

تأثير الأحماض النووية الريبوزية الطويلة الغير مشفرة وشفرات ما فوق الجينات على التعبير الجيني لمورث الجريلين لدى مرضى السكري من النوع الثاني

داليا بنت محمد عنبري

إشراف: ا.د/ رويدة بنت نواف الحارثي

الملخص

تلعب الأحماض النووية الريبوزية الطويلة غير المشفرة دوراً هاماً في العديد من العمليات الحيوية المرتبطة بمختلف الأمراض المزمنة والتي تتضمن مرض السكري من النوع الثاني. كما يلعب هرمون الجريلين دوراً حاسماً في العديد من العمليات الحيوية في الجسم والمرتبطة بتطور الكثير من الأمراض المزمنة كمرض السكري من النوع الثاني. إن الهدف من البحث الحالي هو ايجاد المؤشرات الحيوية الجديدة لمرض السكري من النوع الثاني عن طريق التحقق من الاختلاف في التعبير الجيني للأحماض النووية الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل في الدم والمستنسخة من المنطقة الجينية لهرمون الجريلين وفهم دور التغيرات الفوق جينية في مسببات مرض السكري من النوع الثاني وتطوره. تم استخدام تحليل المعلومات الحيوية لإيجاد الأحماض النووية الريبوزية الطويلة غير المشفرة المرشحة للدراسة الحالية من جين الجريلين. كما تم تحديد مستويات التعبير الجيني للأحماض النووية الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل للجريلين عن طريق استخدام تجربة تفاعل البوليميريز المتسلسل بالزمن الحقيقي على ٧١ مريضاً بالسكري من النوع الثاني و ٣٢ فرداً غير مصاب بالسكري من النوع الثاني كعينة ضابطة للبحث. تم استخدام منحنى المتلقي التشغيل المميز لتقييم القوة التمييزية للأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض الريبوزي المرسل كمؤشرات حيوية لمرض السكري من النوع الثاني. كما تم تقييم مدى ارتباط التعبير الجيني للأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل لهرمون الجريلين بالسكر التراكمي، الألبومين، الكرياتينين، اليوريا، حمض اليوريك ومستوى الدهون في مرضى السكري من النوع الثاني وذلك باستخدام تحليل الإنحدار الخطي ومعامل ارتباط بيرسون. كما تم إجراء فحص للكشف عن الهستونات المعدلة على الهستون الثالث في الأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض الريبوزي المرسل وذلك على عينات مرضى السكري من النوع الثاني ومقارنتها بالعينات الضابطة وتم استخدام تجربة المقايسة اللونية الكمية المتعددة للكشف عن ٢٢ نوعاً مختلفاً من التغيرات الهستونية والذي يتضمن الهستون ثنائي المثيلة في الحمض الأميني لايسين الرابع وذلك على عينات مصل الدم لعدد ٣٩ فرداً (٢٩ مرضى السكري من النوع الثاني و ١٠ أشخاص غير مصابين بالسكري من النوع الثاني) وذلك للكشف عن التغيرات الهستونية في العينات ومقارنة المرضى بالمجموعة الضابطة ومدى ارتباطها بمرض السكري من النوع الثاني. أظهرت النتائج بأن مستويات التعبير الجيني للأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل لهرمون الجريلين والمتعلقة بالبحث كانت منخفضة بشكل ملحوظ وكبير بقيمة احتمالية أقل من ٠,٠٠٠١ كما أظهرت النتائج أن المنطقة الواقعة تحت المنحنى للأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل كانت ٠,٩٠، ٠,٩٠، ٠,٩٦، ٠,٩٨ و ٠,٩٠ على التوالي. كما أشارت النتائج الى وجود ارتباط سلبي ملحوظ بشكل كبير بقيمة احتمالية أقل من ٠,٠٥ بين مستويات التعبير الجيني للأحماض الريبوزية الطويلة الغير مشفرة المكتشفة وبين معدل السكر الصائم والتراكمي، الألبومين، حمض اليوريك، اليوريا، الكوليسترول الكلي، الدهون الثلاثية، البروتين الدهني منخفض الكثافة بينما كان هناك ارتباط ايجابي بشكل ملحوظ بقيمة احتمالية اقل من

٠,٠٥ مع البروتين الدهني عالي الكثافة. لم يلاحظ أي علاقة بين الأحماض النووية الريبوزية الغير مشفرة والحمض النووي الريبوزي المرسل المستنسخة من مورث الجريلين مع مستوى الكرياتينين. في تجربة الفحص الكمي عن الهستونات المعدلة عن طريق المقايسة اللونية الكمية للهستون الثالث، لم يتم ملاحظة أي اختلاف في نسبة الهستونات المعدلة بين مرضى السكري من النوع الثاني والمجموعة غير المصابة بالضابطة. كما أظهرت نتائج تجربة فحص الهستون الثالث الثنائي المثيلة على الحمض الأميني لايسين الرابع بعدم وجود فروقات ملحوظة بين مرضى السكري من النوع الثاني والمجموعة غير المصابة بالضابطة والذي يقترح عدم وجود ارتباط بين التغيرات الهستونية ومرض السكري من النوع الثاني. في الختام، كشفت نتائج هذا البحث عن أربعة مؤشرات حيوية جديدة لتشخيص مرض السكري من النوع الثاني وتعتبر من الأحماض الريبوزية الطويلة غير المشفرة والمستنسخة من المنطقة الجينية للجريلين وربما تلعب دوراً تنظيمياً هاماً في تطور المرض. أيضاً يشير البحث إلى وجود علاقة بين مستويات التعبير الجيني للأحماض النووية الريبوزية الطويلة غير المشفرة والحمض الريبوزي النووي المرسل للجريلين وبين مستوى الدهون والذي يشير إلى احتمالية أن هذه الأحماض الريبوزية تلعب دوراً تنظيمياً في أيض الدهون.

Long non-coding RNAs and epigenetic codes implications on *Ghrelin* gene expression in Type 2 Diabetes Mellitus

Dalia Mohammad Anbari

Supervised by/ Prof. Rowyda Nawwaf Al-Harithy

Abstract

Long non-coding RNAs (lncRNAs) have an important role in many biological processes that are associated with several chronic diseases including Type 2 Diabetes Mellitus (T2DM). The hormone ghrelin (GHRL) has critical roles in the regulation of several pathways that are linked to the progression of T2DM. The aim of this project was to identify novel circulating lncRNAs located in the region of the *GHRL* gene as blood-based biomarkers and to understand the role of epigenetic changes in T2DM etiology and progression. Bioinformatics analysis was used to identify lncRNAs-*GHRL* candidates. The expression level of lncRNAs-*GHRL* and *GHRL* mRNA in 71 diabetic patients and 32 non-diabetic controls were determined using Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction (qRT-PCR) method. Receiver Operating Characteristic (ROC) curve analysis was performed to evaluate the discriminatory power of the candidate lncRNAs-*GHRL* and *GHRL* mRNA as biomarkers for T2DM. Fasting blood glucose (FBG), glycated hemoglobin (HbA1c), total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein (HDL), low-density lipoprotein (LDL), very low-density lipoprotein (VLDL), albumin, creatinine, urea, and uric acid levels were measured using standard assays. Linear regression analysis and Pearson correlation coefficient were performed to evaluate the correlation between lncRNAs-*GHRL* expression and levels of lipid profile. Quantitative screening of histone H3 modifications were performed using colorimetric assays that detect 22 different histone modifications including dimethyl H3K4 (H3K4me₂) in the serum of 39 participants (29 diabetics and 10 non-diabetic subjects). The expression profiles demonstrated that the expression levels of *lnc-GHRL-3:2*, *lnc-GHRL-3:3*, *GHRLOS*, *LINC00852*, and *GHRL* mRNA were significantly downregulated in the diabetic patients compared to the non-diabetic controls ($P < 0.0001$). The values of the area under the curve (AUC) for *lnc-GHRL-3:2*, *lnc-GHRL-3:3*, *GHRLOS*, *LINC00852*, and *GHRL* mRNA were 0.90, 0.90, 0.96, 0.98 and 0.90; respectively. The results showed that the expression levels of the novel lncRNAs-*GHRL* and *GHRL* mRNA were significantly positively associated with HDL and significantly negatively correlated with the level of FBG, HbA1c, TC, TG, LDL, VLDL, uric acid, and urea ($P \leq 0.05$). No association was observed between lncRNAs-*GHRL* with creatinine level. No significant differences were detected in the level of the 22 histone H3 modifications between T2DM patients and the non-diabetic control which suggests that there was no association between histone H3 modifications and T2DM. In conclusion, the results revealed that *lnc-GHRL-3:2*, *lnc-GHRL-3:3*, *GHRLOS*, *LINC00852*, and *GHRL* mRNA are novel biomarkers associated with T2DM and they might have regulatory roles in the development of the disease. Also, the

expression of lncRNAs-*GHRL* and *GHRL* mRNA might have a potential role in the regulation of lipid metabolism in patients with T2DM.