به مقدار خیلی کم بیان می‌شوند [۲۰]. اما باید توجه نمود که بیان کم این RNAها دلیل بر عدم وجود عملکرد برای آنها نیست چرا که عملکرد یک سری از آنها در فرایندهای اپیژنتیکی گزارش شده است [۲۱].

^۱Enhancers

^۲Silencers

مطالعات جدید طی بررسی ترانسکریپتوم مخمر مشخص نموده است که قسمت اعظم ژنوم مخمر که توالی‌های غیر کد کننده نامیده شده بودند به RNA رونویسی می‌شوند. ژنوم مخمر تحت شرایط مختلف مورد بررسی قرار گرفت و مشخص شد که ژنوم مخمر یک انعطاف (remodeling) خاصی طی شرایط مختلف نشان می‌دهد و بیش از ۹۰٪ ژنوم آن رونویسی می‌شود [۲۲، ۱۷]. دو گروه تحقیقاتی که به طور مجزا کار می‌کردند با استفاده از رویکرد tiling array اقدام به بررسی سطح بیانی و ساختار رونوشت‌های مخمر نموده‌اند. چندین رونوشت جدید گزارش شد که بسته به کاری که در سلول انجام می‌دهند نامگذاری شدند. برای مثال SUTها^۱ که عمر زیادی در سلول دارند همراه با CUTها^۲ که خیلی سریع به واسطه مکانیسم RNA^۳ مراقب^۲ تخریب می‌شوند، شناسایی شدند. یکی از مشخصه‌های بارز این نوع از RNAها (SUTs، CUTs) این است که در ژنوم با همدیگر همپوشان می‌باشند و این ویژگی آن‌ها، این سوال را در ذهن ایجاد می‌کند که چگونه بیان این RNAها تنظیم می‌شود. کشف دیگری که از این مطالعات حاصل شد این بود که این RNAها اغلب در ارتباط با قسمت‌های کد کننده ژنوم می‌باشند و پروموتورهای دو جهتی^۴ دارند [۲۳، ۲۴].

نقش پروژه ENCODE در شناسایی آرناهای غیر کد کننده (non coding RNA یا ncRNAها) و میکروارناها

در ارتباط با سلول‌های انسانی، پروژه ENCODE^۵ قادر بود که رونوشت‌های مختلف سلول‌های انسانی را با رویکرد Deep sequencing آنالیز کند. با این رویکرد RNAهای کوچک (کمتر از ۲۰۰ نوکلئوتید) با برچسب‌های CAGE^۶ که در سر 5 پریم RNAهای بزرگ شناخته شده قرار دارند هم‌ردیف^۷

^۱Stable unannotated transcript

^۲Criptic unstable transcript

^۳RNA Surveillance

^۴Bidirectional

^۵Encyclopedia of DNA Elements

^۶Cap analysis of gene expression

^۷Align

شدند. RNA های کوچک مربوط به پروموتور (PASR)^۱ و RNA های بزرگ مربوط به پروموتور (PALR) نیز شناسایی شدند. PASR ها حدود ۲۰٪ از کل RNA های شناخته شده را شامل می‌شوند و در نواحی ژنی و بین ژنی قرار دارند [۲۵]. تحقیقات دیگری با استفاده از رویکردهای مشابه ثابت نمودند که ترانسکرپت-هایی از نواحی تکراری ژنوم منشا می‌گیرند (پروژه CAGE مربوط به FANTOM^۲). حدود نصف ژنوم انسان توالی‌های تکراری هستند و شامل عناصر رتروترانسپوزونی مثل LINE و SINE^۳ می‌باشند. تحقیقی که Fanlker و همکاران انجام دادند مشخص نمود که در انسان ۳۰٪ از ترانسکرپت‌ها از نواحی تکراری منشا می‌گیرند و بیشتر آن‌ها ncRNA هستند؛ در نتیجه این تحقیق مشخص می‌کند که عناصر رتروترانسپوزونی نقش اساسی در بازدهی ژنوم انسانی دارند [۲۶]. گروه‌های تحقیقاتی دیگری نیز نشان دادند که توالی‌های Alu و SINE در سلول‌های مختلف انسان قادرند بیان شوند. این مطالعات جز اولین مطالعاتی بودند که اثبات کردند عناصر تکراری در ژنوم انسان بیان می‌شوند [۲۶، ۲۷].

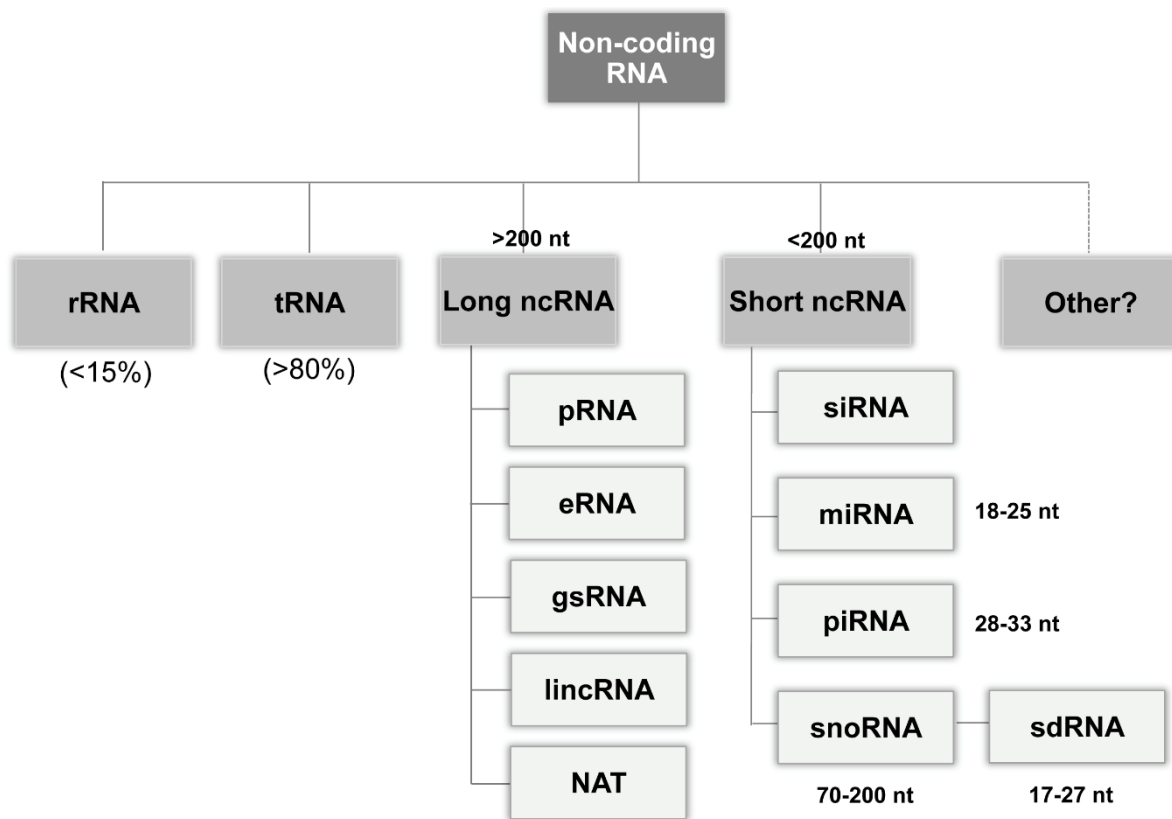
روی هم‌رفته مطالعات اخیر نشان داده است که ncRNA ها نقش اساسی در ژنوم انسان دارند و بر خلاف دیدگاه‌های گذشته ژنوم یوکاریوت‌ها بسیار پیچیده بوده و ژن‌ها ممکن است به صورت هم‌پوشان (خواه هم‌جهت و یا آنتی‌سنس) روی رشته‌ی DNA قرار داشته باشند و عناصر تکراری و ncRNA های زیادی با عملکرد نامشخص به واسطه مکانیسم‌های مختلفی رونویسی می‌شوند.

مرور و آشنایی با انواع آرناهای غیر کد کننده (non coding RNA یا ncRNA ها) و عملکرد آن‌ها

^۱ Promoter-associated large RNA

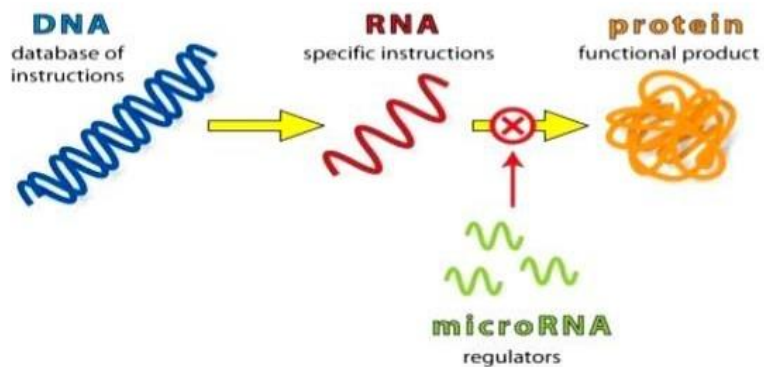
^۲ Functional Annotation of the Mouse

^۳ Long interspred element and Short interspred element



مرور و آشنایی با Micro RNA (miRNA): میکرو آر ان ای (میکروارنا یا میکرو RNA) چیست

Micro RNAs (miRNAs)



microRNAs, short non-coding RNAs present in all living organisms, have been shown to regulate the expression of at least half of all human genes. These single-stranded RNAs exert their regulatory action by binding messenger RNAs and preventing their translation into proteins.

miRNAها گروهی از ncRNAها هستند که در حدود ۱۷ تا ۲۵ نوکلئوتید طول دارند و نقش مهمی را در خاموشی پس از رونویسی^۱ صدها تا هزاران ژن کد کننده و غیر کدکننده حیوانات و گیاهان، ایفا می کنند. در بین ncRNAها در حال حاضر بیشترین شناخت را از miRNAها داریم و روز به روز بر تعداد آنها در مقالات افزوده می شود. مکانیسم عمل miRNAها به این صورت است که اغلب با اتصال به 3' UTR ژن ها باعث خاموشی آن می شود، اما جدیداً مشخص شده است که برخی از miRNAها با اتصال به نواحی کدکننده عمل خود را انجام می دهند [۲۸]. آنها قادرند محصولات پروتئینی ژن ها را تحت تاثیر قرار بدهند و بنابراین می توانند شبکه های داخل سلولی و مسیرهای واکنش ها را تحت تاثیر قرار بدهند؛ مثل شبکه ی ژنی p53 [۲۹]. این گروه از ncRNAها نقش مهمی در بیماری های انسانی دارند و در انواع اختلالات میزان آنها کم یا زیاد می شود برای مثال miR-21 از جمله miRNAهایی است که در تومورهای مغزی^۲ میزان بیانش افزایش می یابد [۳۰]. بنابراین تهیه پروفایل های بیانی miRNA^۲ برای تشخیص انواع بیماری ها حائز اهمیت است [۳۱].

RNA میان کنش کننده با piwi (piRNA) Piwi-interacting RNAs

RNA میان کنش کننده با piwi (piRNA) گروهی از ncRNAها هستند که از طریق میان کنش با پروتئین piwi عمل خود را انجام می دهند

طول piRNA در حدود ۲۶ تا ۳۱ نوکلئوتید می باشد و در سر 5' آن یک باز یوریدین^۳ وجود دارد. این گروه از ncRNAها غالباً در بین خوشه هایی از توالی های تکراری در ژنوم وجود دارند. دلایل مختلفی وجود دارد که نشان دهند این

^۱ Post-translational gene silencing

^۲ Brain tumors

^۳ miRNA expression profiles

^۴ Uridine

است که piRNAها سبب خاموشی عناصر رتروترانسپوزونی^۱ در ژنوم می شوند [۳۴، ۳۵].

Small RNAs چیست

این گروه از RNAها به طور کلی طولی بین ۲۰ تا ۳۰۰ نوکلئوتید دارند. این گروه از ncRNAها را به انواع siRNA^۲، rasiRNA^۳، snoRNA^۴ و غیره تقسیم بندی کرده اند. siRNAها به عنوان محصولات پردازش شده ی RNAهای طویل دو رشته ای^۵ می باشند [۳۶]. rasiRNAها از نواحی تکراری ژنوم مثل ترانسپوزونها منشا می گیرند و عملکردی شبیه به عملکرد piRNAها دارند [۳۷]. snoRNAها گروهی از ncRNAها هستند که در فرایند تغییر RNAهای ریبوزومی (snRNA) و RNAهای دیگر شرکت می کنند [۳۸].

مرور و آشنایی با آرناهای غیر کد کننده بزرگ (long non coding RNA یا lncRNAها) و عملکرد آن ها

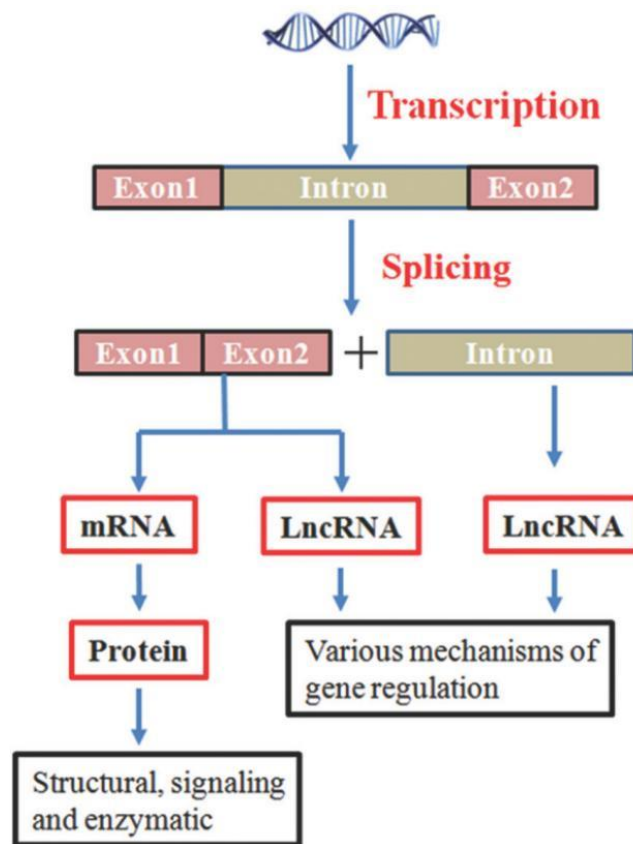
^۲ Retrotransposable

^۳ Endogenous small interfering RNA

^۵ Repeat-associated siRNA

^۶ Small nucleolar RNA

^۷ Long double-stranded RNAs



lncRNAها^۱ یک گروه رو به افزایش از نظر تعداد از بین ncRNAها می باشند که طولی در حدود ۳۰۰ تا حدود ۱۰۰ کیلو باز را دارا می باشند و حداقل در ژنوم یوکاریوتها وجود دارند و همانند mRNAها توسط آنزیم RNA pol II رونویسی می-شوند. lncRNAها یک گروه ناهمگونی هستند که اگرچه وظایف مختلفی می توانند داشته باشند اما هنوز به طور کامل مشخص نشده اند. در حال حاضر عملکردی که lncRNAها می-توانند داشته باشند را به طور کلی به چهار گروه طبقه بندی می کنند (شکل ۱) [۳۹].

سیگنال^۲

تله^۳

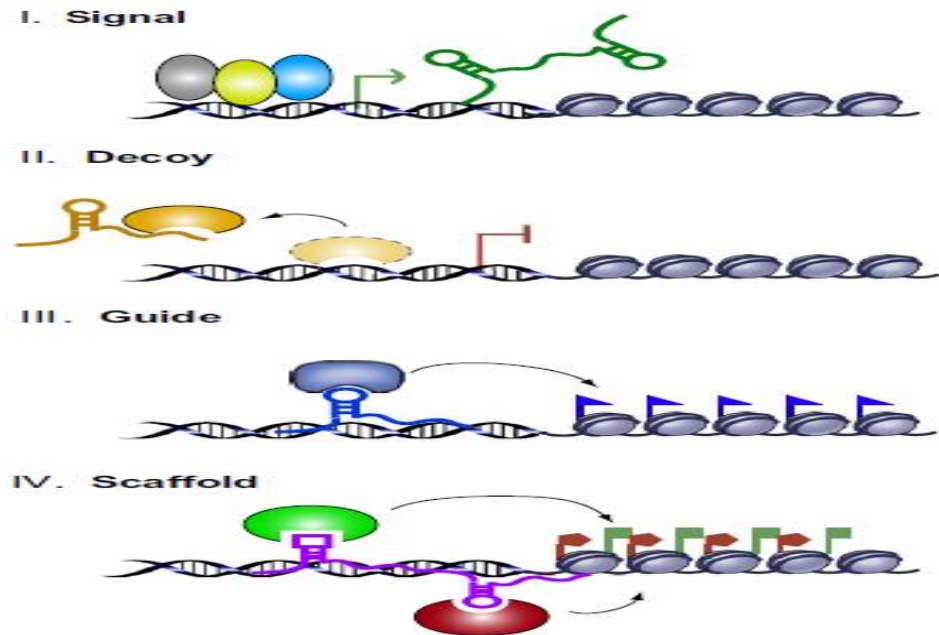
^۱ Long (large) non-coding RNAs

^۲Signal

^۳Decoy

راهنما^۱

داربست^۲



شکل: شماتیکی از مکانیسم‌های عمل lncRNA ها (۱) به عنوان سیگنال می‌توانند با بیان شدن به همراه فاکتورهای رونویسی سبب تنظیم بیان ژن‌ها بشوند. (۲) به عنوان تله قادرند فاکتورهای رونویسی و دیگر پروتئین‌هایی که روی DNA تاثیر دارند را با اتصال به آن‌ها از اتصال به DNA دور نگه‌دارند. البته برخی از lncRNA ها با دارا بودن محل اتصال برای miRNA از تاثیر آن‌ها بر روی اهدافشان می‌کاهند. (۳) به عنوان راهنما سبب می‌شوند که آنزیم‌های تغییر دهنده کروماتینی چه به صورت cis (در همان ناحیه‌ای که lncRNA متصل است) و چه به صورت trans بر روی اهداف خود تاثیر بگذارند. (۴) به عنوان داربست سبب به هم چسبیدن پروتئین‌ها شده و یک ریبونوکلئوپروتئین را به وجود می‌-

^۱ Guide

^۲ Scaffold

آوردند که خود این قادر است انواع فعالیتها را در داخل هسته انجام دهد مثل سیگنال یا تغییر کروماتین و... [۳۹].

جدول زیر بطور مختصر به معرفی ncRNA ها و عملکرد آنها می پردازد.

ncRNA class	Size	Function
miRNAs	~23 nt	Regulation of hundreds to thousands of protein-coding and non-coding genes by mechanisms such as post-translational gene silencing in animals and plants
piRNAs	26–31 nt	Repeat silencing in the genome and regulation of DNA methylation affecting gene expression
Small RNAs	~20–300 nt	Diverse functions from RNA modification to genomic imprinting in eukaryotic cells
LncRNAs	≥300 to thousands of nt	Diverse functions from structural mechanisms to gene regulation by epigenetic modifications

در مقایسه با RNA ها غیر کد شونده کوچک، مثل miRNA ها که به طور گسترده نقش بیولوژیکی آن ها در فرآیندهای سرطان مورد مطالعه قرار گرفته است [۴۰]، lncRNA ها نسبتاً کمتر توصیف شده اند. با این حال ذات بیولوژیکی lncRNA ها که اغلب به عنوان ماده تاریک^۱ ژنوم به آن اشاره می شود به تدریج در حال روشن شدن است [۴۱].

مطالعات قبلی نشان داده است، تعداد زیادی از lncRNA ها که نقش قابل توجهی در تنظیم تکامل سلولی و تمایز و فرآیندهای مختلف دیگر دارند غالباً در سرطانهای مختلف از تنظیم خارج می شوند [۴۲].

^۱ Dark matter