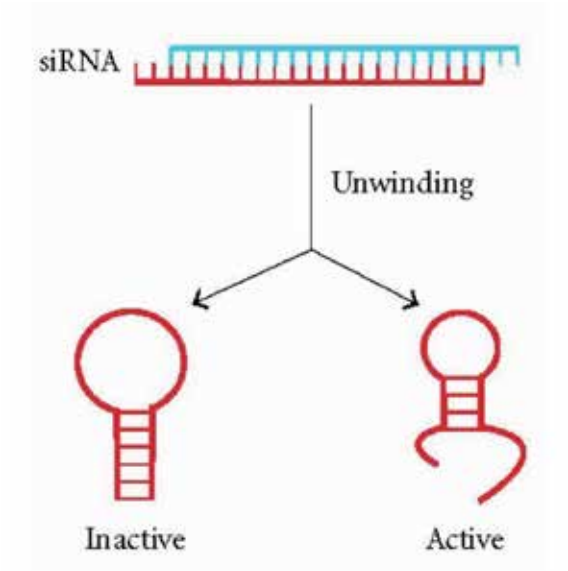
مهندس فرزانه اعوانی- دانشجوی روزانه مقطع کارشناسی ارشد مهندسی بافت دانشگاه صنعتی امیرکبیر

گذری بر پدیده سرکوبگری در بیان ژن

بررسی های انجام شده در زمینه خاموشی ژن در گیاهان نشان می دهد که خاموشی ژن می تواند در نتیجه جلوگیری از رونویسی ژن و یا تخریب mRNA رونویسی شده باشد. به عبارتی خاموشی ژن در دو سطح رونویسی ژن و پس از آن روی می دهد. خاموشی ژن در سطح رونویسی در اثر متیلاسیون پروموتر مربوط به رونویسی ژن هدف رخ می دهد. در این نوع خاموشی که در هسته سلول انجام می شود بطور کلی از ژن هدف رونویسی صورت نمی گیرد. اما خاموشی پس از رونویسی تأثیری بر میزان رونویسی ژن ندارد و با مداخله در ساختار تک رشته ای mRNA ژن هدف باعث تخریب mRNA در سطح سیتوپلاسم و موجب توقف بیان آن می شود. RNA مداخله گر یک عبارت کلی است که در مورد تکنولوژی خاموشی پس از رونویسی بر مبنای دو رشته ای کردن mRNA ژن مورد نظر به کار می رود و در موجودات مختلف با عبارات مترادفی عنوان می شود ، RNA مداخله گر در گیاهان با عنوانPTGS مطرح می شود.



تصویر۱ : شماتیکی از ساختار siRNA

در کنار انواع مولکول های افزایش دهنده ی بیان ژن می خواهیم از مولکول هایی استفاده کنیم که بیان یک ژن را سرکوب کند یا به اصطلاح آن ژن را Nock out یا Nock down بنماید. در این حوزه انواع و اقسام مختلفی از عوامل می توانند عمل نمایند. دسته ی اول عوامل مورد بررسی " الیگونوکلئوتیدها " هستند. این مولکول ها با عنوان Short Single Strand DNA شناخته می شوند به این معنی که از نوع نوکلئوتید بوده و دارای اندازه ی خاصی می باشد (۲۰-۱۰۰ باز).این اندازه متغیر است.ابعاد این ساختار ها از پلازمیدها کوچکتر بوده و در آنها Base Pairing رخ نمی دهد. الیگونوکلئوتیدها را با (ONs) نشان می دهند. در مورد الیگونوکلئوتیدها با مفهومی به نام Anti Sence ONs مواجه هستیم.

در رونویسی از زنجیره های DNA دو مفهوم Strand و Anti Sence وجود دارد. استرند بخشی از مولکول DNA است که برروی آن قسمت فرآیندهای خاص مانند رونویسی صورت می پذیرد. Anti Sence نیز زنجیره ای از استرند دو رشته ای است که اتفاقی برروی آن نمی افتد. همانطور که پیش تر گفته شد الیگونوکلئوتید ها ساختار های تک رشته ای اما کوتاهی هستند که وظیفه ی سرکوب بیان ژن را بر عهده دارند. مکانیزم عمل آنها بدین صورت است که آنها بنا به قواعد Base Pairing به تک استرندی از RNA که ژن خاصی روی آن قرار دارد (Sencing Strand) متصل شده و لذا با بلاک کردن آن مانع بیان ژن می گردد. این اتصال برروی ناحیه ای از RNA رخ می دهد که مکان شناسایی آنزیم آغازگر رونویسی است. هنگامی که این اتصال برقرار شد در ادامه ی فرآیند تداخل ایجاد می شود به این صورت که با ایجاد این ساختار جفت آنزیم RNAase سیگنال دریافت کرده و به آن محل رفته و با برش آن ناحیه ی دابل استرند سبب

قطع ژن می گردد. بنابراین هرگاه بخواهیم ژن خاصی را خاموش کنیم در ابتدا لازم است به دقت توالی نوکلئوتیدی آن را شناسایی نموده و سپس براساس آن بازهای مکمل را برای ساخت الیگونوکئوتید در کنار یکدیگر قرار دهده و سپس آن را به سلول وارد نماییم تا بتوانی فرآیند Targeting را بخوبی هدایت کنیم. لذا با حضور به موقع الیگونوکلئوتید مناسب تولید پروتئین حاصل از ژنی خاص متوقف خواهد شد.از این رویکرد می توان در تعدیل تولید پروتئین خاص نیز می توان استفاده کرد به این صورت که برای مثال گاها بیماری خاصی در اثر تولید بیش از حد یک پروتئین ایجاد می شود اما با استفاده از الیگونوکلئوتید سنتزی متناسب تولید آن پروتئین کمتر شده و بیماری درمان می شود.

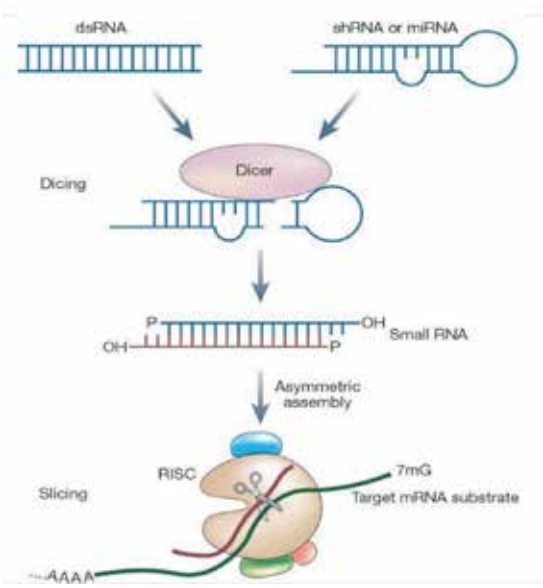
دو بحث مکمل در راستای ممانعت از بیان ژن به پروتئین می تواند رخ دهد. چنانچه به نحوی ناحیه ی مورد هدف از RNA از دسترس خارج باشد در نهایت اتصال آنزیم قطع کننده ی RNA را نخواهیم داشت. این بحث تحت عنوان occupancy یا قابلیت اشغال شدگی عنوان می شود. معمولا ناحیه اشغال شدگی Initiation codon می باشد؛ حال اگر این ناحیه در دیدرس الیگونوکلئوتید نباشد در نهایت خاموش شدگی ژن را نخواهیم داشت. بحث بعدی در مورد PreRNA می باشد به طوری که چنانچه PreRNA در نواحی ای که در Splicing حفظ می شوند مورد هدف باشد در این صورت به طور کلی ویرایش دچار اختلال شده و باز به پروتئین نهایی نخواهیم رسید.

دسته ای از خانواده ی الیگونوکلئوتید ها، دسته ی Anti gene Application O.Ns می باشند که همانطور که از اسم آنها مشهود است عمل ضدژنتیکی دارد.عملکرد این دسته از الیگونوکلئوتید ها به این صورت است که به ناحیه ی خاصی از دابل استرند از DNA که حاوی ژن مدنظر است رفته و به نفع خود بخشی از پیوندهای هیدروژنی بین جفت بازها را شکسته و خود متصل می شوند و در نتیجه ساختاری سه تایی یا Triple Strand ایجاد می گردد.لذا پس از این اتصال اشغال شدگی رخ داده و فاکتور ترجمه توانایی اتصال نخواهد داشت و در نتیجه رونویسی از DNA و در ادامه تولید پروتئین رخ نخواهد داد.این مورد می تواند در هسته ی سلول عمل نماید.

RNAهای مداخله گر

مداخله ی RNA مکانیزمی است که اخیرا مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است.این پدیده، رخدادی RNA Base بوده که منجر به توقف بیان پروتئین می شود اما تفاوت آن با روش های پیشین این است که در این فرآیند ریبونوکلئوتید ها شرکت داشته در حالیکه در مورد الیگو نوکلئوتید های مولکول دخیل DNABase می باشد. در مکانیزم RNA های مداخله گر چند جز اصلی حضور دارند که در ادامه به آنها پرداخته خواهد شد؛

Dicer: آنزیمی که در فرآیند RNA interfrance وظیفه یقطع کردن ناحیه مورد هدف را که حاوی ژن خاص است برعهده دارد.



تصویر۲؛ آنزیم دایسر و عملکرد آن

Anzymatic Complex Machine : مجموعه ی آنزیمی که در کنار Dicer ها وظیفه ی شکافتن mRNAرا بر عهده دارد.

siRNA: موکلول های ریبونوکلئوتیدی مداخله گر که ورودی سیستم تداخلگر ما خواهد بود.

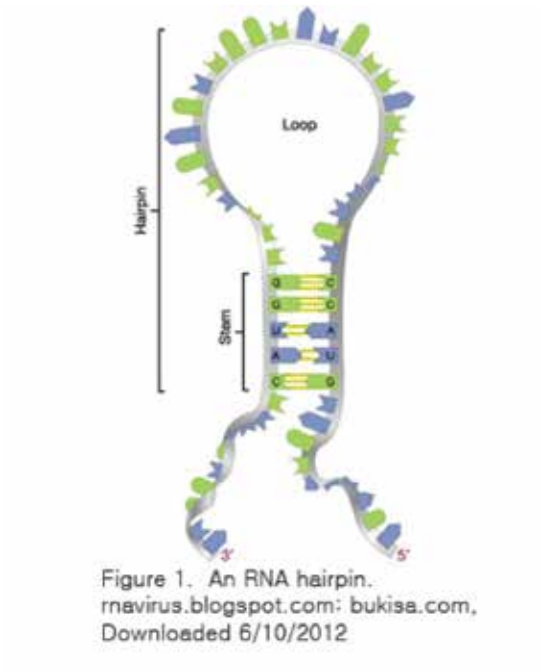
تداخلگری RNA هم در سلول های یوکاریوتی و هم در سلول های پروکاریوتی مشاهده شد. این فرآیند در سلول ها بصورت طبیعی نیز رخ می دهد؛ برای مثال هنگامی که بدن با ویروس مواجه می شود، ویروس ژنوم خود را وارد سلول میزبان می کند بدن بااین مکانیزم در بیان ژن های بیگانه تداخل ایجاد میکند لذا علائم بیماری در فرد بروز نخواهد کرد.

در محتوای ژنوم سلول ها بخش هایی وجود دارد که از آن بخش ها RNAهای خاصی ساخته می شود.این

مولکول ها(Short Interfrence RNA) siRNA نام دارند که دارای توالی دوتایی خاصی است که در واقع از یک استرند تک زنجیره ی DNA ایجاد شده است. هنگامی که در سلول تصمیم بر خاموش شدن ژن خاصی گرفته شود ابتدا وقایع ویژه ای برای siRNA رخ می دهد.به این صورت که ابتدا آنزیم Dicer قطعه ی خاصی از siRNA را برش می دهد.به واسطه ی این برش این زنجیره ی دوتایی از یکدیگر باز شده و بخشی از آن جدا می شود.حال Enzymatic Com-plex Machine وارد عمل شده و بخش باقیمانده را حمل کرده و آن را در ناحیه ی خاصی از mRNAکه ژن مورد نظر سلول در آن قرار گرفته است پیاده می کند.حال آنزیم RNAaseوارد عمل شده و آن ژن را قطع کرده تا پروتئین ویژه ای تولید نشود.به این پدیده Gene Silencing گفته می شود. امروزه توالی های ویژه ی دابل استرند از مولکول siRNA به صورت سنتزی فروخته می شود که برای مثال برعلیه ژن خاصی تولید شده است.می توان این قطعات را توسط حامل خاص به سیتوپلاسم وارد کرد در این صورت عمل آنزیم Dicer و در ادامه کمپلکس آنزیمی آغاز خواهد شد. پس میتوان گفت آغاز مکانیزم عمل siRNA هم میتواند فرمان صادر شده از هسته ی سلول باشد و هم انتقال RNAی خارجی به داخل سلول.

Short HairPin RNA

دســـته ی دیگری از خاموش کنندگان ژن hairpinRNAها هستند که ساختاری دوتایی از RNA داشته در ابتدای آن یک حلقه و در انتهای آن یک زائده وجود دارد. ورود این ساختار به سلول سبب فعال شـــدن آنزیم های ویژه ای می شود که به واسطه ی فعال شـــدن آنها از ژن مدنظر برش ایجاد شده و ژن خاموش می شود.عملکرد shRNA ها مشابه یا siRNA ها بوده بااین تفاوت که دستور ساخت shRNA مستقیما باید از هســـته صادر شـــود در حالیکه در مورد hairpinRNA ها علاوه بر محصول ناشـــی از فرمان هســـته میتوان به صورت خارجی نیز این دســـته را به سیتوپلاسم ســـلول وارد کرد. یکی از مزیت های shRNA ها پایدارتر بودن ســـاختار آنها و حساسیت کمتر آنها به آنزیم های مختلف می باشد.علت این پایداری نیز مســـطح بودن ساختار سه بعدی shRNAها بوده که سبب عوم فعالیت آنزیم های مخرب برروی آن می گردد.



تصویر ۳؛ ساختار hairpinRNA

میکروRNA یا (miR)

این دسته از زنجیره های RNA Base کاربرد های متنوعی دارند. مکانیزم تشکیل این دسته از خاموش کنندگان ژن اندکی پیچیده است. اتصال این دسته از مولکول ها با RNA میزبان بصورت نسبی یا Partially است. علاوه بر گیاهان، حیوانات و برخی از رده های ویروسی دارای ژن کد کننده ی miR می باشند. مکانیزم عمل miR ها با shRNA و siRNA مقداری متفاوت است بدین صورت که این مولکول در برخی نواحی سبب قطع و در برخی نواحی سبب Unstable شدن RNA میزبان می گردد.همچنین می تواند برروی بخش PolyA بنشیند و یا اثر خود را بر روی Regulatory region بگذارد ؛لذا لزوما سبب قطع mRNA نمی شود.رسیدن به miR نسبت به رسیدن به دو نوع RNAگفته شده در بخش قبل پروسه ی طولانی تری دارد. بخشی از DNA مسئول ساخت microRNA می باشد.در این روند هم انواع مختلفی آنزیم خواهیم داشت که در نهایت به mature RNA خواهیم رسید.در قدم نخست از DNA ساختاری موسوم به PremiR ساخته می شود. این ساختار مشابه

با hairpinRNA می باشد که در هسته ایجاد می شود.سپس یک کمپلکس آنزیمی وارد عمل شده و این ساختار اولیه را پردازش می کند.این سیستم آنزیمی Dorsha Complex نام دارد. پس از پردازش محصول ایجاد شده طی مکانیزم exportin۵ از هسته خارج شده و وارد سیتوپلاسم شود.در سیتوپلاسم آنزیم Dicer سبب کوتاه شده miR و قطع بخش حلقوی ابتدای آن شده و محصول حاصل به RNA میزبان به صورت نسبی اتصال پیدا می کند.

Dicoil ها

الیگونوکلئوتید های خاص که DNAو یا RNA بیس هستند. نکته ی مهم این است که در آن بخش هایی وجود دارد که می توانند به پروتئین ها نیز اتصال برقرار نمایند.در ساختار این دسته از مولکول ها معمولا بخش هایی وجود دارد که برای اتصال با پروتئین ها با سایر مولکول ها رقابت می کنند.طراحی این دسته اختصاصی بوده چراکه برای اتصال با پروتئین ها می توانند بکار گرفته شوند. منظور از پروتئین ها در این بخش Transcription Factor ها می باشند.این اتصال به نوبه ی خود با بلاک کردن این دسته از پروتئین ها سبب جلوگیری از بیان ژن و در ادامه ترجمه و تولید پروتئین خواهد شد.

آپتامرها

دسته‌ی مهم و کاربردی در مبحث ژن درمانی است.این ساختار ها تقریبا مشابه با Dicoil ها هستند که می توانند به پروتئین ها ی هدف اتصال برقرار کنند.چنانچه این پروتئین ها در دسته ی پروتئین های دخیل در فرآیند ترجمه و بیان ژن باشند عمل ممانعت کنندگی آنها مشخص می شود.

بحث مهم

در پاسخ به این سوال که آیا متیلاسیون DNA مسئول خاموشی بیان ژن است یا خیر و یا اینکه آیا ژن ها قبل از اینکه متیله شوند بوسیله یک مکانیسم دیگر خاموش می شوند یا خیر باید گفت که در واقع متیلاسیون که خاموشی ژن را (با اضافه کردن گروه CH۳ توسط آنزیم DNA متیلاز۱ (DNMT1)) تقویت می کند، نشان دهنده RNA هایی است که به تازگی توسط ژن ها تولید می شوند.

محققین پی بردند که در طول رونویسی DNA به RNA یک ژن، مقدار کمی از چیزی که دانشمندان به آن extracoding RNA می گویند را تولید می کند. این ماده در هسته باقی می ماند و به DNMT1 متصل می شود و توانایی این آنزیم برای متیله کردن یا خاموشی ژن را مسدود می کند. کشف عملکرد جدید RNA به عنوان سویچی برای روشن و خاموش کردن ژن ها می تواند یک پتانسیل درمانی بالقوه باشد. سرپرست تیم تحقیقاتی می گوید: ما با وسایل گوناگون نشان دادیم که Extracoding RNA برای محافظت ژن ها در برابر متیله شدن بکار گرفته می شوند و زمانی که RNA خاموش می شود، ژن ها متیله شده اند. قسمت جالب اینجاست که مدت هاست DNMT1 را به عنوان آنزیم متصل شونده به DNA می دانند و تعجب آور است که این آنزیم قادر است به خوبی به Extracoding RNA اتصال یابد. به گفته Tenen اگر بتوانیم Extracoding RNA را در درون سلول قرار دهیم، از توانایی DNMT1 در متیلاسیون جلوگیری می شود و دمتیلاسیون را القاء کرده ایم. این دلیلی جالبی برای این است که سرطان و سایر بیماری ها با استفاده از عوامل دمتیلاسیون درمان می شوند.

منابع:

- Mellios N, Sur M (2012). “The Emerging Role of microRNAs in Schizophrenia and Autism Spectrum Disorders”. Frontiers in Psychiatry. 3: 39.
- Geng CM, Ding HL (February 2008). “Double-mismatched siRNAs enhance selective gene silencing of a mutant ALS-causing allele”. Acta Pharmacologica Sinica. 29 (2): 211–6.
- Ding H, Schwarz DS, Keene A, Affar el B, Fenton L, Xia X, Shi Y, Zamore PD, Xu Z (August 2003). “Selective silencing by RNAi of a dominant allele that causes amyotrophic lateral sclerosis”. Aging Cell. 2 (4): 209–17.

ماهنامه تشخیص آزمایشگاهی را در فضای مجازی دنبال کنید:

@Tashkhis_Magazine

www.tashkhis.ir

Tashkhis_Magazine

tashkhis magazine