

نقش miRNA ها در تشخیص و درمان مالتیپل اسکلروزیس (MS)

فاکتوریال است. ریسک ابتلا در فردی که نسبت نزدیک تری با بیمار داشته باشد بیشتر است. در دوقلوهای مونوزایگوتی که در ۱۰۰٪ محتوای ژنتیکی مشترک هستند، این ریسک ۲۵٪ و برای دوقلوهای دی زایگوتی ۵٪ است که نشان دهنده تاثیر سایر فاکتورها (اپی ژنتیک و محیط) علاوه بر ژنتیک در بروز بیماری است (۹). MS مشابه سایر بیماری های خودایمن یک بیماری کمپلکس است و چندین ژن در آن دخیل است. الگوی متفاوت آسیب های تخریب در بین بیماران نشان دهنده هتروژن بودن این بیماری است.

پروفایل بیانی ژن ها

بررسی پروفایل بیانی ژن ها در سلول های تک هسته ای خون محیطی (PBMC) و مغز و مایع مغزی نخاعی (CSF) توسط CDNA microarray، افزایش و کاهش بیان چندین ژن را در بیماران مبتلا به MS، نسبت به گروه کنترل نشان داده است. براساس تحقیقات، بیشترین و مهم ترین جایگاه ژنی درگیر در این بیماری، لوکوس HLA در بازوی کوتاه کروموزوم ۶ که گلیکوپروتئین های سطح سلولی متنوعی را کد می کند و از اجزای سیستم ایمنی هستند. سایر لوکوس های مرتبط: STAT3 - IL7RA- IL2RA CASP8 - CD58 (۴). همپوشانی نتایج تحقیقات مختلف به دلیل نمونه برداری از بافت های مختلف، استفاده از تکنیک های متفاوت و یا هتروژن بودن بیماری، کم است.

افزایش بیان ژن

افزایش بیان ژن هایی که مربوط به عملکرد و فعالیت Tcell ها هستند، در این بیماری اهمیت ویژه ای دارند که شامل:

میکرو RNA (miRNA)، RNA های کوچک غیرکدشونده ای است که بیان ژن ها را در سطح پس از رونویسی تنظیم می کند. miRNA ها به میزان زیادی در سلول های ایمنی و سیستم عصبی بیان می شود که نشان دهنده اهمیت آن ها در نوروایمونولوژی است. علاوه بر نقشی که آن ها در پروسه های فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی دارند، محققان بسیار امیدوارند که از miRNA ها به عنوان بیومارکرهای بیماری، معرف های درمانی و اهداف دارویی استفاده کنند. اکثر پروسه های سلولی از تکثیر و تمایز تا آپوپتوز می توانند توسط miRNA ها تنظیم شود. اخیراً مطالعاتی به منظور بررسی نقش miRNA ها در بیماری مالتیپل اسکلروزیس (MS) با استفاده از تکنیک های مختلف نقشه یابی miRNA انجام شده است. نقص miRNA ها در سلول های T- (Tcell)، موجب بروز پاسخ التهابی بیش از حد یا خود ایمنی می شود (۱).

معرفی

(MS) نوعی بیماری تخریب کننده سیستم عصبی مرکزی به همراه درجات مختلفی از آسیب به آکسون ها است. در حال حاضر ۲۰۰۰۰۰۰ نفر در سراسر جهان به MS مبتلا هستند (۸). مکانیسم این بیماری، اختلال در سلول های تولید کننده میلین و تخریب میلین توسط سیستم ایمنی بدن است و از جمله علائم آن، می توان به ناتوانی در حرکت و احساس خستگی، مشکلات دیداری (دوبینی) و خواب رفتگی اندام ها اشاره کرد. علت بیماری MS نامعلوم است ولی تعدادی لوکوس ژنی مرتبط با این بیماری معرفی شده است که به همراه فاکتورهای اپی ژنتیکی و عوامل محیطی در کسانی که استعداد ژنتیکی داشته باشند، موجب بروز بیماری می شود. به بیان دیگر MS نوعی بیماری مولتی

- ✓ **CKS2 (proteinkinase2 gene)**: عدم فسفریلاسیون هیستون H1
- ✓ **JUN**(انکوژن)
- ✓ **مهارکننده بافتی متالوپروتئیناز ۱ (۷)**

MS و miRNA

miRNA ها، RNA های کوچک غیرکدشونده به طول ۱۹-۲۴ نوکلئوتید است که بیان ژن هدف را بواسطه تخریب mRNA ژن مورد نظر در سطح پس از رونویسی و به دنبال آن سرکوب ترجمه، تنظیم می کند و در پروسه های تمایز سلولی، تکثیر، آپوپتوز، رشد و فعال کردن سلول های ایمنی نقش دارد. به همین دلیل نقش آن ها در پروسه های پاتولوژیکی و فیزیولوژیکی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. برهم خوردن تنظیم miRNA ها منجر به بیماری های خودایمن می شود. از این رو miRNA ها می تواند به عنوان بیومارکر های بیماری برای تشخیص زودهنگام، تعیین پاسخ درمانی و نیز به عنوان اهداف دارویی مورد استفاده قرارگیرد. یک بیومارکر باید پایه و اساس بیولوژیکی داشته باشد و نیز ارتباط کلینیکال و همبستگی، بین آن و فعالیت بیماری برقرار باشد، به علاوه تشخیص بیماری و پیگیری روند درمان را میسر کند. miRNA ها تمام این ویژگی ها را دارد از این رو گزینه مناسبی برای این منظور است (۸).

مزایای miRNA نسبت به سایر بیومارکرها مانند RNA و پروتئین :

- ۱- بیش از ۳۰۰۰۰ ژن وجود دارد که miRNA و پروتئین ها را کد می کند درحالی که حدود ۱۵۰۰ miRNA در انسان شناسایی شده است. بنابراین آنالیز آنها بهتر مدیریت می شود و به منابع و ابزار کمتری به ویژه در کلینیک نیاز دارد.
- ۲- دوام و پایداری miRNA ها نسبت به ریبونوکلائز بیشتر است.
- ۳- miRNA ها در نمونه های زیادی شامل بیوپسی بافتی، خون کامل، سلول های خونی، سرم، پلاسما و ادرار قابل شناسایی است.
- ۴- چندین Platform نقشه یابی miRNA

✓ **ZNF148** : پروتئینی که به CACCC box پروموتور رسپتور ژن های (TCR متصل شده و رونویسی را فعال می کند.

✓ **ZAP70** : ارتباط بین رسپتور Tcell و مسیر سیگنالینگ درون سلولی را در جریان فعالیت Tcell ها برقراری کند.

✓ **ژن رسپتور اینترلوکین 7 (IL7R)** : رسپتور اینترلوکین ۷ برای تمایز و تکامل گاما و دلتا Tcell ها ضروری است (۷).

✓ **MHC Class2** : افزایش این مولکول های سطحی در ماکروفاژها و میکروگلیاهای CNS، منبعی برای شروع التهاب و ایجاد پاسخ Tcell ها است. MHC Class2 پاسخ وابسته به CD4 در مقابل آنتی ژن را میانجی گری می کند. CD4 هایی که در سطح Tcell ها و Thelper ها است آن ها را نشاندار کرده و به MHC2 متصل می کند. (CD4 تنها سرعت پاسخ دهی به عفونت را بالا می برد) (۶).

✓ **TNF² reseptor(CD27)** : نقش costimulator در Tcell ها را دارد و برای تداوم پاسخ ایمنی لازم است.

✓ **PAFAH1B1** : زیرواحد غیرکاتالیتیکی استیل هیدرولاز فاکتور فعال کننده پلاکت (PAF) را کد می کند. PAF در التهابات نقش ایمنی در برابر آلرژن را دارد و موجب جذب شیمیایی گلوبول های سفید می شود.

✓ **کموکاین ها:** افزایش بیان CXCL10 (IFN inducible protein 10KDa) و CXCL9(monokine induced by IFN) که با اتصال به رسپتور مورد نظر در سطح Tcell ها و ماکروفاژها (CXCR3) آنها را به سمت CNS جذب می کنند و از این طریق پروسه التهاب را راه اندازی می کنند(۵).

کاهش بیان ژن

✓ **HSP70** : دارای عملکرد چاپرونی است به علاوه حفاظت کننده نوروں ها و نیز تخریب کننده mRNA سایتوکین ها در مسیر یوبی کوئیتین پروتئوزوم است (سایتوکین ها پروتئین هایی است که از سلول های ایمنی نظیر لنفوسیت ها و ماکروفاژها و مونوسیت ها ترشح می شود و پاسخ ایمنی را ایجاد کرده و موجب تجمع بیشتر سلول های ایمنی به محل آسیب می شود).

از microarray تا Deepsequencing به صورت متداول در دسترس است.

از سال ۲۰۰۹ مطالعات بسیاری به منظور بررسی درگیری miRNA ها در بیماران مبتلا به MS با استفاده از تکنیک های متفاوت نقشه یابی miRNA انجام شده است که در ادامه به برخی از آن ها اشاره می کنیم.

۱- نقشه یابی بیان miRNA 364 در PBMC بیماران مبتلا به MS که در فاز عود بودند و بیماران در فاز بهبود و گروه کنترل به وسیله TLDA Cards، نتایج حاصل، از نظر آماری افزایش 4 نوع miRNA را برای بیماران فاز عود در مقایسه با گروه کنترل نشان داده است : miR-493 / miR-18b / miR-599 / miR-326 و نیز میزان اختصاصیت و حساسیت miR155 بالا رفته بود (۱۴). miRNA326 بویژه در CD4Tcell ها افزایش می یابد و با مهار، مهارکننده Th17(ETS-1) باعث پیشرفت تمایز Th17 می شود. (Th17) با تولید اینترلوکین ۱۷ واکنش بافتی را به دنبال دارد که در بیماری های خودایمن مسئول التهاب بافت ها است. (Th17) نقش حیاتی را در تخریب ایفا می کند (۱۲).

۲- مطالعه ای دیگری بیان miRNA 365 را توسط TLDA Card در آسیب های مغزی فعال و غیرفعال بیماران و مقایسه آن با ماده سفید نرمال در گروه کنترل بررسی کرد:

افزایش بیان miR-155 در آستوسیت ها و نیز افزایش بیان miR-326/miR34a .

miRNA155 به همراه LEF7E قطبیت CD4Tcell را به سمت Th17 یا Th1 سوق می دهد (تمایز Th17 و Treg را موجب می شود) و رها سازی IL17 را از Th17 القا (تحریک) می کند.

miRNA155 - miRNA326 - miRNA34a با اثر بر روی UTR3 ژن CD47 موجب کاهش CD47 در سلول های مغز شده و این موجب می شود ماکروفاژها شروع به فاگوسیتوز میلین کنند.

(CD47 یک پروتئین گذرنده از غشا است که میان واکنش آن با SIRP آلفا - رسپتور سلول های میلوئید - منجر به ممانعت از فاگوسیتوز و فعالیت Tcell ها می شود) (۱۳).

۳- برخلاف مطالعات گذشته که مجموعه ای از سلول های درون بافت را بررسی کرده بود، این مطالعه بیان miRNA ها را در CD4 TCell/CD8 TCell/B Cell های خالص شده بررسی می کند.

نتایج افزایش بیان ۱۰ miRNA متفاوت را نشان داد. از جمله miR17-92 بود که فعالیت TCell و در نتیجه خودایمنی را در موش های ترنس ژن تحریک می کند. PI3KR1 (زیرواحد تنظیم کننده PI3 کیناز) و PTEN (فسفاتاز) که تنظیم کننده منفی آبشار PI3K بوده، دو هدف برای miR17-92 است.

ترنسفکشن با مهارکننده miR17-92 موجب افزایش PI3KR1 و PTEN و کاهش مولکول های پایین دست آبشار PI3K می شود.

۴- نقشه یابی 723miRNA توسط microarray در جمعیت Treg (TCell های تنظیم کننده) بیماران MS و گروه کنترل :

در این مطالعه مشخص شد که تفاوت های بین miRNA در جمعیت سلول های Treg بیماران می تواند زمینه کاهش عملکرد این سلول ها باشد (۱۵).

بیان 23miRNA افزایش یافت از جمله miR-106b/miR-19a/miR-19b/miR-19-25 از آنجا که این miR ها در تنظیم مسیر TGF بتا از طریق خاموش سازی CDKN1A/P21 و BCL2L11/Bim درگیر است، می تواند فعالیت و یا توسعه Treg را کاهش دهد. به علاوه miR17-92 (که در CD4CD25Tcell ها افزایش میابد) نیز در مهار مسیر TGF بتا شرکت می کند. همان طور که مشخص است، همپوشانی کمی بین نتایج مطالعات وجود دارد که این می تواند به دلیل استفاده از تکنیک های مختلف نقشه یابی، متفاوت بودن نمونه های آزمایش و یا هتروژن بودن بیماری باشد.

آنچه از این اطلاعات بیولوژیکی می توان استنباط کرد این است که وجود miRNA هایی که تنظیم آن ها برهم خورده در بیماران MS به بروز فنوتیپ های TCell التهابی کمک می کند و با فعالیت و عملکرد Treg ها و Tcell ها مرتبط است.

معینی استفاده کرد و از این طریق بیان ژن هدف را افزایش داد (RNA Silencing).

چالش های RNA Therapy

● به دلیل اثر یک miRNA بر چندین mRNA و نیز تنظیم هر mRNA توسط چند miRNA، دستکاری یک miRNA می تواند نتایج ناخواسته ایجاد کند و کاربرد درمانی آن را پیچیده کند (۴).

● مقایسه و آنالیز نتایج نقشه یابی miRNA با مطالعات ترنس کریپتوم و پروتئومیک نیز یکی از چالش های اصلی برای کاربرد کلینیکال است.

● در مواردی miRNA ها بجای مهار کردن، می توانند سبب تقویت رونویسی و ترجمه شوند.

- احتمال راه اندازی پاسخ ایمنی سلولی به وسیله RNA therapy .

LNAs (locked nucleic acids) یک راه بسیار نوید دهنده در پیشبرد درمان با استفاده از RNA است. این مولکول با affinity بالا به مولکول RNA مکمل متصل می شود و سبب پایداری بیشتر آن در خون و بافت می شود. نتایج حاصل از miRNA silencing به واسطه LNA در پریماط ها از توسعه درمان های مبتنی بر miRNA در آینده حمایت می کند. هرچند تا کنون هیچ درمانی با استفاده از miRNA در بیماری های خودایمن مورد آزمایش قرار نگرفته است.

تغییرات اپی ژنتیکی و فاکتورهای محیطی

از آنجا که MS بیماری مولتی فاکتوریالی است و ژنتیک و محیط هر دو در بروز آن نقش دارند بنابراین آشنایی با فاکتورهای اپی ژنتیکی و کنترل و مدیریت آنها می تواند در بروز بیماری نقش داشته باشد (۹).

تغییرات اپی ژنتیکی از طریق سه مکانیسم مهم میزان بیان ژن ها را تغییر می دهند که شامل: متیلاسیون DNA، تغییرات هیستونی و miRNA البته برهم کنشی از این سه مکانیسم موثر است و هر کدام به تنهایی تاثیری ندارد. متیلاسیون DNA : DNMT3a – DNMT3b دو نوع متیل ترانسفراز است که با افزودن متیل به جزایر CPG، که



درمان MS

درمان ها در جهتی است که پاسخ های ایمنی را کاهش داده و توانایی افراد مبتلا را افزایش دهند. داروهایی که در حال حاضر برای درمان استفاده می شود شامل :

✓ اینترفرون B

✓ گلاتیرامراستات : بیان miR146a و miR142-3p را

کاهش می دهد و به حد نرمال می رساند.

✓ مونوکلونال آنتی بادی ناتالوزیماب : درمانی بسیار موثر است اما به دلیل اینکه در بعضی موارد عوارض جانبی شدیدی دارد استفاده از آن محدود شده است.

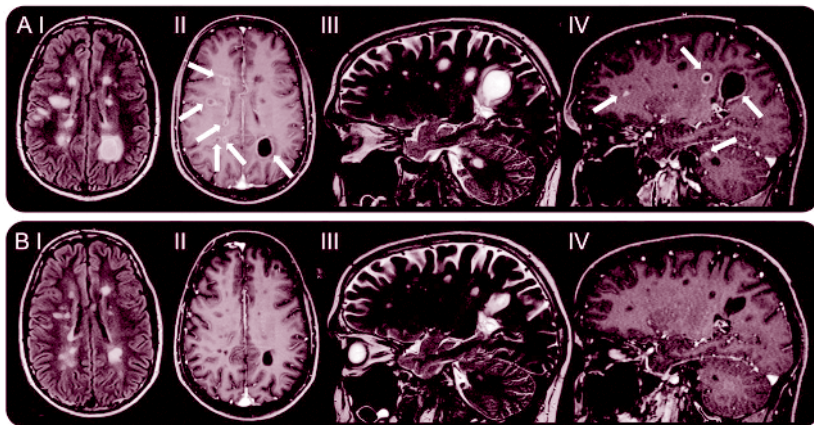
✓ Anti-CXCL10 antisera : جلوگیری از پیشروی تخریب می کند (Ab-mediated neutralization) (۵).

کاربردهای درمانی miRNA

ارتباط miRNA ها با شروع و پیشرفت بیماری های انسانی مثل MS سبب توجه بیشتر محققان نسبت به چنین درمان هایی شده است. تشخیص زودرس، سنجش ریسک بیماری، نظارت بر پیشرفت و پاسخ درمانی به داروها و نهایتاً درمان، زمینه هایی است که miRNA ها در آن می توانند نقش موثری ایفا کنند.

سرم خون و پلاسمانمونه های مهم برای بررسی miRNA ها به عنوان بیومارکر است که دسترسی به آنها ساده و ارزان قیمت است، هرچند از تمام مایعات بدن مثل CSF می توان استفاده کرد.

در زمینه درمان می توان از الیگونوکلوئوتید آنتی سنس (anti-miRNA) به منظور ممانعت از miRNA



بیشتر در نواحی پروموتور ژن ها حضور دارند، موجب مهار رونویسی و کاهش بیان ژن می شود.

تغییرات هیستونی: استیلایسیون و داستیلایسیون یا فسفریلایسیون و دفسفریلایسیون هیستون ها توسط آنزیم های مربوطه موجب فعال یا غیر فعال شدن ژن ها می شود.

بحث

عرصه مطالعه miRNA ها در بیولوژی مولکولی به سرعت در حال رشد و گسترش است. miRNA ها تنظیم کننده های مهم بیان ژن هستند و عملکرد آن ها برای همئوستازی ایمنی و جلوگیری از بیماری های اتوایمن ضروری است. بیان miRNA ها در طی خون سازی و تمایز سلول های لنفوئیدی بدقت تنظیم می شود و اختلال در آنها سلول را به سمت پاسخ های ایمنی تنظیم نشده سوق می دهد. مطالعات نشان می دهد در MS پروفایل بیانی miRNA ها برهم می خورد بنابراین می توان از miRNA ها به عنوان اهداف دارویی و نیز بیومارکر برای سنجش ریسک بیماری، تشخیص، نظارت بر پروسه درمان و در نهایت درمان استفاده کرد. هرچند این عرصه نیاز به تحقیقات و آزمایشات فراوانی در آینده دارد.

منابع:

1. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004; 116(2):281-297. [PubMed: 14744438]
2. Chiara Fenoglio, Elisa Ridolfi, Daniela Galimberta and Elio scarpini (2012) MicroRNAs as Active Players in the Pathogenesis of multiple sclerosis
4. Kemalugur Tufekci, Meryem Gulfem oner, sermin Genc, and Kursad Genc (2010) MicroRnas and Multiple sclerosis
5. Michael T. Liu, Hans s. keirstead and Thomas E. Lane (2001) Neutralization of the chemokine CXCL10 Reduces inflammatory cell invsion and demyelination in a Viral model of M.S.

miRNAS : RNA های غیرکدشونده تک رشته ای کوچک

که به همراه کمپلکس RISC موجب مهار ترجمه می شود. - فاکتورهای محیطی از طریق مکانیسم های اپی ژنتیکی می توانند اثرشان را اعمال کنند. از جمله فاکتورهای محیطی :

- سطح ویتامین D (هورمون استروئیدی که در پوست، زمانی که در معرض اشعه UV قرار می گیرد تولید می شود): با افزایش سطح سرمی ویتامین D ریسک ابتلا به MS کاهش میابد از این رو شیوع MS در کشورهای نزدیک به خط استوا کمتر است.

ویتامین D از طریق تنظیم بیان ژن های موثر در تغییرات هیستونی، اثرش را اعمال می کند.

- سیگار کشیدن: افراد سیگاری در مقایسه با کسانی که سیگار نمی کشند ریسک ابتلای بالاتری دارند، دود سیگار محتوی توکسین بوده و کارسینوژن است.

هرچند محدود کردن اثر ماده هتروژنی مثل دود سیگار به مکانیسمی خاص مشکل است اما اخیرا مشخص شده که سیگار غالبا از طریق متیلایسیون DNA تاثیرش را اعمال می کند و به علاوه موجب تغییرات هیستونی و تغییر در بیان miRNA ها می شود.

- EBV: ویروسی که سلول های B خاطره را آلوده می کند و با فعال کرده چندین متیل ترانسفراز الگوی متیلایسیون را در B cell ها تغییر می دهد.

مشاهده ماهنامه تشخیص از آزمایشگاهی به صورت کلیپ صوتی و تصویری

ازین پس صفحاتی از ماهنامه را به صورت کلیپ تصویری مشاهده کنید. در این شماره طرح مربوط به تصاویر و ۱۰ آگهی شرکت های آریا فارمد (روی جلد)، من، شوکا زیست و آرینا حیات دانش بیش از آن چیزی است که در تصویر چاپ شده می بینید. گوشی همراه خود را پس از نصب نرم افزار (واقعیت افزوده) از سایت ماهنامه، روی آن تصاویر قرار دهید و کلیپ مربوطه را مشاهده کنید.