

BACE1-AS non-coding RNA increases apoptosis in HAOEC endothelial cells

Iman Sadeghi¹, Babak Bakhshinejad², Hossein Moradi Rehabdarkolae³,
Majid Sadeghizadeh^{4*}

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Ph.D., Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 3- PhD, Department of Statistical Sciences and Operations Research, Virginia Commonwealth University, Richmond, VA 23284, U.S.A
- 4- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: Sadeghma@modares.ac.ir

Received: 30/Jun/2017, Accepted: 13/Sep/2017

Abstract

Objective: Heart failure is one of the most common types of cardiac diseases with high rate of morbidity and mortality, which places a large burden on society. Despite well care system, the survival rate for end-stage heart failure patients is less than 1%. Several studies have recently shown a significant association between long non-coding RNAs with different cardiac diseases.

Methods: We investigated the functional mechanism of BACE1-AS, which was previously reported to be up-regulated in heart failure patients, by assessments of gene expression analysis, cell proliferation, and apoptosis.

Results: BACE1-AS down-regulation significantly reduced expressions of cyclin inhibitors that included CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, and CDKN2B with the exception of CDKN2C and CDKN2D. BACE1-AS over-expression increased expressions of these cell cycle genes, which implied an effect of BACE1-AS LncRNA on the cell cycle. BACE1-AS down-regulation decreased BCL-2 mRNA expression and increased BAX gene expression. BACE1-AS up-regulation increased BCL-2 and reduced BAX expressions. We did not observe any significant change in cell proliferation with BACE1-AS down-regulation, while BACE1-AS up-regulation decreased cell numbers and induced apoptosis compared with the control group (cells treated with an empty vector).

Conclusion: These results showed the important role of BACE1-AS in cell death and, accordingly, pathogenesis of heart failure. It could be considered a potential biomarker for targeting and treatment of heart failure.

Keywords: Heart failure, Biomarker, Non-coding RNA

Pathobiology Research, Vol. 20 (2017-2018), No.4, Pages: 53-66

RNA غیر کدکننده BACE1-AS در سلول‌های اندوتلیال HAOEC و افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

ایمان صادقی^۱، بابک بخشی نژاد^۲، حسین مرادی رکابدر کلایی^۳، مجید صادقی زاده^{۴*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دکتری تخصصی، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دکتری تخصصی، گروه پژوهشی علوم آمار، دانشگاه Virginia Commonwealth، ریچموند، آمریکا

۴- استاد، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک مولکولی

Email: Sadeghma@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۶/۲۲

دریافت مقاله: ۹۶/۰۴/۰۹

چکیده

هدف: ایست قلبی یکی از شایع‌ترین بیماری‌های قلبی با نرخ مرگ و میر بالا و هزینه‌های زیاد محسوب می‌شود. با وجود مراقبت‌های ویژه، هنوز هم نرخ بقای یک ساله بیماران دارای ایست قلبی مرحله آخر کمتر از ۱ درصد است. در مطالعات مختلفی ارتباط RNAهای غیر کدکننده با انواع بیماری‌های قلبی نشان داده شده است. مواد و روش‌ها: در این مطالعه، مکانیسم عملکردی RNA غیرکدکننده BACE1-AS با استفاده از بررسی بیان ژن، تکثیر سلولی و مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده مطالعه شد که در مطالعات قبلی محققان حاضر در بیماران دارای ایست قلبی افزایش بیان نشان داده بود.

نتایج: نتایج نشان داد که مهار BACE1-AS باعث کاهش بیان مهارکننده‌های سایکلین چرخه سلولی یعنی CDKN1A، CDKN1B، CDKN1C، CDKN2A، CDKN2B، CDKN2C و CDKN2D می‌شود. همچنین بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC باعث افزایش بیان این ژن‌ها شده است که در نتیجه نشان‌دهنده تأثیر BACE1-AS روی چرخه سلولی است. مهار BACE1-AS، بیان ژن BCL2 را افزایش و بیان BAX را کاهش می‌دهد و بالعکس بیش بیان BACE1-AS باعث کاهش بیان BCL2 و افزایش بیان BAX می‌شود. مهار BACE1-AS تغییری در تکثیر سلول‌های HAOEC ایجاد نکرد ولی با بیش بیان BACE1-AS تعداد سلول‌های اندوتلیال به‌صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد و باعث افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نسبت به نمونه کنترل (سلول‌های القا شده با ناقل خالی) می‌شود. نتیجه‌گیری: این نتایج تأثیر و نقش BACE1-AS در القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و در نتیجه بیماری‌زایی در ایست قلبی را نشان می‌دهد که می‌توان از BACE1-AS به‌عنوان یک نشانگر زیستی احتمالی و هدف در درمان ایست قلبی استفاده کرد.

کلیدواژگان: ایست قلبی، نشانگر زیستی، RNA غیر کدکننده

پژوهش‌های آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۶، صفحات: ۵۳-۶۶

افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به وسیله BACE1-AS

BACE1 مورد مطالعات زیادی قرار گرفته است، به این دلیل که آنزیم محدودکننده تولید پپتید بتا-آمیلوئید بوده و در بیماری‌های آلزایمر دخیل است. رایج‌ترین فرم بتا آمیلوئید، فرم بتا آمیلوئید ۴۰-۱ و ۴۲-۱ هستند که از طریق برش در شبکه اندوپلاسمی یا دستگاه گلژی تولید می‌شوند [۷]. اگرچه عملکرد و مکانیسم BACE1-AS هنوز مشخص نشده است، به دلیل اهمیت مسیر BACE1 در تولید آمیلوئید بتا و بیماری‌های مختلف، درک مکانیسم BACE1-AS می‌تواند به تشخیص و درمان بیماری‌های قلبی-عروقی و در نهایت ایست قلبی کمک زیادی کند [۸]. در مطالعات قبلی گزارش شد که BACE1-AS در بیماران دارای ایست قلبی افزایش یافته است. با توجه به مطالعات قبلی، محققان حاضر بر این باور بودند که BACE1-AS می‌تواند روی چرخه سلولی، تکثیر سلولی و در نهایت مرگ سلول‌های قلبی تأثیرگذار باشد. در نتیجه هدف از این تحقیق، بررسی مکانیسم مولکولی عملکرد BACE1-AS در سلول‌های اندوتلیال و تأثیر آن در روند چرخه سلول و سرنوشت آن بود.

مواد و روش‌ها

کشت سلول

سلول‌های اندوتلیال آئورت انسان (Human Aortic Endothelial Cells: HAOEC) (European Collection of Authenticated Cell Cultures: ECACC) و رده سلولی HEK293T (American Type Culture Collection: ATCC) در محیط اختصاصی خود کشت داده شدند. به‌طور خلاصه، سلول‌های HAOEC در محیط EMB2 (Endothelial Growth Medium) به همراه سرم ۱۰ درصد، عوامل رشد اندوتلیال و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Penicillin/streptomycin) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵ درصد CO₂ کشت داده شدند. سلول‌های HL-1 (Cardiac muscle cell line) در محیط claycomb حاوی سرم ۱۰ درصد، نوراپی‌نفرین (Norepinephrine) ۱ درصد و

مقدمه

ایست قلبی (Heart Failure) نتیجه نهایی بسیاری از آسیب‌های قلبی-عروقی و اولین عامل مرگ و میر است [۱]. ایست قلبی معمولاً با تداخل بیان ژن‌ها همراه است که در آن بیان ژن‌های کشنده افزایش می‌یابد در حالی که بیان ژن‌های طبیعی و بالغ کاهش می‌یابد [۲]. این بازآرایی و تداخل منجر به هایپرتروفی (Hypertrophia) قلبی می‌شود که پدیده‌ای آسیب‌شناختی است که در نهایت باعث آسیب و اختلال در عملکرد قلب می‌شود. مکانیسم‌های کنترل‌کننده بیان ژن در تکوین قلب همانند مکانیسم‌هایی است که در ایست قلبی رخ می‌دهد [۳]. مطالعه این مکانیسم‌های کنترل‌کننده در تکوین قلب و ایست قلبی می‌تواند کمک زیادی به درک بهتر بیماری‌های ایست قلبی، و در نهایت پیدا کردن راه‌های تشخیصی و درمانی جدید کند. طی سال‌های اخیر، یکی از بزرگترین شگفتی‌ها در آنالیز ژنوم، کشف RNAهای غیرکدکننده (Non coding RNAs) بوده است که شامل دسته‌ای از RNAهاست که به پروتئین تبدیل نمی‌شوند ولی در عوض از طریق مکانیسم‌هایی مختلفی مانند تداخل RNA در سطح رونویسی یا ترجمه روی بیان ژن تأثیر می‌گذارند [۴]. RNAهای غیرکدکننده طویل (Long non-coding RNAs) یا LncRNA که نوعی از RNAهای غیرکدکننده هستند، از نظر اندازه از ۲۰۰ تا بیش از ۱۰۰ کیلوباز متغیر هستند و توسط RNA پلیمراز ۲ رونویسی می‌شوند [۵]. مطالعات زیادی نشان داده است که LncRNAها در فرآیندهای فیزیولوژیکی و آسیب‌شناختی و هم‌چنین بیماری‌های قلبی-عروقی درگیرند. رونوشت‌های آنتی‌سنس (Antisense transcripts) یا AS نسخه‌هایی از LncRNA است که از رشته مقابل ناحیه کدکننده RNA رونویسی می‌شوند [۶]. برای مثال، BACE1-AS از روی ایترون ژن بتا-سکرتازا ۱ (Beta-secretase 1: BACE1) در جهت آنتی‌سنس رونویسی می‌شود که کاملاً با اگزون ۶ همپوشانی دارد. به‌طور قابل‌توجهی، برخلاف بسیاری دیگر از رونوشت‌های آنتی‌سنس، BACE1-AS پایدار و رونوشت سنس BACE1 را افزایش می‌دهد. ژن

آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین ۱ درصد کشت داده شدند. سلول‌های HEK293T نیز در محیط DMEM/F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture) حاوی ۱۰ درصد سرم و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی سیلین/استرپتومایسین کشت داده شدند.

بلاک کردن RNA (RNA Blocking)

نوکلئیک اسید Gapmer مهارکننده BACE1-AS و توالی Gapmer کنترل (ThermoFisher Scientific Inc.) آمریکا) با استفاده از ماده ترانسفکشن siRNA (Santa Cruz Biotechnology، آمریکا) در سلول‌های HAOEC با غلظت نهایی ۵۰ نانومولار طبق دستور شرکت تولیدکننده ترانسفکت شد. بعد از ۱۶ ساعت محیط سلول‌ها با محیط جدید تعویض شد و آزمایش تا ۴۸ ساعت ادامه یافت.

پیش بیان BACE1-AS

به منظور پیش بیان BACE1-AS، از ناقل‌های لتی ویروسی استفاده شد. برای تولید ناقل لتی ویروسی، 8×10^6 سلول HEK293T با ناقل ویروسی (pReceiver-Lv105) (Genecopoeia Inc.) آمریکا) حامل BACE1-AS یا BACE1 full-length cDNA یا ناقل خالی با استفاده از ماده مخصوص ترانسفکشن Fugene6 ترانسفکت شد. برای القای ویروسی، 5×10^6 سلول HAOEC در دو مرحله با مایع رویی (Supernatant) لتی ویروسی در حضور ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر هگزادیمترین بروماید (Hexadimethrine bromide) (Sigma Aldrich، آمریکا) القا شد.

استخراج RNA، ساخت cDNA و تحلیل بیان

ژن با qPCR

RNA کل از سلول‌های کشت داده شده توسط تریزول

(TRIzol) (Thermo fisher scientific Inc.) آمریکا) استخراج شد. برای انجام qPCR، RNA ابتدا توسط کیت Thermofisher (Superscript III Reverse Transcriptase Scientific Inc.) آمریکا) طبق دستور شرکت تولیدکننده رونویسی معکوس شد و به cDNA تبدیل شد. سپس cDNA ساخته شده با استفاده از روش SYBR GREEN qPCR تجزیه و تحلیل شد. بعد از نرمال‌سازی برای ژن‌های UBC و RPL13، بیان نسبی RNA با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد. توالی آغازگرهای (Primers) استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

بررسی تکثیر سلولی

به منظور بررسی تکثیر سلول‌های HAOEC بعد از تیمار با BACE1-AS Gapmer، سلول‌های HAOEC ابتدا به تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول در هر چاهک پلیت ۶ چاهکی کشت داده شد. سپس نوکلئیک اسید Gapmer مهارکننده BACE1-AS و توالی Gapmer کنترل (ThermoFisher Scientific Inc.) آمریکا) در سلول‌های HAOEC با غلظت نهایی ۵۰ نانومولار طبق دستور شرکت تولیدکننده ترانسفکت شد (جدول ۲). بعد از ۱۶ ساعت محیط سلول‌ها با محیط جدید تعویض شد و آزمایش تا ۴۸ ساعت ادامه یافت. سپس با استفاده از رنگ‌آمیزی تریپان بلو (Trypan blue) و به وسیله دستگاه سلول شمار (Countess) (Thermo Fisher Scientific Inc.) آمریکا) تعداد سلول‌ها به دست آمد و تکثیر سلول‌ها برحسب نسبت تعداد سلول‌های تیمار شده با BACE1-AS Gapmer به کنترل محاسبه شد. آزمایش به صورت ۳ تکرار زیستی صورت گرفت.

برای بررسی تکثیر سلولی بعد از پیش بیان BACE1-AS نیز فرآیند مشابهی انجام گرفت. ابتدا ۳۰۰۰۰۰ سلول با مایع رویی ویروسی القا شد (همان‌طور که در بخش پیش بیان ذکر شد) و سپس سلول‌ها برای شمارش جمع‌آوری شدند.

افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به وسیله BACE1-AS

جدول ۱ توالی آغازگر ژن‌های مطالعه شده

ID	جفت آغازگر	توالی	نام ژن
NM_004849.3	F R	ATGTGCTTCGAGATGTGTGG AATGCCATTTTCAGTGGTGTG	ATG5
NM_001136031.2	F R	GCCTCAGAGAGAGCTGTGGT GCTTCATCCAGCCGATACTC	ATG7
NM_014924.4	F R	CCCTGCCTACACCATCAGTG CCTGCCTAGGTGTTCAGAGC	ATG14L
NM_003766.4	F R	ATCTCGAGAAGGTCCAGGCT CTGTCCACTGTGCCAGATGT	Beclin1
NM_001145642.3	F R	GGGTCTTCTCTAGCCTCCA GGTCAAAGGGGAATCCCTGG	Rubicon
NM_001291428.1	F R	CATGGGCTGGACATTGGACT GAGACAGGGACATCAGTCGC	Bax
NM_000633.2	F R	CCCXCGACTCCTGATTCATT GTTTCCCCCTTGGCATGAGA	Bcl2
NR_037803.2	F R	GATGGGATTTTACCCTGTTG TCAGCAACAGCCAAGATGTC	BACE1-AS
ENSG00000186318	F R	GCAGGGCTACTACGTGGAGA GTATCCACCAAGGATGTTGAGC	BACE1
NM_001220777.1	F R	GGAAAGCCATGTGGACCTGT GGATTAGGGCTTCTCTTGG	CDKN1A
NM_004064.4	F R	TGAGACGGTTCCCCAAATGC TCCAACGCTTTTAGAGGCAG	CDKN1B
NM_001122630.1	F R	CGATCAAGAAGCTGTCCGGG CGCTTGGAGAGGGACACG	CDKN1C
NM_058197.4	F R	CGGAAGGTCCCTCAGACATC AAACTACGAAAGCGGGTGG	CDKN2A
NM_004936.3	F R	GTTTACGGCCAACGGTGGAT GCCCATCATCATGACCTGGAT	CDKN2B
NM_001262.2	F R	CCTAAAGAATGGCCGAGCCT AGCGAAACCAAGTTCGGTCTT	CDKN2C
NM_079421.2	F R	CATGCTGCTGGAGGAGGTTTC AGGGTGTCCAGGAATCCAGT	CDKN2D

جدول ۲ توالی آنتی‌سنس علیه BACE1-AS و کنترل منفی

LNA_GAPMER_ID	توالی
NEG_CONT_A GAPMER_1	GCGTATAGACGTGTT TACCATCTCTTTTACC

درصد CO₂ انکوبه شدند. سلول‌ها با مایع رویی ویروسی طبق روش ذکر شده در دو مرحله با مایع رویی لنتی ویروسی در حضور ۸ میکروگرم بر میلی‌لیتر هگزادیمترین بروماید (Hexadimethrine bromide) (Sigma Aldrich، آمریکا) القا شدند و به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت ادامه دادند، سپس سلول‌ها بعد از تیمار جمع‌آوری و لیز شدند و طبق دستورالعمل شرکت سازنده، آنتی‌بادی‌های مورد نظر به محلول لیز شده اضافه شد. بعد از انکوباسیون به مدت ۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه

بررسی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis)

به منظور شمارش سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده از کیت تشخیصی Cell death detection ELISA Plus (Roche Inc، آلمان) استفاده شد. ابتدا سلول‌ها در پلیت ۶ خانه در محیط EBM2، حاوی ۱۰ درصد سرم کشت داده شدند و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵

سانتی‌گرا، با استفاده از قرائت‌گر الایزا (ELISA Reader)، جذب در طول موج ۴۹۰ نانومتر خوانده شد. در نهایت نسبت سلول‌های مرگ برنامه‌ریزی شده از نسبت جذب سلول‌های تیمار شده به سلول‌های کنترل به دست آمد.

تحلیل آماری

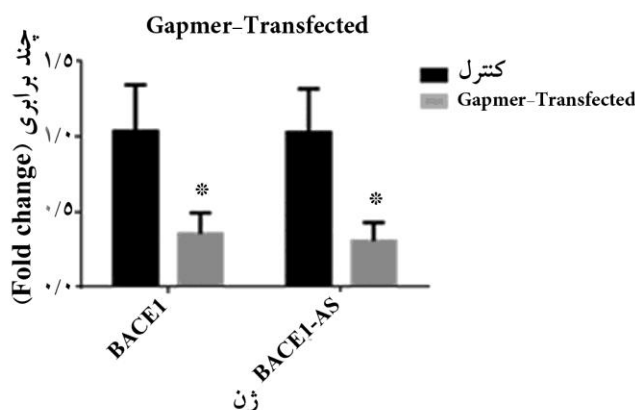
برای بررسی نتایج، از روش‌های آماری ANOVA (Analysis of variance) و t-test استفاده شد. تمامی آزمایش‌ها به صورت ۳ تکرار انجام شد و سطح معنی‌داری ۹۵ درصد در نظر گرفته شد.

نتایج

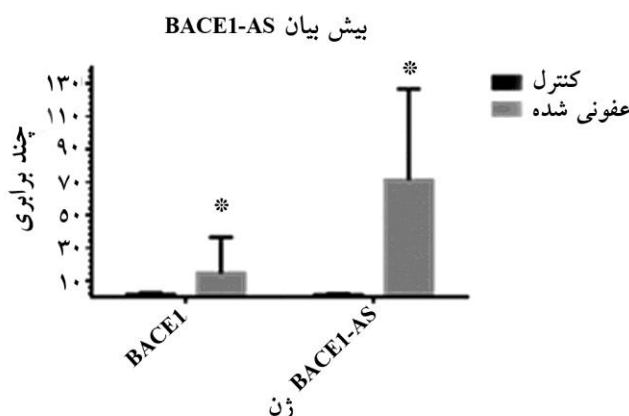
بیان BACE1 توسط BACE1-AS کنترل می‌شود

به منظور بررسی بیان ژن از Real Time qPCR استفاده شد. بعد از مهار BACE1-AS با استفاده از Gapmer، بیان BACE1 و BACE1-AS در سلول‌های HAOEC بررسی و کاهش معنی‌دار آن‌ها تأیید شد (شکل ۱ الف). همچنین بعد از بیش بیان BACE1-AS، بیان BACE1 و BACE1-AS بررسی شد و نشان داده شد که سطح رونویسی هر دو به صورت هماهنگ افزایش پیدا کرده است (شکل ۱ ب).

الف



ب



شکل ۱ واکنش زنجیره‌ای Real Time-PCR برای تأیید مهار بیان BACE1-AS؛ (الف) مهار BACE1-AS با استفاده از Gapmer، بیان BACE1 و BACE1-AS در سلول‌های HAOEC را کاهش داد. (ب) بیش بیان BACE1-AS، بیان BACE1 و BACE1-AS را افزایش داد.

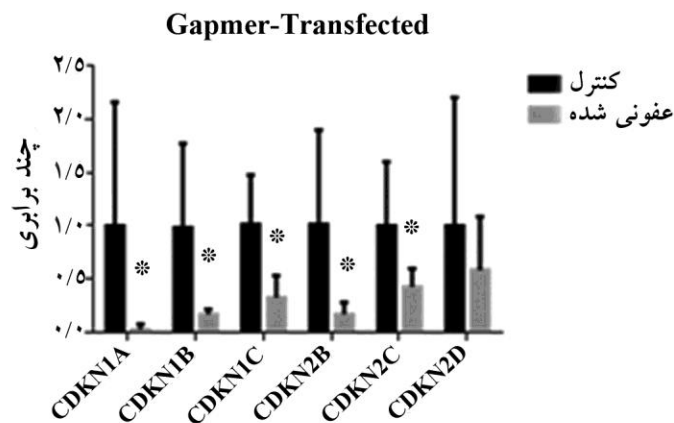
افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به وسیله BACE1-AS

BACE1-AS باعث کاهش بیان مهارکننده‌های سایکلین (Cyclin) چرخه سلولی یعنی CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C به غیر از CDKN2D می‌شود (شکل ۲ الف). همچنین بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC باعث افزایش بیان این ژن‌ها شده، که در نتیجه نشان‌دهنده تأثیر BACE1-AS روی چرخه سلولی است (شکل ۲ ب).

BACE1-AS روی چرخه سلولی تأثیرگذار است

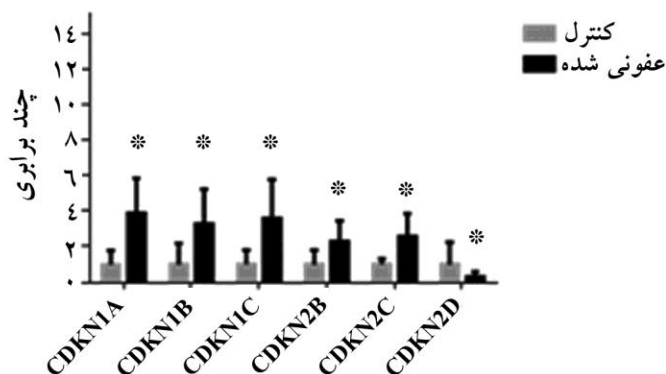
برای بررسی مکانیسم و نقش BACE1-AS در سلول‌های اندوتلیال، تجزیه و تحلیل ترانسکریپتوم (Transcriptome analysis) مسیرهای چرخه سلولی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و اتوفاجی (Autophagy) در سلول‌های HAOEC انجام شده. تحلیل بیان ژن‌های مسیر چرخه سلولی نشان داد که مهار

الف



ب

بیش بیان BACE1-AS



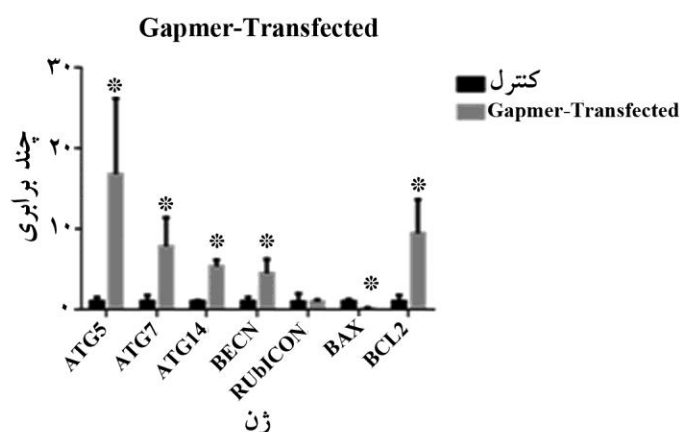
شکل ۲ واکنش زنجیره‌ای Real Time-PCR برای ژن‌های چرخه سلولی؛ (الف) مهار BACE1-AS باعث کاهش بیان مهارکننده‌های سایکلین چرخه سلولی یعنی CDKN1A, CDKN1B, CDKN1C, CDKN2A, CDKN2B, CDKN2C به غیر از CDKN2D و CDKN2C شد. (ب) همچنین بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC باعث افزایش بیان این ژن‌ها شد.

BACE1-AS ژن های مرگ سلولی برنامه ریزی**شده و اتوفازی را تنظیم می کند**

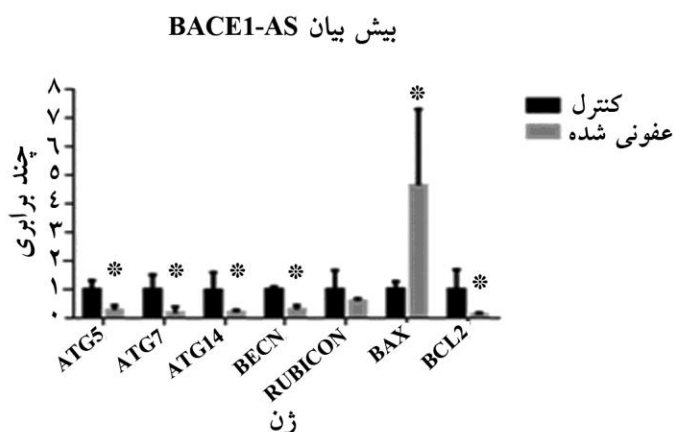
همچنین تحلیل بیان ژن های دخیل در مرگ سلولی برنامه ریزی شده نشان داد که با مهار BACE1-AS، بیان ژن BCL2 را افزایش و بیان BAX (BCL2-associated X) را کاهش می دهد (شکل ۳ الف)، و بالعکس بیان BACE1-AS باعث کاهش بیان BCL2 و افزایش بیان BAX می شود

(شکل ۳ ب). به علاوه؛ برای بررسی نقش احتمالی BACE1-AS در اتوفازی، بیان برخی ژن های دخیل در اتوفازی بررسی شد. همانطور که در شکل ۳ الف نشان داده شده است، کاهش بیان BACE1-AS باعث افزایش بیان برخی ژن های اتوفازی از جمله ATG5، ATG7، ATG14، Beclin1 به غیر از Rubicon شده است، درحالی که بیش بیان BACE1-AS باعث کاهش بیان این ژن ها (به غیر از Rubicon) می شود (شکل ۳ ب).

الف



ب



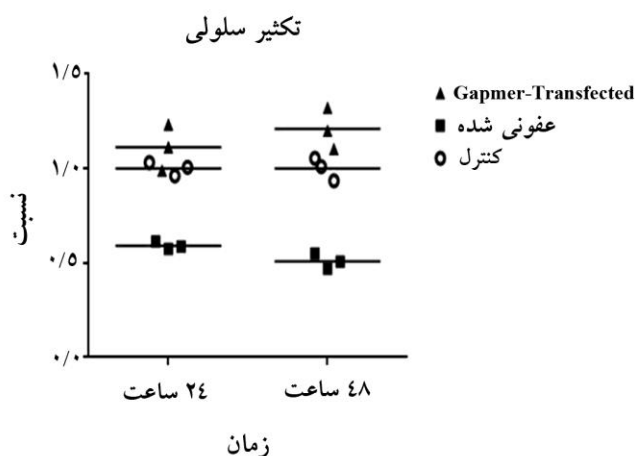
شکل ۳ واکنش زنجیره ای Real Time-PCR برای ژن های مرگ سلولی برنامه ریزی شده و اتوفازی؛ (الف) با مهار BACE1-AS، بیان ژن ATG5، ATG7، ATG14، Beclin1 و BCL2 افزایش و بیان BAX کاهش یافت و بالعکس، (ب) بیش بیان BACE1-AS باعث کاهش بیان ATG5، ATG7، ATG14، Beclin1 و BCL2 و افزایش بیان BAX می شود.

افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به وسیله BACE1-AS

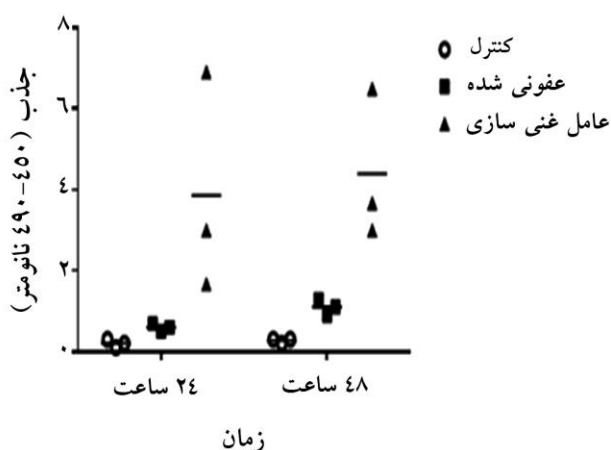
این حال با بیش بیان BACE1-AS مشخص شد که تعداد سلول‌های اندوتلیال به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد. این نتایج نشان می‌دهد که افزایش معنی‌دار در بیان BACE1-AS باعث اختلال و دستکاری چرخه سلول شده و روی تکثیر سلول‌های اندوتلیال تأثیر می‌گذارد.

تحلیل تکثیر سلولی

برای بررسی نقش احتمالی BACE1-AS روی تکثیر سلول‌های اندوتلیال، از روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو استفاده شد. همان‌طور که در شکل ۴ آمده است، مهار بیان BACE1-AS تغییر معنی‌داری در تکثیر و تعداد سلول‌ها ایجاد نکرد؛ با



شکل ۴ آزمون مرگ سلولی با استفاده از تریپان بلو؛ مهار بیان BACE1-AS تغییر معنی‌داری در تکثیر و تعداد سلول‌ها ایجاد نکرد، با این حال با بیش بیان BACE1-AS مشخص شد که تعداد سلول‌های اندوتلیال به صورت معنی‌داری کاهش می‌یابد.



شکل ۵ نتایج مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بعد از بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC؛ بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC باعث افزایش سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده و مرگ سلولی نسبت به نمونه کنترل (سلول‌های القا شده با ناقل خالی) هم در مدت زمان ۲۴ ساعت و هم بعد از ۴۸ ساعت می‌شود. تفاوت معنی‌داری بین مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت دیده نشد.

تحلیل مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده

برای سنجش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده از کیت مخصوص تشخیص مرگ سلولی Roche Cell Death Detection Elisa Plus استفاده شد. سلول‌های HAOEC با مایع رویی ویروسی القا شد و سپس برای تجزیه و تحلیل سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده جمع‌آوری شدند. همان‌طور که در شکل ۵ مشخص شده است، بیش بیان BACE1-AS در سلول‌های HAOEC باعث افزایش سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده و مرگ سلولی نسبت به نمونه کنترل (سلول‌های القا شده با ناقل خالی) هم در مدت زمان ۲۴ ساعت و هم بعد از ۴۸ ساعت می‌شود. تفاوت معنی‌داری بین مدت ۲۴ ساعت و ۴۸ ساعت دیده نشد. این نتایج تأثیر و نقش BACE1-AS را در القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نشان می‌دهد.

بحث

به دلیل اهمیت عملکرد BACE1 در بیماری آلزایمر (Alzheimer)، ارتباط مستقیم BACE1-AS با این بیماری از طریق کنترل مکانیسم ژن کدکننده مرتبط یعنی BACE1 مشخص شد. BACE1، آنزیم کلیدی محدودکننده تولید بتا-آمیلوئید، در بیماری‌زایی آلزایمر نقش اساسی دارد. بیماری‌های قلبی-عروقی و بیماری‌های عصبی از قبیل هیپوکسی (Hypoxia)، ایسکمی (Ischemia)، استرس سلولی و نقص در متابولیسم انرژی می‌تواند سطح BACE1 را افزایش دهد [۹، ۱۰]. طی مطالعه‌ای که قبلاً توسط فقیهی و همکاران گزارش شد، BACE1-AS در مغز بیماران آلزایمر افزایش بیان دارد. همچنین آن‌ها گزارش دادند که بیان BACE1 تحت کنترل بیان BACE1-AS است که این LncRNA به صورت مثبت و هم جهت با BACE1 بیان آن را در سلول‌های مغزی تنظیم می‌کند. آن‌ها نشان دادند که ترانسفکت سلول‌های SH-HEK293T، SY5Y و HEK-SW با siRNA مخصوص BACE1-AS باعث کاهش بیان BACE1 می‌شود [۱۱، ۱۲].

بررسی حاضر نیز نشان داد که ترانسفکت سلول‌های اندوتلیال HAOEC با LNA Gapmer مخصوص BACE1-AS، باعث کاهش بیان BACE1 می‌شود. همچنین نتایج به دست آمده از بیش بیان BACE1-AS با استفاده از القای ویروسی در سلول‌های اندوتلیال HAOEC باعث افزایش بیان BACE1 شد که نشان‌دهنده کنترل مثبت BACE1 توسط BACE1-AS در سلول‌های اندوتلیال است.

این مدرک که بتا-آمیلوئید در بیماری آلزایمر تجمع می‌یابد، عامل مهمی برای تعیین مکانیسمی است که از طریق آن بتا-آمیلوئید باعث مرگ سلول‌های عصبی می‌شود [۹]. مطالعات اخیر نشان داده است که در مغز بیماران آلزایمری و در کشت سلول‌های عصبی در معرض بتا-آمیلوئید، سلول‌های درحال مرگ ویژگی‌های مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده را نشان می‌دهند [۱۳]. با این حال، مکانیسم عملکرد BACE1-AS و BACE1 هنوز مشخص نیست. طی مطالعه‌ای که موریشیما (Morishima) و همکاران روی سلول‌های عصبی انجام دادند، نشان دادند که بتا-آمیلوئید از طریق فعال کردن مکانیسمی باعث مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌های عصبی می‌شود. آن‌ها نشان دادند که در نورون‌های کورتیکال مغز تحت تأثیر آمیلوئید بتا، کیناز c-JUN (c-Jun N-terminal Kinase: JNK) فعال شده برای فسفریلاسیون و فعال‌سازی عامل رونویسی c-JUN نیاز بوده است که به نوبه خود باعث فعال شدن رونویسی چندین ژن هدف کلیدی از جمله القاکننده مرگ یعنی Fas Ligand شود [۱۴]. پروتئین Fas آبخاری از وقایع را شروع کرده که منجر به فعال‌سازی کاسپازها و در نهایت مرگ سلول می‌شود [۱۵]. همچنین در مطالعه دیگری که توسط کادواکی (Kadowaki) و همکاران انجام شد، مشخص کردند که بتا-آمیلوئید در سلول‌های عصبی از طریق فعال کردن ژن ASK1 (Apoptosis signal-regulating kinase 1) (کیناز تنظیم‌کننده پیام مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده ۱)، باعث فعال شدن JNK و در نهایت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود [۱۶]. در این مطالعه نیز فرض شد که در سلول‌های قلبی، BACE1-AS و BACE1 مکانیسمی را فعال می‌کنند که

افزایش مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به وسیله BACE1-AS

کاسپازها می‌شود [۲۰]. قبلاً در سلول‌های عصبی تأثیر بتا-آمیلوئید بررسی شد و مشخص شد که با فعال کردن کاسپازها ناشی از فعال شدن Fas ligand منجر به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود [۱۴]. اینجا نیز برای بررسی تأثیر BACE1-AS در روند مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده بیان این ژن‌ها بررسی شد. کاهش بیان BCL2 و افزایش بیان BAX با افزایش بیان BACE1-AS نشان می‌دهد که BACE1-AS و در نهایت BACE1 از طریق دستکاری و تنظیم ژن‌های مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌تواند روی سرنوشت سلول تأثیرگذار باشد و سلول را از طریق فعال کردن مسیر میتوکندریایی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده به سمت مرگ هدایت کند که ممکن است ناشی از فعال شدن لیگاند Fas توسط AB و در نتیجه فعال شدن کاسپازها شود ولی با این حال هنوز چگونگی فعال شدن این مسیر توسط BACE1-AS به طور کامل مشخص نیست و نیاز به مطالعه بیشتر دارد.

از دست رفتن سلول می‌تواند از چند طریق اتفاق بیفتد. سلول می‌تواند تحت شرایطی به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده یا خودکشی برود یا اینکه به سمت دیگر یعنی اتوفازای یا خودخواری هدایت شود. در بسیاری از مواقع نیز ترکیبی از این دو در سلول اتفاق می‌افتد و با یکدیگر ارتباط پیدا می‌کنند [۲۱]. مطالعات قبلی روی سلول‌های عصبی با استفاده از تیمار بتا-آمیلوئید نشان داد که سلول‌ها به سمت مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده هدایت می‌شوند [۱۴]. با این حال در بیماری‌های قلبی مانند هایپرتروفی که منجر به ایست قلبی می‌شود، اتوفازای گزارش شده است [۲۲]. برای اینکه مشخص شود BACE1-AS روی روند اتوفازای نیز تأثیرگذار است یا خیر، در این مطالعه برخی از ژن‌های دخیل در اتوفازای نیز بررسی شد و نتایج نشان‌دهنده این است که BACE1-AS به صورت معکوس با بیان ژن‌های اتوفازای و در نتیجه اتوفازای مرتبط است. این نشان عملکرد متضاد مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده و اتوفازای تحت تأثیر BACE1-AS است که تا حدودی با مطالعات گزارش شده مطابقت دارد. مایوری (Maiuri) و همکاران طی مطالعه‌ای گزارش دادند که

همانند سلول‌های عصبی منجر به مرگ سلول می‌شود. نتایج به دست آمده از تحلیل بیان ژن نشان داد که بیان BACE1-AS روی بیان ژن‌های مرتبط با چرخه سلولی تأثیرگذار است. سایکلین‌ها ژن‌های دخیل در چرخه سلولی است که به طور مستقیم با تکثیر سلولی در ارتباط است. افزایش بیان و فعالیت آن‌ها باعث پیشرفت چرخه سلولی و در نهایت باعث تکثیر سلول می‌شود [۱۷]. از طرف دیگر ژن‌هایی وجود دارند که مهارکننده این سایکلین‌ها است و بیان آن‌ها باعث توقف چرخه سلولی و مهار تکثیر می‌شود که به آن‌ها مهارکننده‌های سایکلین گفته می‌شود [۱۸]. در مطالعه حاضر نشان داده شد که کاهش بیان BACE1-AS باعث کاهش بیان مهارکننده‌های سایکلین در چرخه سلولی شده است، در حالی که افزایش بیان BACE1-AS باعث افزایش بیان این ژن‌ها شده و از تکثیر سلولی جلوگیری می‌کند. فراسکا (Frasca) و همکاران نیز طی مطالعه خود گزارش دادند که بتا-آمیلوئید باعث شروع چرخه سلولی میتوزی می‌شود که در مرحله S متوقف می‌شود. آن‌ها نشان دادند که تأثیر بتا-آمیلوئید روی سلول‌های عصبی باعث افزایش تعداد سلول‌ها در مرحله S و کاهش سلول‌ها در مرحله G2/M است [۱۹]. این نتایج، مطابق با نتایج گزارش شده بررسی حاضر، نشان‌دهنده مکانیسم عملکردی BACE1 و تأثیر آن روی تکثیر سلولی است.

مسیر میتوکندریایی مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده در پاسخ به محرک‌های مرگ از جمله آسیب DNA، مواد شیمی درمانی، کمبود مواد مغذی و حضور مواد سمی داخل سلول فعال می‌شود. در برخی سلول‌ها، مسیر خارجی از طریق گیرنده‌های سطح سلولی مانند Fas فعال شده که می‌تواند با مسیر داخلی از طریق کاسپازها ارتباط برقرار کند و باعث شروع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده شود. BCL2 پروتئینی است که مهارکننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده است در صورتی که BAX، پروتئینی است که به BCL2 متصل می‌شود و فعالیت آن را مهار می‌کند؛ در نتیجه باعث شروع مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده می‌شود. در واقع BAX با اتصال به BCL2 تشکیل هتروداپمر می‌دهد که در نهایت باعث فعال شدن

BACE1-AS در مطالعات آینده کمک زیادی به درک آسیب‌شناسی زیستی بیماری‌های قلبی از جمله کاردیومیوپاتی هایپرتروفی (Hypertrophic cardiomyopathy) می‌کند. با توجه به اهمیت بیماری‌های قلبی از جمله ایست قلبی در جوامع امروزی، در این مطالعه به بررسی مکانیسم مولکولی یکی از RNAهای غیرکدکننده دخیل در ایست قلبی پرداخته شد. نتایج حاضر نشان داد که BACE1-AS از طریق دستکاری ژن‌های دخیل در مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، اتوفاژی و چرخه سلولی در بیماری‌زایی نقش ایفا می‌کند. این یافته‌ها می‌تواند به درک بیشتر مکانیسم بیماری‌زایی ایست قلبی و درمان احتمالی آن کمک کند.

تشکر و قدردانی

در این مطالعه از دانشگاه تربیت مدرس و همچنین بیمارستان قلب San Donato در میلان، ایتالیا تقدیر و تشکر می‌شود.

هنگامی که ژن‌های القاکننده مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده سرکوب شوند، سلول تحت شرایط کمبود مواد غذایی به سمت اتوفاژی می‌رود و ژن‌هایی از جمله ATG5، ATG7 و Bcn1 فعال می‌شوند. آن‌ها همچنین نشان دادند که اگر اتوفاژی نیز در این سلول‌ها مهار شود، مرگ سلولی نیز مهار می‌شود [۲۳]. در مقابل، مطالعات دیگر نشان داده‌است که در برخی موارد در پاسخ به محرک‌ها ابتدا اتوفاژی شروع شده و ژن ATG7 و Bcn1 فعال می‌شود و سپس ژن‌های مسیر مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده فعال می‌شود [۲۴]. در این مورد با مهار ژن‌های اتوفاژی، مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نیز غیرفعال می‌شود. به هر حال، مطالعه فعلی بسیار محدود بوده و در سطح آزمایشگاهی (in vitro) انجام شده است در حالی که بسیاری از مطالعات قبلی در سطح درون بدنی (in vivo) گزارش داده‌اند. برای بررسی بیشتر مکانیسم BACE1-AS به مطالعه in vivo و نیز مطالعه در چندین رده سلولی دیگر نیاز است. آشکار شدن مکانیسم عملکردی

منابع

- [1] Rosamond W, Flegal K, Friday G, Furie K, Go A, Greenlund K, Haase N, Ho M, Howard V, Kissela B, Kittner S, Lloyd-Jones D, McDermott M, Meigs J, Moy C, Nichol G, O'Donnell CJ, Roger V, Rumsfeld J, Sorlie P, Steinberger J, Thom T, Wasserthiel-Smoller S, Hong Y; American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. Heart disease and stroke statistics--2007 update: a report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 2007; 115(5): e69-171.
- [2] Seidman JG, Seidman C. The genetic basis for cardiomyopathy: from mutation identification to mechanistic paradigms. *Cell* 2001; 104(4): 557-67.
- [3] Morita H, DePalma SR, Arad M, McDonough B, Barr S, Duffy C, Maron BJ, Seidman CE, Seidman JG. Molecular epidemiology of hypertrophic cardiomyopathy. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 2002; 67: 383-8.
- [4] Mitra SA, Mitra AP, Triche TJ. A central role for long non-coding RNA in cancer. *Front Genet* 2012; 3: 17.
- [5] Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Molecular Cell* 2011; 43(6): 904-14.
- [6] Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev*

- Genet 2009; 10(3): 155-9.
- [7] Cole SL, Vassar R. The basic biology of BACE1: A key therapeutic target for Alzheimer's disease. *Curr Genomics* 2007; 8(8): 509-30.
- [8] Cole SL, Vassar R. Linking vascular disorders and Alzheimer's disease: potential involvement of BACE1. *Neurobiol Aging* 2009; 30(10): 1535-44.
- [9] Stamatelopoulos K, Sibbing D, Rallidis LS, Georgiopoulos G, Stakos D, Braun S, Gatsiou A, Sopova K, Kotakos C, Varounis C, Tellis CC, Kastritis E, Alevizaki M, Tselepis AD, Alexopoulos P, Laske C, Keller T, Kastrati A, Dimmeler S, Zeiher AM, Stellos K. Amyloid-beta (1-40) and the risk of death from cardiovascular causes in patients with coronary heart disease. *J Am Coll Cardiol* 2015; 65(9): 904-16.
- [10] Hartmann T, Bieger SC, Brühl B, Tienari PJ, Ida N, Allsop D, Roberts GW, Masters CL, Dotti CG, Unsicker K, Beyreuther K. Distinct sites of intracellular production for Alzheimer's disease A beta40/42 amyloid peptides. *Nat Med* 1997; 3(9): 1016-20.
- [11] Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C. Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* 2008; 14(7): 723-30.
- [12] Faghihi MA, Zhang M, Huang J, Modarresi F, Van der Brug MP, Nalls MA, Cookson MR, St-Laurent G 3rd, Wahlestedt C. Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol* 2010; 11(5): R56.
- [13] Yan R, Vassar R2. Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy. *Lancet Neurol* 2014; 13(3): 319-29.
- [14] Morishima Y, Gotoh Y, Zieg J, Barrett T, Takano H, Flavell R, Davis RJ, Shirasaki Y, Greenberg ME. Beta-amyloid induces neuronal apoptosis via a mechanism that involves the c-Jun N-terminal kinase pathway and the induction of Fas ligand. *J Neurosci* 2001; 21(19): 7551-60.
- [15] Kihiko ME, Tucker HM, Rydel RE, Estus S. c-Jun contributes to amyloid beta-induced neuronal apoptosis but is not necessary for amyloid beta-induced c-jun induction. *J Neurochem* 1999; 73(6): 2609-12.
- [16] Kadowaki H, Nishitoh H, Urano F, Sadamitsu C, Matsuzawa A, Takeda K, Masutani H, Yodoi J, Urano Y, Nagano T, Ichijo H. Amyloid beta induces neuronal cell death through ROS-mediated ASK1 activation. *Cell Death Differ* 2005; 12(1): 19-24.
- [17] Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326(6112): 515-7.
- [18] Harper JW, Adami GR, Wei N, Keyomarsi K, Elledge SJ. The p21 Cdk-interacting protein Cip1 is a potent inhibitor of G1 cyclin-dependent kinases. *Cell* 1993; 75(4): 805-16.
- [19] Frasca G, Chiechio S, Vancheri C, Nicoletti F, Copani A, Angela Sortino M. Beta-amyloid-activated cell cycle in SH-SY5Y neuroblastoma cells: correlation with the MAP kinase pathway. *J Mol Neurosci* 2004; 22(3): 231-6.

- [20] Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature* 1988; 335(6189): 440-2.
- [21] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7(3): 279-96.
- [22] Martinet W, Knaapen MW, Kockx MM, De Meyer GR. Autophagy in cardiovascular disease. *Trends Mol Med* 2007; 13(11): 482-91.
- [23] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 741-52.
- [24] Green DR. Apoptotic pathways: ten minutes to dead. *Cell* 2005; 121(5): 671-4.