

## **A Long Non-coding RNA, PSORS1C3, Located Upstream of the Human Oct4 Gene is Expressed in Pluripotent and Tumor Cell Lines**

**Mahshid Malakootian<sup>1</sup>, Fatemeh Mirzadeh-Azad<sup>2</sup>, Parisa Naeli<sup>2</sup>, Yousef Fouani<sup>2</sup>, Seyed Javad Mowla<sup>3\*</sup>**

1- Ph.D. Candidate, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2- M.Sc. Student, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

\*Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran  
Email: sjmowla@modares.ac.ir

**Received: 02/Jul/2014, Accepted: 16/Jul/2014**

### **Abstract**

**Objectives:** Long non-coding RNAs (lncRNAs), a vast class of recently discovered non-coding genes in the human genome, have been implicated in the regulation of several biological processes, including the maintenance of stem cell pluripotency and neurogenesis. New evidences have emerged that some long lncRNAs act as enhancers for their neighboring genes. Oct4, also known as POU5F1 and Oct3/4, functions as a master regulator in maintaining the properties of pluripotency and self-renewal of embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells. Oct-4 expression must be tightly regulated; too much or too little expression can lead to cell differentiation.

**Methods:** PSORS1C3, an lncRNA, is located upstream of the Oct4 gene. This lncRNA could potentially impact the level of Oct4 expression. Here, we have investigated potential expression of PSORS1C3 on 23 different human pluripotent and cancer cell lines by means of RT-PCR.

**Results:** Our results revealed a noticeable expression of PSORS1C3 both in a well-known pluripotent cell line (NTera2/NT2) and five different cancer cell lines (AGS, 5637, Ht-29, HepG2 and PC3).

**Conclusion:** We detected the expression of PSORS1C3 for the first time in both cancer cell lines and stem cells.

**Keywords:** PSORS1C3, lncRNA, OCT4, Cancer, Stem cell

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 17, No 3, Autumn 2014, Pages: 105-117

# ارزیابی بیان RNA غیر کد کننده بلند PSORS1C3 قرار گرفته در ناحیه بالا دست ژن Oct4 در سلول‌های بنیادی و سرطانی

مهشید ملکوقیان<sup>۱</sup>، فاطمه میرزاده آزاد<sup>۲</sup>، پریسا نائلی<sup>۳</sup>، یوسف فوعانی<sup>۳</sup>، سید جواد مولی<sup>۳\*</sup>

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

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

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

Email: sjmowla@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۳/۰۴/۲۵

دریافت مقاله: ۹۳/۰۴/۱۱

## چکیده

هدف: گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان RNAهای غیرکدکننده بلند (lncRNA) است که از بخش وسیعی از ژنوم یوکاریوت‌ها رونویسی شده و در تنظیم فرآیندهای متنوع زیستی از جمله پرتوانی سلول‌های بنیادی و نورون‌زایی دخالت دارد. بررسی‌های جدید نشان دهنده نقش تشدید کننده lncRNA ها بر بیان ژن‌های مجاورشان است. Oct-4 یک عامل کلیدی در خودبازسازی و حفظ حالت پرتوانی در سلول‌های بنیادی جنینی و سلول‌های کارسینومای جنینی است. این عامل نقش مهمی در حفظ حالت تمایز نیافرته سلول‌های بنیادی ایفا می‌کند و بیان آن باید به دقت در این سلول‌ها تنظیم شود، چرا که بیان خیلی بالا و خیلی پایین آن باعث تمایز سلول‌ها می‌شود.

**مواد و روش‌ها:** RNA غیر کدکننده بلند PSORS1C3 دقیقاً در بالادست Oct4 قرار گرفته است و احتمالاً نقش تنظیمی روی آن دارد. اما تاکنون الگوی بیانی این lncRNA در سلول‌های بنیادی و سرطانی بررسی نشده است، در این پژوهش بیان PSORS1C3 در ۲۳ دودمان سلولی از طریق واکنش RT-PCR بررسی شد.

**نتایج:** یافته‌های ما نشانگر بیان متفاوت این RNA غیر کد کننده بلند در سلول‌های بنیادی جنینی (NT2) و دودمان‌های سلولی سرطانی است. علاوه بر بیان PSORS1C3 در سلول‌های پرتوان، بیان این ژن در تعداد محدودی از رده‌های سلولی جدا شده از تومورهای معده (AGS)، کارسینومای مثانه (563)، آدنوکارسینومای کولورکتال (Ht-29)، کارسینومای سلول‌های ھپاتوسیت (HepG2) و آدنوکارسینومای پروستات (PC3) تأیید شد.

**نتیجه‌گیری:** این پژوهش توانست برای اولین بار بیان این lncRNA را در سلول‌های سرطانی و سلول‌های بنیادی نشان دهد.

کلیدواژگان: PSORS1C3، OCT4، lncRNA، سرطان، سلول بنیادی

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۷، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۳، صفحات: ۱۰۵-۱۱۷

## مقدمه

نشان می‌دهد که بیشتر نواحی ژنوم پستانداران در جهت‌های سنس و آنتی‌سنس رونویسی می‌شود [۱-۳]. مطالعات تعیین توالی گسترده کتابخانه‌های cDNA نشان داد که کمتر از ۲

در سال‌های اخیر پیشرفت‌های به وجود آمده در تکنولوژی DNA و RNA ابزارهای قدرتمندی را برای مطالعه کل ژنوم فراهم کرده است. نتایج به دست آمده از این مطالعات

کنندگی (Enhancers) روی ژن‌های مجاور، تشکیل ساختارهای زیرسلولی، تولید RNA غیر کد کننده کوچک یا بلند دیگر [۱۴، ۱۵]، جذب و اتصال به mRNA ها و مهار عملکرد آنها در مراحل مختلف تکوین [۱۶، ۱۷] را نام برد. در نتیجه با توجه به نقش‌های مختلفی که RNA های غیر کد کننده بلند ایفا می‌کند، امروزه توجه ویژه‌ای به این دسته از رونوشت‌ها شده است و فرضیه غیرعملکردی بودن این رونوشت‌ها تقریباً به طور کامل رد شده است.

اخیراً چندین گروه روش‌هایی برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بدنی موشی و انسانی به سلول‌های بنیادی پرتوان القا (Induced Pluripotent Stem Cells: iPS) شده [۱۸-۲۱]. در سلول‌های انسانی، معمولاً استراتژی‌های بازبرنامه‌ریزی با معرفی ترکیبی از عامل‌های مرتبط با پرتوانی خصوصاً Sox2، Oct4 و Nanog یا Lin28، Oct-4، Sox2، c-Myc و Klf4 انجام می‌شود [۱۸، ۱۹]. بیان این عامل‌های مرتبط با پرتوانی برای حفظ شرایط پرتوانی سلول‌ها ضروری است و حاموش شدن بیان این ژن‌ها قدم مهمی در تمایز سلولی است [۲۲، ۲۳]. چندین مطالعه مجرزا نشان دهنده اهمیت نقش RNA های غیر کد کننده بلند در حفظ و تقویت پرتوانی سلول‌های بنیادین و همچنین اهمیت iRNA ها در دوران جنبی و تمایز سلول‌های بنیادین به سلول‌های طبیعی است [۲۴]. مطالعه‌ای که شیخ محمد و همکاران روی سلول‌های موشی انجام دادند، نشان داد که iRNA ها در تنظیم بیان دو عامل Oct-4 و Nanog نقش دارد، در نتیجه این احتمال وجود دارد که رونوشت‌های غیر کد کننده بلند خود به تنهایی یا از طریق میانجی‌هایی در تنظیم پرتوانی و خودبازسازی سلول‌ها نقش داشته باشد [۲۴].

نقش و جایگاه ژن Oct4 POU5F1، یک عامل رونویسی کلیدی متعلق به خانواده عامل‌های رونویسی POU-Pit-Oct-(Unc) در حفظ خصوصیت خودبازسازی و پرتوانی سلول‌های بنیادی پستانداران، محوری، کمنظیر و شاید بی‌نظیر است. همچنین بدون حضور این پروتئین در یک سلول امکان القای

درصد از کل توالی‌های ژنوم به RNA های بالغ کد کننده پروتئین رونویسی می‌شود و بخش اعظم از رونوشت‌ها به RNA های غیر کد کننده رونویسی می‌شود. همچنین نسبت DNA غیر کد شونده به DNA کد شونده به پروتئین دارای اهمیت خاصی است، زیرا این نسبت با درجه پیچیدگی یوکاریوت‌های عالی‌تر در ارتباط است [۴].

با وجود توجه روزافزون به اهمیت بیولوژیکی RNA های غیر کد کننده بلند (lncRNAs: lncRNAs)، تقریباً عملکرد نیمی از این مولکول‌ها به دلیل این‌که فاقد موتیف‌های ساختاری یا توالی‌هایی است که آن‌ها را به گروه‌های مختلف ncRNA های موجود نسبت دهد، ناشناخته مانده است [۵، ۶]. از این‌رو lncRNA ها شامل رونوشت‌هایی است که هیچ ORF (Open Reading Frame) مشخصی ندارد و خیلی سخت می‌توان از روی توالی‌های ژنوم آن‌ها را پیش‌بینی کرد [۷]. شواهدی وجود دارد که lncRNA ها به طور مستقیم در تنظیم بسیاری از فرآیندهای طبیعی سلول نقش دارد و کاهش بیان یا افزایش بیان آن‌ها با بسیاری از بیماری‌ها در ارتباط است. این یافته‌ها منجر به پیدایش این تفکر شده است که اهمیت lncRNA ها در تنظیم عملکردهای حیاتی سلول کمتر از پروتئین‌ها نیست.

گروه بزرگی از این رونوشت‌ها، RNA های غیر کد کننده بلند با طولی بلندتر از ۲۰۰ نوکلئوتید است که از سراسر ژنوم رونویسی می‌شود. در سال‌های اخیر این رونوشت‌ها مورد توجه بسیاری از محققین قرار گرفته است و مطالعات مختلف نشان می‌دهد که این رونوشت‌ها در مراحل مختلف بیان ژن دارای نقش‌های ناظارتی و عملکردی است. از جمله این عملکردها می‌توان دخالت در تغییرات اپی‌ژنتیکی در هسته [۸، ۹]، دخالت در پایداری mRNA ها در سیتوپلاسم، مداخله در فرآیند پیرایش (Splicing) [۱۰، ۱۱]، دخالت در فرآیند Remodeling (R)ونویسی از طریق کمبلکس‌های باز آرایشی [۱۲] یا دخالت مستقیم در فرآیند رونویسی از طریق فراخوان عامل‌های رونویسی ویژه [۱۰، ۱۳]، نقش تشدید

مخالف دودمان‌های سلولی سرطانی دارای کاربردهایی در زمینه سرطان و زیست‌شناسی سلول‌های بینادی باشد.

## مواد و روش‌ها

تهیه و کشت دودمان‌های سلولی NTeara2 (تراتوکارسینومای جنینی پرتون)، USSC (سلول‌های بنیادی استخراجی از خون بندناف)، Huvec (سلول‌های آندوتیال وریدی بندناف)، Fibroblast (فیروبلاست)، U-87MG (گلیوبلاستوما)، A172 (آستروسيتوما)، DAOY (مدولوبلاستوما)، A549 (گلیوبلاستوما)، AGS (آدنوکارسینومای معده)، Ht-29 (کارسینومای ریه)، 5637 (کارسینومای مثانه)، HEK293T (آدنوکارسینومای کولورکمال)، KYSE (کارسینومای مری)، LNCAP (کارسینومای پروسات)، SW480 (آدنوکارسینومای کولورکمال)، MIA-PaCa2 (کارسینومای پانکراس)، Huh-7 (کارسینومای کبد)، MCF-7 (آدنوکارسینومای پستان)، Hela (آدنوکارسینومای دهانه رحم)، HepG2 (کارسینومای سلول‌های هپاتوسیت)، PC3 (آدنوکارسینومای پروسات) و Skmel3 (ملانومای بدخیم) بر طبق شرایط عمومی کشت سلول‌های یوکاریوتی انجام پذیرفت.

دودمان سلولی NT2 را دکتر پیتر اندروز از دانشگاه بیرمنگام انگلستان اهدا کردند. دودمان سلول بنیادی USSC، فیروبلاست، A549 و HEK293T توسط دکتر سلیمانی از مرکز تحقیقات فن‌آوری بنیاده اهدا شد. دودمان‌های سلولی سرطانی PC3، SW480، LNCAP، MCF-7، Huh-7، MIA-Pa-Ca2، KYSE، Ht-29، A172 و HepG2 نیز از انسیتیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت اختصاصی برای دودمان‌های توموری مغز (U-87MG، 5637، KYSE، LNCAP، PC3)، (DAOY، 1321N1، A172

خصوصیات خودبازسازی و پرتوانی امکان‌پذیر نیست. از سوی دیگر، Oct4 می‌تواند در ارتباط با سایر عامل‌های تنظیمی در بیان ژن‌های درگیر در پرتوانی نقش داشته باشد. از تنظیم کننده‌های رایج که با همکاری Oct4 در فعل کردن ژن‌های هدف مؤثر است، می‌توان به Sox2 اشاره کرد که یک عامل رونویسی متعلق به خانواده ژن Sox (SRY box) است. کمپلکس Oct4-Sox2 به طور متقابل در تنظیم رونویسی Nanog، Sox2، Oct4 و تعدادی از ژن‌های مسئول پرتوانی در سلول‌های بنیادین جنینی نقش دارد [۲۵].

غیر کد کننده بلند PSORS1C3 RNA برای اولین بار در سال ۲۰۰۵ توسط هولم (Holm) و همکاران در ارتباط با بیماری پوستی پسوریازیس (Psoriasis) معرفی شد. این ژن دارای سه اگزون و دو ایترون است و یک جعبه توالی CAT با فاصله ۳۵ جفت باز در بالادست نقطه شروع اگزون ۱ وجود دارد. رونوشت RNA آن طبق این بررسی حدود ۶۰۰ باز است و بزرگترین ORF مشاهده شده در این رونوشت حاوی ۵۸ اسید آمینه است. این پروتئین پیشنهاد شده هیچ شباهتی با پروتئین‌ها و دومین‌های شناخته شده موجود ندارد. اما توالی آن در انسان و شامپانزه و خوک حفاظت شده است. در بررسی انجام شده به کمک روش RT-PCR بیان این ژن در بیماران مبتلا به پسوریازیس مشاهده شد. همچنین نتایج حاصل از نورترن بلاط در بافت‌های مختلفی از جمله قلب، مغز، جفت، ریه، کبد، ماهیچه صاف، کلیه، پانکراس، تیموس، پروسات، طحال، بیضه، تخمدان، کولون، لوکوسیت، و روده تأیید کننده بیان محدود آن در بافت‌های بیضه، پانکراس و ماهیچه صاف بود [۲۶].

با توجه به نقش حیاتی Oct4 در سلول‌های بنیادی و سرطانی به نظر می‌رسد که PSORS1C3 غیر کد کننده RNA هم در سلول‌های بنیادی و سرطانی دارای بیان و عملکرد باشد. از آن جایی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد امکان بیان آن در سلول‌های یاد شده صورت نگرفته است، به نظر می‌رسد که بررسی بیان این lncRNA در سلول‌های بنیادی و انسواع

## واکنش رونویسی معکوس

به منظور حذف هرگونه آلودگی احتمالی با DNA، میزان ۸ میکروگرم از RNA استخراج شده با ۰/۸ میکرولیتر از آنزیم DNase I (Takara، ژاپن) در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر مجاور شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد انکوبه شد. سپس با اضافه کردن یک میکرولیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۵۰ میلی مولار و انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه با آنزیم I DNase یک میکروگرم از RNA تیمار شده با cDNA و با استفاده از آنزیم Prime Script RT در حضور آغازگرهای oligodT (Primers) و هگزامرهای تصادفی مطابق با پروتکل شرکت سازنده (Takara، ژاپن) و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد ساخته شد.

## واکنش زنجیره‌ای پلیمراز

### طراحی آغازگرهای مناسب ژن PSORS1C3 و GAPDH

تمامی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم افزارهای perlprimer و Gene runner طراحی شد، سپس اختصاصی بودن الیگوهای طراحی شده برای ژن هدف به وسیله برنامه Blast آزمایش شد. این آغازگرها به گونه‌ای طراحی شد که حتی در صورت عدم تیمار RNA های استخراجی با DNAse I، توانایی تکثیر RNA ژنومی با اندازه مشابه را نداشته باشد. در این پژوهش از ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. توالی‌های مورد نیاز برای ژن PSORS1C3 با شماره بانک ژنی 1 NR\_026816.1 و NM\_001256799.2 GAPDH با شماره دسترسی بانک ژنی 2 آورده به دست آمد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

دو دمان‌های سلولی HepG2، HEK293T، Huh-7، NT2، MCF-7، Fibroblast، Huvec، MIA-PaCa2 و Hela محیط DMEM High Glucose و برای دو دمان سلولی MCF-7، Ht-29، Hela محیط USSC و برای دو دمان SKMEL3 هم محیط کشت استفاده شد. در همه موارد محیط کشت سلول‌های مورد استفاده در این پژوهش با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) و ۱ درصد پنی‌سیلین/استرپتومایسین (Invitrogen) (آمریکا) تکمیل شد و سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد CO<sub>2</sub> ۵ درصد کشت داده شدند.

## استخراج RNA

RNA کل سلول‌ها با استفاده از ترایزول (Invitrogen) (آمریکا) استخراج شد. به صورت خلاصه ابتدا به سلول‌های کشت داده شده یک میلی لیتر ترایزول اضافه شد و سپس با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم و انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی گراد، مخلوط حاصل در دور ۱۲۰۰۰ g و برای ۲۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. فاز رویی تشکیل شده حاوی RNA به میکروتیوب جدید منتقل و هم حجم آن ایزوپروپانل اضافه شد. نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه انکوبه شدن در یخ به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۱۲۰۰۰ g سانتریفیوژ شد. به رسوب حاصل ۱ میلی لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و در دور ۷۵۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در انتها پس از خشک شدن نسبی، رسوب حاصل در آب حل شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی گراد انکوبه شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگاراز ۱ درصد و مشاهده باندهای ۲۸S و ۱۸S مربوط به RNA ریبوزومی بررسی شد. کمیت RNA استخراج شده نیز با استفاده از میزان جذب آن در طول موج ۲۶۰ نانومتر توسط اسپکتوفوتومتر بررسی شد و RNA ها تا زمان استفاده در برودت -۸۰ درجه سانتی گراد نگهداری شد.

جدول ۱ توالی آغازگرها و اندازه محصول تکثیری آنها

طول قطعه حاصل از تکثیر	توالی	آغازگر	ژن
۵۹۳ جفت باز	CAACCCACTCTGTGCTATGAC	F	PSORS1C3
	GATACTTCACACACACCTTATTATTAC	R	
۱۶۱ جفت باز	GTGAACCAGAGAAGTATGACAAC	F	GAPDH
	CATGAGTCCTCCACGATACC	R	

قطعه تخلیص شده در ناقل pTZ57R/T از کیت کلونینگ شرکت Fermentas (لیتوانی) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کلون شد. مراحل کلونسازی به طور خلاصه شامل اتصال محصول خالص شده قطعه PSORS1C3 به ناقل pTZ57R/T [Transformation] انتقال ناقل [مرحله ترانسفورماتیون (Transformation)] نوترکیب به باکتری‌های مستعد و تکثیر باکتری حاوی ژنوم نوترکیب روی پلیت حاوی محیط کشت آنتی‌بیوتیکدار پنی‌سیلین به مدت یک شب در انکوپاتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد بود. سپس روی کلونی‌های رشد کرده، کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل گذاشته شد و کلونی‌هایی که حاوی قطعه تکثیر شده بود، در محیط کشت مایع همراه با آنتی‌بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و لرزش ۲۵۰ دور به مدت یک شب کشت داده شد. سپس با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت Gene all (کره جنوبی) و بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده پلاسمید نوترکیب استخراج و برای انجام تعیین توالی به شرکت Macrogen (کره جنوبی) فرستاده شد.

## نتایج

با بررسی بیوانفورماتیکی نواحی کروموزومی اطراف ژن RNA غیر کد کننده در بالادست این ژن به طول ۶۰۰ جفت باز مشاهده شد که به علت همبستگی این ناحیه با بیماری پسوریازیس به نام PSORS1C3 معرفی شده بود. این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ در ناحیه ۲۱.۳۳ واقع شده است (شکل ۱).

در واکنش PCR برای انجام چندین واکنش به صورت موازی و برای کاهش خطای احتمالی پیپت کردن، ابتدا یک مخلوط اصلی (Master Mix) کلی شامل آب، بافر، dNTP ها، آغازگرها و آنزیم *Taq polymerase* به ازای تعداد واکنش‌ها و یک نمونه اضافی درست شد و پس از تقسیم در تیوب‌های جداگانه به هر تیوب cDNA اختصاصی هر سلول اضافه شد و واکنش زنجیره‌ای پلیمراز با شرایط زیر پس از تنظیم اولیه دما و چرخه برای کلیه سلول‌ها انجام شد.

۱- فعال شدن پلیمراز و واسرشتگی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه  
۲- واسرشتگی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه

۳- اتصال آغازگرها در دمای ۶۱ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه  
۴- طویل شدن محصول در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۲ ثانیه

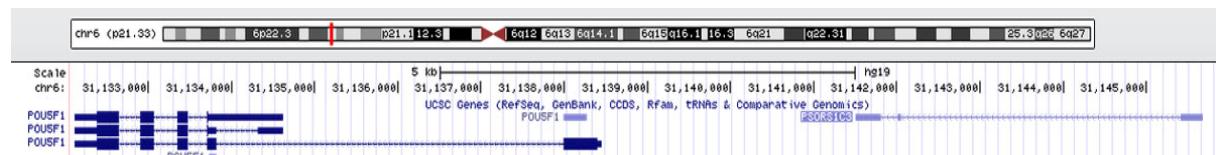
۵- تکرار مراحل ۲-۴ برای ژن ۳۵ بار و برای ۲۵ GAPDH

۶- طویل شدن نهایی محصول در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه

## کلونسازی قطعه تکثیر شده ژن ۳

به منظور تعیین توالی قطعه تکثیر شده با اندازه مورد انتظار ۵۹۳ جفت بازی ژن PSORS1C3، این قطعه از روی ژل آگاراز توسط کیت شرکت Gene all (کره جنوبی) تخلیص شد. سپس

## تأیید بیان یک RNA غیر کد کننده بلند در بالادست ژن Oct4



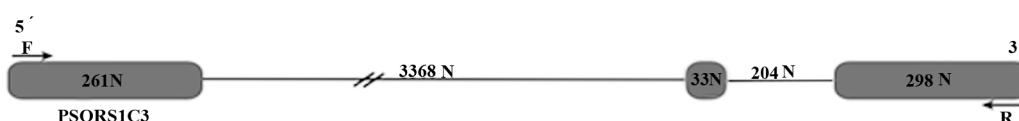
شکل ۱ موقعیت کروموزومی RNA غیر کد کننده PSORS1C3 در بالادست ژن Oct4

گونه‌ای طراحی شده بود که در ضمن تکثیر ژن وجود واریانت‌های احتمالی آن را نیز بتواند شناسایی کند. با این وجود به دلیل طراحی آغازگرها روی اگزون‌های مختلف، این آغازگرها قادر به تکثیر DNA ژنومی PSORS1C3 نبود. برای تکثیر قطعات مربوط به ژن‌های PSORS1C3 و GAPDH با توجه به  $T_m$  آغازگرها، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها در PCR انتخاب شد. تعداد چرخه مناسب برای تکثیر ژن PSORS1C3، GAPDH و برای ژن PSORS1C3 ۳۵ چرخه تعیین شد. تعداد چرخه انتخاب شده به گونه‌ای تعیین شد که هم بیان پایین در برخی نمونه‌هایی که بیان اندرکی دارد تشخیص داده شود و هم تکثیر ژن در نمونه‌هایی که بیان بالای دارد، وارد فاز کفه (Plateau) نشده و در فاز نمایی (Exponential) باقی بماند.

به منظور بررسی احتمال بیان ژن PSORS1C3 در سلول‌های بنیادی و سرطانی، ۲۳ رده سلولی انتخاب و کشت داده شد؛ سپس RNA تام از این سلول‌ها استخراج و کمیت آن به وسیله جذب نوری در طول موج ۲۶۰ نانومتر و کیفیت آن به کمک الکتروفورز روی ژل آگارز بررسی شد (نتایج نشان داده نشده است). وجود باندهای مشخص ۱۸S، ۲۸S و ۵S روی ژل آگارز نشان دهنده سالم بودن RNA استخراجی از دودمان‌های سلولی مورد بررسی بود.

## تأیید بیان PSORS1C3 روی دودمان‌های سلولی بنیادی و سلول‌های سرطانی

موقعیت آغازگرها طراحی شده برای شناسایی بیان ژن PSORS1C3 در شکل ۲ نشان داده شده است. آغازگرها به



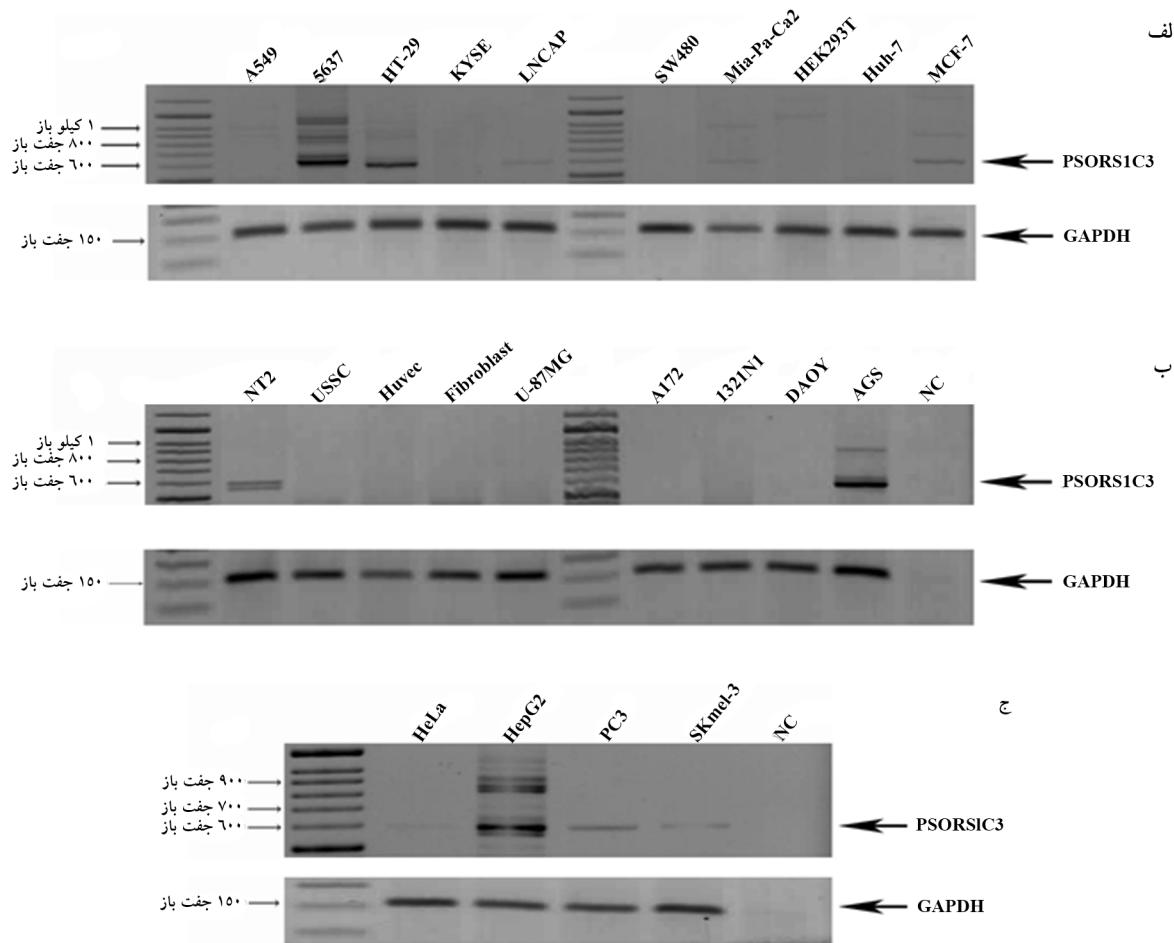
شکل ۲ شکل شماتیک از نواحی اگزون-ایترونی ژن PSORS1C3 و جایگاه آغازگرها طراحی شده برای این ژن

سلول‌های سرطانی جدا شده از بافت‌های معده، مثانه، کولورکتال، کبد، پستان و پروستات بیان دارد. هیچ بیانی در ۳۵ چرخه PCR برای این ژن در سلول‌های سرطانی به دست آمده از بافت‌های مغزی (A172)، U-87MG، A549، KYSE (DAOY)، جفت (Huvec)، ریه (A549)، مری (MIA-PaCa2)، کلیه (HEK293T)، پوست پانکراس (SKMEL-3) و دهانه رحم (Hela) مشاهده نشد. همچنین

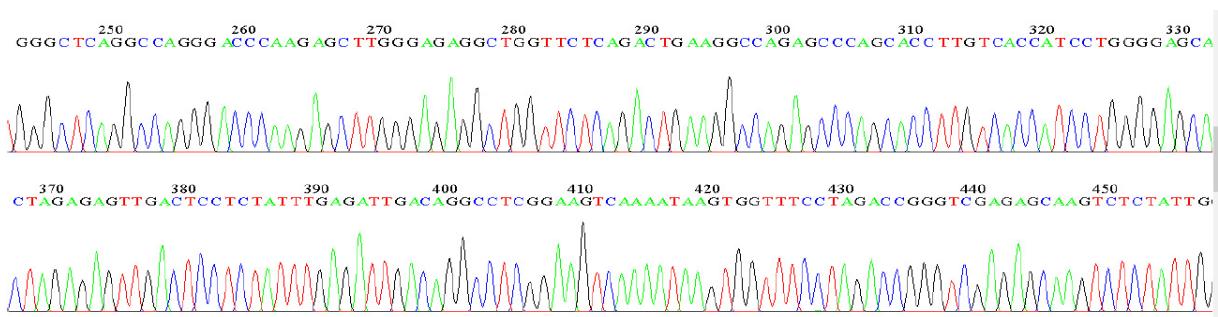
نتایج حاصل از RT-PCR برای شناسایی بیان ژن PSORS1C3 روی ۲۳ دودمان سلولی مورد بررسی در شکل ۳-الف، ۳-ب و ۳-ج نشان داده شده است. نتایج به دست آمده برای اولین بار بیان این ژن را در سلول‌های بنیادی جنینی NT2 تأیید کرد. علاوه بر این، این IncRNA تنها در ۶ دودمان سلولی سرطانی از میان ۲۳ دودمان سرطانی با منشأ بافتی مختلف دارای بیان بود. به عبارت دیگر؛ این ژن تنها در

شرایط PCR یکسان با PSORS1C3 به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

دودمان سلولی طبیعی فیبروبلاست هم هیچ بیانی را نشان نداد. ژن GAPDH هم برای کلیه دودمان‌های سلولی و با



شکل ۳ ژل آگارز ۲ درصد رنگ‌آمیزی شده با اتیدیوم برومايد، قطعه ۵۹۳ جفت بازی تکثیر ژن PSORS1C3 با استفاده از آغازگرهای اختصاصی را نشان می‌دهد.



شکل ۴ تعیین توالی قطعه تکثیر شده در PCR که تکثیر اختصاصی ژن PSORS1C3 در واکنش RT-PCR را اثبات نمود.

## تأیید بیان یک RNA غیر کد کننده بلند در بالادست ژن Oct4

زیستی بالقوه برای تشخیص، دسته‌بندی، پیش‌آگهی و درمان انواع سرطان‌ها استفاده نمود [۲۷]. OCT4 با نقش محوری‌اش در تنظیم شبکه‌های خودبازسازی و پرتوانی سلولی در سلول‌های بنیادی جینی (Embryonic Stem: ES) و کارسینومای رویانی (Embryonic Carcinoma: EC) شناخته می‌شود. علاوه بر سلول‌های رویانی، سلول‌های زایا و تومورهای سلول‌های زایا، بیان Oct4 در چندین نوع سلول بزرگ‌سال بدنی [۲۸] نیز به همان میزان تومورهای اولیه و دودمان‌های سلولی سرطانی مختلف گزارش شده است [۲۹، ۳۰]. همچنین در سرطان‌های مثانه و پستان به میزان زیادی بیان می‌شود [۳۱]. یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که این lncRNA در سلول‌های پرتوان NT2 و سلول سرطانی مثانه ۵۶۳۷ هم‌بیان می‌شود و این هم‌بیانی با عامل OCT4 می‌تواند نشان دهنده این باشد که احتمالاً RNA غیر کد کننده بلند PSORS1C3 دارای نقش تنظیمی بر بیان Oct4 است. البته این نتیجه‌گیری نیازمند تحقیقات بیشتر و بررسی‌های عملکردی از طریق بیش‌بیان یا مهار این ژن است.

با توجه به اهمیت OCT4 در بازبرنامه‌نویسی سلول‌های بنیادی، تمایز و تنظیم عامل‌های پرتوانی و خودبازسازی این سلول‌ها و همچنین با توجه به فرضیه سلول‌های بنیادی سرطانی، عواملی که به مهار فرآیند تمایز یا به تکثیر و خودبازسازی کنترل نشده سلول‌های بنیادی بافتی منجر شود از جمله مهم‌ترین عامل‌های دخیل در فرآیند سرطان‌زایی بهشمار می‌رود [۳۳]. از آنجایی که lncRNA‌ها رونوشت‌هایی هستند که در فرآیندهای مهم زیستی از جمله تنظیم رونویسی ژن‌های (Imprinting)، غیر فعال‌سازی کروموزوم X، نقش‌بست (Compartments) ژنومی، حفظ تمامیت حیطه‌بندهای (Zinc-finger proteins)، پردازش ncRNA‌های کوچک و همچنین در ارتباط با بسیاری از بیماری‌های انسانی نقش ایفا می‌کنند، شناسایی و بررسی عملکرد آن‌ها روی عامل‌های پرتوانی سلول‌های بنیادی از جمله Oct4 به درک بهتر ما از مکانیسم‌های دخیل در پرتوانی سلول کمک می‌کند.

تعیین توالی پلاسمید نوترکیب حاوی قطعه تکثیر شده در PCR نشان دهنده تکثیر اختصاصی این ژن با آغازگرهای مورد استفاده در واکنش PCR است و تأییدی بر بیان این ژن در سلول‌های سرطانی و بنیادی بود (شکل ۴).

## بحث

RNA‌های غیر کد کننده بلند گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان است که در تنظیم بسیاری از پیچیدگی‌های موجودات دخالت دارد و بسیاری از فرآیندهای مختلف زیستی از جمله پرتوانی سلول‌های بنیادی و نورون‌زایی را کنترل می‌کند. همچنین اخیراً توجه زیادی به نقش این RNA‌ها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری‌های عصبی شده است. مطالعات متعددی نشان دهنده نقش و اهمیت ویژه این گروه جدید از مولکول‌ها در تنظیم بسیاری از فرآیندهای حیاتی سلول است [۲۶].

نتایج مطالعات حاضر در دودمان‌های متنوع سلولی نشان‌گر تفاوت بیان این RNA در سلول‌های پرتوان و غیر پرتوان PSORS1C3 است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که در بالادست عامل کلیدی پرتوانی سلول، Oct4، قرار گرفته در دودمان سلولی بنیادی ۲ و ۶ دودمان سلولی سرطانی ناشی شده از تومورهای معده (AGS)، مثانه (5637)، کولون (Ht-29)، کبد (HepG2)، پستان (MCF-7) و پروسات (PC3) بیان می‌شود. تاکنون هیچ گزارش قبلی مبنی بر بیان این ژن در سلول‌های بنیادی و سرطانی وجود ندارد. در مقاله اولیه که وجود این ژن را گزارش کرده بود [۲۶]، بیان ژن تنها در بافت‌های بیضه، پانکراس و ماهیچه صاف به کمک روش نورترن بلاست تأیید شده بود. یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که این lncRNA به طور ویژه و در سلول‌های سرطانی خاصی بیان می‌شود. از سویی دیگر؛ یافته‌های جدید نشان دهنده آن است که سطح بیان و الگوی توزیع بافتی RNA‌های غیر کد کننده بلند متفاوت است و از الگوی بیانی مختص به بافت توموری این RNA‌ها می‌توان به عنوان نشانگرهای

پژوهش و کاربرد سلول‌های بنیادی تشرک و قدردانی به عمل آورده می‌شود.

## تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی ستاد توسعه

## منابع

- [1] Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasawa Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schönbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusic V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M, Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y; FANTOM Consortium; RIKEN Genome Exploration Research Group and Genome Science Group (Genome Network Project Core Group. The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* 2005; 309(5740): 1559-63.
- [2] Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A,

- Bernstein BE, van Oudenaarden A, Regev A, Lander ES, Rinn JL. Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106(28): 11667-72.
- [3] Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458(7235): 223-7.
- [4] Mattick JS. RNA regulation: a new genetics? *Nat Rev Genet* 2004; 5(4): 316-23.
- [5] Perkins DO, Jeffries C, Sullivan P. Expanding the 'central dogma': the regulatory role of nonprotein coding genes and implications for the genetic liability to schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2005; 10(1): 69-78.
- [6] Ji P, Diederichs S, Wang W, Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22(39): 8031-41.
- [7] Hüttenhofer A, Schattner P, Polacek N. Non-coding RNAs: hope or hype? *Trends Genet* 2005; 21(5): 289-97.
- [8] Lee JT. Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. *Genes Dev* 2009; 23(16): 1831-42.
- [9] Rinn JL, Chang HY. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu Rev Biochem* 2012; 81: 145-66.
- [10] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* 2010; 39(6): 925-38.
- [11] Geisler S, Lojek L, Khalil AM, Baker KE, Coller J. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. *Mol Cell* 2012; 45(3): 279-91.
- [12] Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 2010; 329(5992): 689-93.
- [13] Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY. Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* 2007; 129(7): 1311-23.
- [14] Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007; 13(3): 313-6.
- [15] Wilusz JE, Freier SM, Spector DL. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell* 2008; 135(5): 919-32.
- [16] Wang Y, Xu Z, Jiang J, Xu C, Kang J, Xiao L, Wu M, Xiong J, Guo X, Liu H. Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem

- cell self-renewal. *Dev Cell* 2013; 25(1): 69-80.
- [17] Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, Tramontano A, Bozzoni I. A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 2011; 147(2): 358-69.
- [18] Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 2007; 318(5858): 1917-20.
- [19] Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 2007; 131(5): 861-72.
- [20] Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S. Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature* 2007; 448(7151): 313-7.
- [21] Park IH, Arora N, Huo H, Maherali N, Ahfeldt T, Shimamura A, Lensch MW, Cowan C, Hochedlinger K, Daley GQ. Disease-specific induced pluripotent stem cells. *Cell* 2008; 134(5): 877-86.
- [22] Reményi A, Lins K, Nissen LJ, Reinbold R, Schöler HR, Wilmanns M. Crystal structure of a POU/HMG/DNA ternary complex suggests differential assembly of Oct4 and Sox2 on two enhancers. *Genes Dev* 2003; 17(16): 2048-59.
- [23] Santagata S, Ligon KL, Hornick JL. Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* 2007; 31(6): 836-45.
- [24] Sheik Mohamed J, Gaughwin PM, Lim B, Robson P, Lipovich L. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA* 2010; 16(2): 324-37.
- [25] Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* 2000; 24(4): 372-6.
- [26] Holm SJ, Sánchez F, Carlén LM, Mallbris L, Stähle M, O'Brien KP. HLA-Cw\*0602 associates more strongly to psoriasis in the Swedish population than variants of the novel 6p21.3 gene PSORS1C3. *Acta Derm Venereol* 2005; 85(1): 2-8.
- [27] Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071-6.
- [28] Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* 2006; 281(44): 33554-65.
- [29] Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis* 2005; 26(2): 495-502.
- [30] Jones TD, Ulbright TM, Eble JN, Baldridge LA, Cheng L. OCT4 staining in testicular tumors: a sensitive and specific marker for

تأیید بیان یک RNA غیر کد کننده بلند در بالادست ژن Oct4

- seminoma and embryonal carcinoma. Am J Surg Pathol 2004; 28(7): 935-40.
- [31] Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaeef SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. Int J Cancer 2007; 120(7): 1598-602.
- [32] Ezeh UI, Turek PJ, Reijo RA, Clark AT. Human embryonic stem cell genes OCT4, NANOG, STELLAR, and GDF3 are expressed in both seminoma and breast carcinoma. Cancer 2005; 104(10): 2255-65.
- [33] Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. Annu Rev Cell Dev Biol 2007; 23: 675-99.