

Evaluation of the HSV-1 LAT Transcript Expression Effects on TGF- β Signaling Pathway in Human Neuroblastoma Cells

Ehsan Arefian¹, Taravat Bamdad^{2*}, Masoud Soleimani³, Amir Atashi⁴, Parviz Fallah⁵

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

2- Associated Professor, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3- Associated Professor, Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4- Ph.D., Department of Stem Cell Biology, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

5- M.Sc., Department of Molecular Biology and Genetic Engineering, Stem Cell Technology Research Center, Tehran, Iran

**Corresponding Address: P.O.Code: 1411713116, Department of Virology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: bamdad_t@modares.ac.ir*

Received: 12/Oct/2011, Accepted: 20/Dec/2011

Abstract

Objective: Infection with herpes simplex virus type 1 induces viral latency in neuron trigeminal ganglions. The late associated transcript (LAT) is uniquely expressed in infected neural cells, however no coding protein associated with these transcripts has been identified in infected cells. It has been shown that six microRNAs transcribed from LAT have the capabilities to affect the cell signaling pathways, thus interfering in pathways such as those of cell differentiation and proliferation. Transforming growth factor beta (TGF- β) pathway is a critical pathway among cell signaling circuits. The Smad4 protein, as an important member of the TGF- β signaling pathway, mediates the connection between membrane receptors, cytoplasmic kinases, and nuclear transcription factors.

Methods: This study bioinformatically and experimentally evaluated LAT microRNA expression and assessed microRNA targeting of Smad4 transcripts in human neuroblastoma cells by using real-time PCR.

Results: Analysis of two different softwares results showed that the Smad4 gene was targeted by LAT-derived microRNAs at multiple sites. Over-expression of LAT microRNAs in BE2(c) cells caused reduction in Smad4 transcripts.

Conclusion: The results of bioinformatical analysis with relative quantification of Smad4 transcripts and its downstream-related genes such as cyclinD, CDK2, and Myc showed that the LAT transcript could control Smad4 expression.

Keywords: Herpes Simplex Virus-1, Latency Associated Transcript, MicroRNAs, Smad4 Protein

Modares Journal of Medical Sciences: *Pathobiology*, Vol 14, No 4, Winter 2012, Pages: 51-62

بررسی تأثیر بیان رونوشت وابسته به نهفتگی ویروس هرپس سیمپلکس تیپ ۱ بر مسیر $TGF-\beta$ در سلول‌های نوروبلاستومای انسانی

احسان عارفیان^۱، طراوت بامداد^{۲*}، مسعود سلیمانی^۳، امیر آتشی^۴، پرویز فلاح^۵

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه ویروس‌شناسی پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- دانشیار، گروه خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۴- دکتری تخصصی، گروه بیولوژی سلول‌های بنیادی، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یافته، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد، گروه بیولوژی مولکولی و مهندسی ژنتیک، مرکز تحقیقات فناوری بن‌یافته، تهران، ایران

آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی، گروه ویروس‌شناسی

Email: bamdad_t@modares.ac.ir

پذیرش مقاله: ۹۰/۰۹/۳۰

دریافت مقاله: ۹۰/۰۷/۲۱

چکیده

هدف: ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک پس از آلوده کردن میزبان به صورت طبیعی در گانگلیون نورون تریژمینال به صورت خفته در می‌آید. در این وضعیت تنها رونوشتی که از ویروس در سلول قابل تشخیص است رونوشت وابسته به نهفتگی (LAT) است که این رونوشت $microRNA$ هایی را تولید می‌کند که قادر است مسیرهای پیام‌رسانی در سلول را دستخوش تغییر نماید. یکی از مسیرهای کلیدی پیام‌رسانی سلول مسیر فاکتور رشد تومور ($TGF-\beta$) است. در این مسیر $Smad4$ به عنوان یک پروتئین مهم رابط بین گیرنده‌های غشایی کینازهای سیتوپلاسمی و فاکتورهای رونویسی هسته‌ای است. این تحقیق با بررسی بیان $microRNA$ های ویروسی در سلول میزبان هدف‌گیری $Smad4$ با این $microRNA$ ها را بررسی نموده است.

مواد و روش‌ها: پس از ترانسفکت $Smad4$ به داخل سلول‌های BE-2(c)، بیان $microRNA$ های وابسته به LAT در این سلول‌ها به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (Real-Time PCR) ارزیابی شد و به کمک روش‌های مبتنی بر بیوانفورماتیک امکان هدف‌گیری $Smad4$ با این $microRNA$ ها نیز بررسی و در ادامه بیان $Smad4$ و ژن‌های پایین‌دست آن به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی مطالعه شد.

نتایج: شواهد و نتایج نشان می‌دهد که رونوشت LAT در سلول میزبان تولید $microRNA$ هایی می‌کند که تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیکی دو الگوریتم متفاوت گواهی بر هدف‌گیری $Smad4$ توسط این $microRNA$ ها می‌دهد این در حالی است که نتایج واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی نیز تأییدی بر این ادعا است.

نتیجه‌گیری: نتایج مبتنی بر تجزیه و تحلیل‌های بیوانفورماتیک و بررسی بیان رونوشت $Smad4$ و پروتئین‌های پایین‌دستش همانند $CyclinD$ ، $CDK2$ و Myc نشان دهنده کنترل بیان این ژن توسط $microRNA$ های ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک است.

کلیدواژگان: ویروس هرپس سیمپلکس تیپ یک، رونوشت وابسته به نهفتگی، $microRNA$ ، پروتئین $Smad4$

مجله علوم پزشکی مدرس: آسیب‌شناسی زیستی، دوره ۱۴، شماره ۴، زمستان ۱۳۹۰، صفحات: ۵۱-۶۲

مقدمه

Simplex Virus Type 1: HSV-1 در انسان و حیوانات

مدل آزمایشگاهی به صورت خفته در می‌آید. رونوشت وابسته

عفونت هرپس سیمپلکس ویروس تیپ یک (Herpes)

به نهفتگی (Latency Associated Transcript: LAT) ویروس HSV-1 طی دوره خفتگی ویروس به صورت گسترده‌ای در سلول‌های نورونی بیان می‌شود و در اعمال خفتگی ویروس و عود مجدد آن ایفای نقش ویژه‌ای می‌کند. از سویی دیگر تحقیقات گسترده قبلی به صورت وسیعی نشان داده‌اند که LAT بر سرنوشت سلول‌های بیان کننده آن مؤثر بوده و مسیرهای ژنی گوناگون، از قبیل مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی (Apoptosis) را تحت تأثیر قرار می‌دهد. سازه ژنی حامل ژن LAT که به صورت پایدار در رده سلول نورونی بیان می‌شود، همانندسازی ویروس را مهار کرده و میزان mRNA ژن‌های فوری (Immediate Early Genes) ویروس را کاهش می‌دهد [۱، ۲]. ویروس هرپسی که در ناحیه ژن LAT دارای جهش شده قادر است در گانگلیون تریژمینال (Trigeminal Ganglion) خرگوش به صورت گسترده‌ای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی را اعمال کند؛ این در حالی است که ویروس وحشی مرگ برنامه‌ریزی شده را در سلول میزبان مهار می‌کند [۳]. مطالعات دیگر نشان داده است که فعالیت کاسپازها در سلول‌های نوروبلاستومای موشی (Neuro-2A) که توسط ویروس‌هایی با LAT جهش یافته، آلوده شده‌اند افزایش می‌یابد در حالی که در سلول‌های آلوده شده توسط ویروس‌های وحشی کاهش نشان می‌دهد. در سلول‌های نوروبلاستومای موشی ژن LAT قادر است رونوشت‌های ژن Bcl-x(L) (B-cell lymphoma-extra Large) را محدود و فعالیت آنتی‌آپتوتیک (Antiapoptotic) این ژن را مهار کند [۴]. طی تحقیقات دیگر مشخص شده که رونوشت LAT ویروس قادر است با ممانعت از فعالیت کاسپاز-۸ و کاسپاز-۳ و قطعه قطعه شدن ژنوم از اعمال مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی جلوگیری به عمل آورد [۵، ۶].

رونوشت LAT به عنوان یک RNA تنظیم کننده که پروتئینی را بیان نمی‌کند با تولید چند microRNA و sRNA (Small RNA) قادر است رفتار سلول‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. سلول‌های نوروبلاستومای موشی که LAT در آن‌ها بیان می‌شود به واسطه sRNA1 و sRNA2 تولید شده توسط

LAT از مرگ برنامه‌ریزی شده سلول‌ها جلوگیری می‌نماید. بیان پروتئین ICP0 (Infected Cell Protein 0) ویروس که یک پروتئین فعال کننده رونویسی (Transcriptional Activator) است و در دسته پروتئین‌های فوری ویروس قرار می‌گیرد، تحت تأثیر miR-H2-3p تولید شده توسط LAT کاهش می‌یابد که این منتج به خفتگی ویروس در سلول عصبی می‌شود [۷-۹]. به نظر می‌رسد تأثیرات microRNAهای ویروسی در سلول‌های میزبانی به شدت گسترده‌تر از آن چیزی است که تاکنون در مورد آن مطالعه شده است.

پروتئین Smad4 به عنوان یکی از اعضای خانواده Smad در پاسخ به پیام‌های فاکتور رشد تومور (Tumor Growth Factor- β : TGF- β) توسط گیرنده‌های سرین-تروئونین کیناز متصل به غشای سلولی، فسفریله شده و فعال می‌شود. این پروتئین‌ها به صورت ترکیبات همسان (Homomeric) یا غیرهمسان (Heteromeric) با دیگر اعضای خانواده Smad وارد هسته شده و با شناسایی توالی‌های تکراری ۸ تایی به DNA متصل می‌شود و بیان ژن‌های هدفشان را تنظیم می‌کند. پروتئین Smad4 به عنوان یک بازوی عملکردی برای مسیر TGF- β در تمایز سلول‌های SH-SY5Y به سمت سلول‌های نورونی ترشح کننده تیروزین هیدروکسیلاز ایفای نقش می‌کند [۱۰]. از سویی دیگر پروتئین Smad4 با مهار پروتئین CRMP2 (Collapsin Response Mediator Protein 2) فرایند گسترش و تشکیل نورون‌های دوقطبی از نورون‌های چند قطبی را تحت کنترل قرار می‌دهد [۱۱]. مطالعات نشان داده است که مسیر پیام‌رسانی BMP (Bone Morphogenetic Proteins) با واسطه Smad4 قادر است که تکثیر و خفتگی سلول‌های بنیادی نورونی و فرایند نورون‌زایی را در هیپوکمپ (Hippocampus) تنظیم نماید [۱۲].

از آن‌جا که مطالعه نقش LAT بر رفتارهای سلولی صرفاً به حوزه خودکشی سلولی و مکانیسم‌های خفتگی محدود شده این پژوهش در نظر دارد که آثار رونوشت LAT به ویژه microRNAهای حاصل از LAT را بر پروتئین‌های سلولی

کار هر آزمون دوبار تکرار شد.

ارزیابی بیان microRNA های تولید شده توسط LAT

بیان microRNA مرتبط با LAT در سلول BE-2(c) ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن پلاسمیدهای مربوط بررسی شد. دستورالعمل استخراج تمامی RNA های سلولی به نحوی تغییر شکل یافت که با افزایش انکوباسیون های سرد (۲۰- درجه سانتی گراد) و زمان و دور سانتریفوژها، microRNA های سلولی تغلیظ شود. پس از استخراج کل RNA سلولی کیفیت RNA استخراج شده و میزان غلظت آن به کمک الکتروفورز RNA و اسپکتروفتومتری آن مشخص شد.

به کمک کیت 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies, Stratagene Products Division, USA). به انتهای ۳' هر RNA یک دم پلی A متصل شد. با این کار طول microRNA به منظور ارزیابی های بعدی طویل شد. سپس با استفاده از یک آغازگر (Primer) سنتز شده توسط شرکت سازنده و منطبق با دم پلی Aی هر RNA طی واکنش رونویسی معکوس بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده cDNA کلی ساخته شد. مراحل مختصر برنامه بدین شرح بود که در گام اول میزان ۱ میکروگرم از RNA برای واکنش پلی آدنیلایسیون (Polyadenylation) استفاده شد. سپس با استفاده از یک آغازگر مکمل ناحیه پلی آدنیل شده، cDNA مورد نظر ساخته شد. برای ارزیابی هر microRNA (mir-H2, mir-H2*, mir-H3, mir-H4, mir-H4*, mir-H5, mir-H7, miRH8) براساس دستورالعمل کیت طراحی و سنتز شد (جدول ۱ الف). آغازگر آنتی سنس (Antisense) به صورت ثابت برای تمامی microRNA ها توسط شرکت سازنده تهیه شده بود. طی یک واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی تناسبی مبتنی بر رنگ سایبر گرین (Sybr Green Stain)، میزان بیان هر microRNA براساس دستورالعمل High specificity miRNA QPCR (Agilent Technologies, Stratagene) core reagent kit

مورد بررسی قرار دهد. یکی از این پروتئین ها، Smad4 است که براساس تحقیقات انجام گرفته در این مطالعه نحوه تأثیرپذیری آن توسط LAT گزارش می شود.

مواد و روش ها

سلول و پلاسمید

سلول SK-N-BE2(c) که یک سلول با منشأ نوروبلاستوما ی انسانی است در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد و میزان CO₂ ۵ درصد و در اتمسفر مرطوب در محیط کشت (Gibco, USA) Dulbecco's modified Eagle's medium. تقویت شده توسط سرم جنین گاوی ۱۰ درصد و پنی سیلین (Penicillin) ۱۰۰ واحد در میلی لیتر و استرپتومایسین (Streptomycin) ۵۰ میکروگرم در میلی لیتر کشت داده شد.

قطعه رونوشت LAT که در واقع برشی از ژنوم HSV-1 با طول ۸/۳ کیلو باز با آنزیم های EcoRV-BamHI است در ناقل pcDNA3.1 کلون شده است. این ناقل تحت عنوان ناقل pcDNA3-LAT که در ادامه با نام LAT از آن یاد خواهد شد توسط آقای دکتر بریان کولن (Cullen) از دانشگاه دوک در اختیار قرار گرفت [۷]. در این آزمون از ناقل pcDNA3.1 فاقد قطعه مورد نظر و با نام (cont-vec) به عنوان کنترل منفی استفاده شد. ناقل های مورد نظر در باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) و سویه Dh5 α ترانسفورم شده و در محیط کشت محتوی دو آنتی بیوتیک زئوسین (Zeocin) و آمپی سیلین (Ampicillin) کشت داده شد. پلاسمید نو ترکیب LAT استخراج شده و با هضم آنزیمی BamHI تأیید شد (اطلاعات مربوط نشان داده نشده است).

سلول BE-2(c) در پلیت شش خانه به میزان 1×10^6 سلول در هر چاهک کشت داده شد. پس از طی زمانی حدود ۲۴ ساعت کشت سلول با تراکم سلولی ۸۰ درصد آماده ترانسفکشن پلاسمیدها بود که به کمک لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Lipofectamine 2000) (Invitrogen, USA) و براساس دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. برای بررسی تکرارپذیری

Products Division, USA) تعیین شد. در نهایت نتایج هر آزمون به واسطه میزان بیان U6-snoRNA (رونوشت یک ژن خانه‌نگهدار است و با طولی کوتاه حدود ۷۰-۸۰ جفت‌باز در

تمامی وضعیت‌های سلولی یکسان بیان می‌شود). به‌عنوان یک کنترل داخلی یکسان‌سازی و به کمک روش دلتا دلتا سی تی ($\Delta\Delta CT$) تجزیه و تحلیل و گزارش شد.

جدول ۱ الف) بیان LAT و microRNAهای تولیدی آن به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی بررسی شد. به‌منظور واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی این microRNAها برای هر یک، آغازگر اختصاصی منطبق با توالی خود microRNA طراحی شد که در جدول نشان داده شده است. ب) برای بررسی بیان ژن‌های سلولی به کمک واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی برای هر یک از ژن‌ها آغازگرهای اختصاصی آن ژن در تقاطع نواحی کد کننده (اگزونی) طراحی شد

الف: آغازگرهای اختصاصی برای تشخیص microRNAها		ب: آغازگرهای اختصاصی برای بررسی بیان ژن	
نام	توالی		
miR-H2*	TCGCACGCGCCCGGC	Hprt-1-F	CCTGCGCGTGTGATTAGTG
miR-H2	CCTGAGCCAGGAGCGA	Hprt-1-R	TCAGTCTGTCCATAATTAGTTC
miR-H3	CTGGGACTGTGCGGTT	Snadd-F	CCAACTTTCCCAACATTCC
miR-H4	GTAAGAGTTTGACAGGCAAGC	Snadd-R	GGTAGTCTGTATGATGTTAAG
miR-H4*	CTTGCCCTGTCTAACTCGCTA	cylinD-F	ACCAACACAGACGTGATTG
miR-H5	GTCAGAGATCCAAACCCCTCC	cylinD-R	CAACTGGCATCTCTACACAGG
miR-H6	CACTTCCCGTCCCTTCATC	CDK2-F	CGGAGCTTGTTATCGCAATGTC
miR-H7	AAAGGGGTCTGCAACCAAAAG	CDK2-R	TGGCTTGTCACATCTGGAAG
miR-H8	TATATAGGCTCAGGGGTTTC	MYC-F	AGCGACTCTGAGGAGGAAC
		MYC-R	CTGGCTAGTTGTCTGATG

تجزیه و تحلیل و پیش‌بینی امکان هدف‌گیری

microRNAهای LAT

توالی microRNAهای مرتبط با LAT و ویروس HSV-1 از سایت مرجع و بانک اطلاعاتی mirbase (<http://www.mirbase.org/>) به‌دست آمد. به‌منظور دستیابی به ژن‌های هدف هر microRNA از دو الگوریتم گوناگون با اساس تصمیم‌گیری متفاوت استفاده شد زیرا نرم‌افزارهای گوناگون با الگوریتم‌های مختص خودشان، در پیشگویی اتصال هر microRNA به ژن یا ژن‌های هدفش دارای نتایج متنوعی هستند. یکی از این دو نرم‌افزار؛ الگوریتم TargetScanCustom (<http://www.targetscan.org/>) بود که براساس نحوه اتصال سر ۵' بخش اصلی متصل شونده (Seed) هر microRNA به‌صورت کاملاً غیرمنعطف، امکان

هدف‌یابی یک ژن توسط یک microRNA را ارزیابی می‌کند. براساس این الگوریتم هر جایگاه اتصال از لحاظ تکاملی مورد بررسی قرار می‌گیرد به‌طوری که در طول تکامل در موجودات گوناگون حفاظت شده باشد. الگوریتم دیگری که در این مطالعه استفاده شد مربوط به شرکت IBM (آمریکا) و تحت عنوان RNA22 microRNA target detection (<http://cbcsrv.watson.ibm.com/rna22.html>) است. این نرم‌افزار با تأکید به تعداد نوکلئوتیدهای شرکت کننده در انتهای ۵' و انرژی کل زنجیره دو رشته‌ای تشکیل شده بین microRNA و رونوشت مورد نظر و بدون توجه به امر حفاظت‌شدگی توالی هدف در طول تکامل نتایجش را اعلام می‌کند.

ارزیابی بیان ژن‌های مورد نظر

سلول‌های BE-2(c) ۶۰ ساعت پس از ترانسفکشن ژن LAT

نتایج

بررسی بیان microRNA های LAT در سلول

ژن LAT پس از ترانسفکشن به داخل سلول‌های نوروبلاستومای انسانی microRNA های مرتبط را تولید می‌کند. رونوشت غیر کد کننده LAT با تولید تعدادی از microRNA های ویروسی سرنوشت مولکولی و رفتار سلول‌های میزبان خود را دستخوش تغییر قرار می‌دهد. از سلول‌های BE-2(c) به نحوی کل RNA استخراج شد که میزان microRNA های سلولی و ویروسی در آن تغلیظ شود. میزان microRNA های بیان شده توسط LAT در دو گروه سلولی کنترل و ترانسفکت شده با pc-LAT با روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی ارزیابی شد. نتایج نشان داد که کلیه microRNA های LAT در سلول بیان می‌شود که بیانگر عملکرد بیانی رونوشت LAT در سلول‌های ترانسفکت شده است. در این آزمون عدم بیان mir-H6 که توسط رونوشت LAT تولید نمی‌شود به عنوان کنترل منفی ارزیابی شد.

بررسی بیوانفورماتیکی هدف‌گیری ژن Smad4

با microRNA های LAT

پروتئین Smad4 از لحاظ بیوانفورماتیکی توسط microRNA های LAT هدف‌گیری می‌شود. نتایج بررسی الگوریتم‌های گوناگون مبتنی بر میزان انرژی دورشته‌ای microRNA-mRNA یا محافظت شده بودن جایگاه‌های اتصال یا نحوه اتصال انتهای 5' هر microRNA نشان می‌دهد که microRNA های ویروسی تولید شده از رونوشت LAT در نواحی گوناگون 3' UTR ژن Smad4 دارای جایگاه اتصال است. الگوریتم RNA22 با بخش اصلی متصل شونده تمام قد حداقل 6 نوکلئوتیدی و حداقل اتصال جفت‌باز 14 نوکلئوتید بین دورشته microRNA-mRNA و انرژی اتصال 25- کیلوکالری بر مول توانست 10 جایگاه اتصال را برای microRNA های LAT روی 3' UTR ژن Smad4 معرفی نماید (شکل 1). چهار جایگاه

به کمک QIAzol Lysis Reagent (QIAGEN, Germany) لیز شدند و طبق دستورالعمل شرکت سازنده RNA کل سلول‌ها استخراج شد. شرح برنامه به اختصار به این ترتیب بود که پس از لیز سلول‌ها توسط QIAzol، محتوی RNA ی موجود در فاز آبی تشکیل شده روی سطح آلی، طی فرایند رسوب‌دهی با الکل آب‌گیری شده و رسوب می‌کند. سپس رسوب RNA تشکیل شده توسط اتانل 70 درصد شستشو داده شده و پس از حذف الکل رسوب خشک شده و در 20 میکرولیتر آب بدون RNase- DNase حل می‌شود. در گام بعد 5 میکروگرم از کل RNA استخراج شده برای ساخت cDNA به کمک کیت (Fermentas, Lithuania) First strand cDNA synthesis kit. استفاده شد. براساس دستورالعمل کیت با 20 واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس M-MuLV به همراه 0.2 میکروگرم آغازگر شش‌تایی تصادفی و 2 میکرولیتر از dNTP با غلظت 10 میلی‌مول از روی RNA سلولی cDNA ساخته شد. بیان ژن‌های دخیل در مسیر Smad4 در دو گروه سلولی ترانسفکت شده با pc-LAT و پلاسمید کنترل به کمک روش واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی ارزیابی شد. طبق دستورالعمل شرکت سازنده 6/25 میکرولیتر از master mix SYBR® Premix Ex (TAKARA, Japan) Taq™ II به همراه 0.8 میکرومول از آغازگر سنس و آنتی‌سنس (جدول 1 ب) و 1 میکرولیتر از cDNA به عنوان الگو در یک واکنش به حجم نهایی 12/5 میکرولیتر به کار برده شد. واکنش‌ها به صورت دوبار تکرار در دستگاه Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Sciences) انجام شد. در نهایت نتایج به صورت ارزیابی نسبی (Relative Quantification) در حالی مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت که بیان هر ژن در هر گروه با بیان ژن Hprt-1 به عنوان یک ژن کنترل داخلی در همان گروه یکسان‌سازی شد. نتایج حاصل براساس الگوریتم REST 2009 (Relative Expression Software Tool V2.0.13, QIAGEN, GmbH, Germany). ارزیابی و گزارش شد.

پیش‌بینی شده توسط این نرم‌افزار دارای انرژی بیش از -30 کیلوکالری بر مول است که این میزان انرژی اتصال (Folding) بین دو رشته microRNA-mRNA می‌تواند تأیید کننده احتمال اتصال این دو رشته به هم باشد. براساس نتایج RNA22 در

وضعیتی که miR-H2 و miR-H7 هیچ‌گونه جایگاهی روی UTR 3' ژن Smad4 ندارد؛ miR-H3 دارای بیشترین جایگاه (۴ جایگاه) و miR-H2* دارای قوی‌ترین جایگاه‌ها برای کنترل بیان این ژن است.

From offset 5695 to 5716 Folding energy = -33.799999 Kcal/mol	From offset 3194 to 3215 Folding energy = -33.799999 Kcal/mol
5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'	5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'
GCTTTTGAGTTGGTGTGTGA GCGGGACGC UCGCACGCGCCCGCACAGACU	ATTTTGTGGGGCAGGGTGTGG GCGGGACGC UCGCACGCGCCCGCACAGACU
... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))	... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))
GCTTTTGAGTTGG-TGTGTGTGA	A-TTTTGTGGGGCAGGGTGTGG
UC-AGACACGGCCCGCACGCU	UCAGACACGGCCCG-CGCACGCU

جایگاه های اتصال* miR H2

From offset 2126 to 2145 Folding energy = -26.900000 Kcal/mol	From offset 3975 to 3994 Folding energy = -35.299999 Kcal/mol
5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'	5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'
GTGCACTGGTATGATCTCAG GCGGGACGC CUGGGACUGUGCGGUUGGGA	ATCCCTAGCAGTTGTCCAG GCGGGACGC CUGGGACUGUGCGGUUGGGA
... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))	... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))
GTGCACTGGTATGATCTCAG	ATCCCTAGCAGTT--GTCCAG
AGGUUGGCGUGUCAGGGUC	A--GGGUUGGCGUGUCAGGGUC

From offset 3003 to 3022 Folding energy = -26.000000 Kcal/mol	From offset 3945 to 3964 Folding energy = -26.799999 Kcal/mol
5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'	5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'
TATAACCTTGCTTTTCCAG GCGGGACGC CUGGGACUGUGCGGUUGGGA	TCCACAAAGTGCACTCCTAG GCGGGACGC CUGGGACUGUGCGGUUGGGA
... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))	... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))
TA-TAACCTTGCTTTTCCAG	TCCACAAAGTGCA-TCCAG
AGGUUGGCGUGUC-AGGGUC	AGG-GUUGGCGUGUCAGGGUC

جایگاه های اتصال miR-H3

From offset 2142 to 2163 Folding energy = -32.599998 Kcal/mol	From offset 5200 to 5221 Folding energy = -26.000000 Kcal/mol
5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'	5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'
TCAGCTCACTGCAACCTCTGCC GCGGGACGC GGUAGAGUUGACAGGCAAGCA	TGATGTGTGACCTTTGGGCAAG GCGGGACGC CUUGGCGUGUAAUCGCUAGU
... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))	... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))
TCAGCTCA-CTG-CAACCTCTGCC	T-----GATGTGTGACCTTTGGGCAAG
A--CGAACGGACAGUUGAGAUUG	UGAUCGCU-CAAUUG-----UCCGUUC

جایگاه اتصال* miR-H4

جایگاه اتصال miR-H4

From offset 3325 to 3346 Folding energy = -27.299999 Kcal/mol	From offset 1463 to 1482 Folding energy = -28.400000 Kcal/mol
5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'	5'<-- target -->3' -linker- 5'<-- microRNA -->3'
GTGAGTTGCAGGTATCTTTGAC GCGGGACGC GUCAGAGAUCAAACCCUCCGG	TTCCCATGGACATTGTGTA GCGGGACGC UAUUAGGGUACAGGGGUGUC
... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))	... (((((((((((((((((-----)))))))))...))))))...))
--GTGAGTTGCAGGTATCTTTGAC	TT-CCCATGGACATTGTGTA
GGC-CUCCCAAACC-UAGAGACUG	CUUGGGGA-CUGGGAUUAU

جایگاه اتصال miR-H5

جایگاه اتصال miR-H8

شکل ۱ نرم‌افزار RNA22 جایگاه اتصال هر microRNA را به ناحیه 3' غیر کد شونده ژن Smad4 به صورت فوق پیش‌بینی کرده است.

تأثیر بیان رونوشت وابسته به نهفتگی بر مسیر TGF-β

جدول ۲ دو نرم افزار RNA22 و Targetscan با دو پایه محاسباتی گوناگون احتمال اتصال microRNA های ویروسی را با ناحیه 3'UTR Smad4 مورد بررسی قرار می دهند. نرم افزار RNA22 با تکیه بر انرژی اتصال دو رشته microRNA-mRNA پیش بینی های خود را نمایان می کند. در این گزارش صرفاً اتصالاتی آمده است که انرژی آن ها بیش از ۲۵- کیلوکالری بر مول است. نرم افزار Targetscan با الگوریتمی متفاوت و با تأکید بر نحوه اتصال بخش اصلی متصل شونده هر microRNA و میزان حفاظت شدگی جایگاه هدف طی تکامل میزان اتصال را پیش بینی می کند. در این نرم افزار در صورتی که اتصال از جایگاه ۸-۲ بخش اصلی متصل شونده باشد و به علاوه در جایگاه ۱ هدف نوکلئوتید A باشد بخش اصلی متصل شونده به صورت m8 گزارش می شود و در قوی ترین وضعیت خود قرار دارد. اگر اتصال از جایگاه ۷-۲ بخش اصلی متصل شونده باشد و نوکلئوتید ۸ هم در اتصال شرکت کند بخش اصلی متصل شونده را 7mer-m8 گزارش می کند و در زمانی که اتصال از جایگاه ۷-۲ بخش اصلی متصل شونده باشد و نوکلئوتید ۱ هم A باشد بخش اصلی متصل شونده به صورت 7mer-1A گزارش می شود.

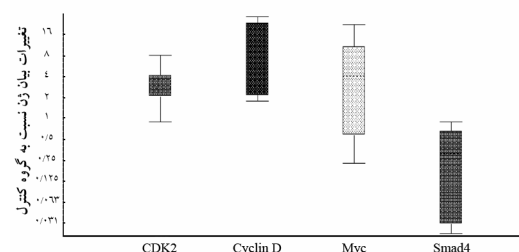
نتایج تجزیه و تحلیل RNA22		نتایج تجزیه و تحلیل TargetScan		نام microRNA
جایگاه هدف بر روی 3'UTR	انرژی اتصال بر اساس کیلوکالری بر مول	جایگاه هدف بر روی 3'UTR	نحوه اتصال بخش اصلی متصل شونده به هدف	
ژن Smad4	بر مول	ژن Smad4		
-	-	۲۲۰-۲۱۰	8 mer	miR-H2
۵۷۱۶-۵۶۹۵	-۳۳/۷۹	-	-	miR-H2*
۳۲۱۵-۳۱۹۴	-۳۳/۷۹	-	-	
۳۹۹۴-۳۹۷۵	-۳۵/۲۹	-	-	
۲۱۲۶-۲۱۴۵	-۲۶/۹	-	-	miR-H3
۳۹۶۴-۳۹۴۵	-۲۶/۷۹	-	-	
۳۰۲۲-۳۰۰۳	-۲۶/۰۰	-	-	
۵۲۲۱-۵۲۰۰	-۲۶/۰۰	-	-	miR-H4
۲۱۴۲-۲۱۶۳	-۳۲/۵۹	۶۳۷-۶۲۶	7mer-m8	miR-H4*
-	-	۱۴۰۰-۱۴۰۷	7mer-1A	
۳۳۲۵-۳۳۴۶	-۲۷/۲۹	-	-	miR-H5
-	-	-	-	miR-H7
۱۴۶۳-۱۴۸۲	-۲۸/۰۰	-	-	miR-H8

بررسی بیان ژن ها بر اساس واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی

رونوشت LAT بیان پروتئین Smad4 را کاهش می دهد. ۶۰ ساعت پس از ترانسفکشن سلول های نوروبلاستوما BE-2(c) توسط سازه pc-LAT به عنوان گروه آزمون و ناقل خالی به عنوان گروه کنترل، سلول ها به منظور بررسی بیان ژن های دخیل در مسیر Smad4 برداشت شدند. از سلول ها تمامی RNA استخراج شد و به طور همزمان cDNA برای بررسی بیان microRNA و mRNA تهیه شد و به کمک روش واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی سطح رونوشت های ژن های Smad4، CDK2، cyclinD و Myc گروه آزمون مورد ارزیابی نسبی نسبت به گروه کنترل قرار گرفت. تجزیه و

نرم افزار TargetScan نیز با وجود داشتن الگوریتمی متفاوت نسبت به RNA22 هدف گیری رونوشت Smad4 با microRNA های LAT را پیش بینی می کند. ساختار الگوریتمی غیر منعطف و سخت گیرانه TargetScan اگرچه دامنه پیش بینی نرم افزار را محدود می کند ولی درستی پیش بینی را افزایش می دهد. بر اساس الگوریتم این نرم افزار که بر محافظت شدگی جایگاه ها در طول دوره های تکاملی و ساختار انتهای ۵' microRNA متمرکز شده است و توجهی به سطح انرژی جفت شدگی دو رشته و نحوه اتصال سر 3' قطعه microRNA ندارد، تنها دو microRNA میR-H2 و miR-H4* با سه جایگاه در 3' UTR Smad4 گزارش شده است. نتایج پیش بینی این دو نرم افزار به صورت مقایسه ای در جدول ۲ مشاهده می شود.

تحلیل نتایج به دست آمده به وسیله نرم افزار REST نشان داد که سطح رونوشت Smad4 به صورت کاملاً معنی داری کاهش یافته است به صورتی که نسبت به گروه کنترل به عدد ۰/۱۳۲ رسیده که نشانگر ۷/۵۷ برابر کاهش است. تغییرات سطح بیان ژن در ژن های CDK2 و Myc اگرچه به ترتیب به صورت میانگین ۲/۵ و ۲/۱ برابر نسبت به گروه کنترل افزایش یافت ولی نرم افزار REST این میزان تغییر را معنی دار محسوب نکرد. از سویی دیگر ژن cyclinD با افزایش بیان کاملاً معنی داری برابر با میانگین ۶/۷۲ برابر (نمودار ۱).



نمودار ۱ میزان بیان چهار ژن CDK2, MYC, CyclinD, Smad4 به کمک واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی آزموده و به وسیله نرم افزار REST نتایج تجزیه و تحلیل شد. نرم افزار نتایج حاصل از تکرارهای گوناگون را به صورت تصادفی نسبت به هم آزمون کرده و نتایج کار که توسط خود نرم افزار به صورت نمودار ویشکر (Whisker-Box Plot) ارائه می شود، در بردارنده کمینه و بیشینه و پراکندگی این نتایج است؛ در حالی که میانگین هر وضعیت به صورت نقطه چین در داخل نمودار مشخص شده است. این نمودار قادر است علاوه بر میانگین پراکنش نتایج را نسبت به وضعیت میانه و براساس میزان پراکنش نتایج معنی داری تفاوت ها را مشخص کند ($P < 0.01$).

بحث

در این تحقیق سعی شد تأثیر رونوشت LAT و microRNAهای تولیدی آن بر تنظیم مسیر TGF- β ارزیابی شود. نتایج حاصل از کلیه پژوهش های گذشته نشان می دهد که توجه اکثر محققین در مطالعه زیست شناسی LAT بر تأثیر این رونوشت بر مکانیسم خفتگی ویروس و ممانعت از اعمال مرگ برنامه ریزی شده در سلول های میزبان متمرکز است. تاکنون تحقیق مشخصی روی آثار دیگر این RNA غیر کد کننده روی

دیگر مسیرهای پیام رسانی داخل سلولی گزارش نشده است. مسیر TGF- β در بسیاری از فرایندهای سلولی اعم از رشد و تکامل جنینی، تمایز سلولی، مرگ برنامه ریزی شده و عملکردهای سلولی دخیل است. در مسیر TGF- β پروتئین Smad4 به عنوان یکی از کلیدی ترین پروتئین های این مسیر، به عنوان یک فاکتور رونویسی حد واسطه عمل کرده و ژن های هدف را کنترل می نماید [۱۳-۱۵].

رونوشت LAT که از ژنی به طول ۸/۳ کیلو باز تولید می شود پس از پیرایش، طولی حدود ۲ کیلو باز از آن حذف می شود و به صورت فعال وارد سیتوپلاسم می شود. تاکنون از این رونوشت کد شدن پروتئین مشخصی گزارش نشده است [۱۶، ۱۷]. مطالعات اخیر نشان داده اند که microRNAهای مشتق شده از LAT می تواند به عنوان بازوهای عملکردی این رونوشت عمل کرده و سیستم های سلولی میزبان را متأثر کند [۷]. در این تحقیق پس از ترانسفکت سازه محتوی LAT به داخل سلول پس از ۶۰ ساعت به دلیل پروموتور قوی ناقل میزبان، بیان microRNAهای ویروسی به صورت بسیار چشمگیری از سلول های کنترل که به طور کلی فاقد microRNA ویروسی بودند، افزایش پیدا کرد. این در حالی بود که میزان بیان miR-H6 که یک microRNA ویروس HSV-1 است و مشتق از LAT نیست در این سلول ها تغییری پیدا نکرد.

اگرچه به صورت رایج محل اثر microRNA را در سطح بیان پروتئین و متوقف کردن فرایند ترجمه می دانند ولی تحقیقات نشان داده است که در پستانداران microRNAها به صورت چشمگیری سطح mRNAهای هدفشان را پایین می آورند و به ادعای دکتر جوو (Guo) و همکارانشان ناپایدار کردن mRNA هدف، اصلی ترین نقش microRNA در پستانداران به منظور کنترل بیان ژن های مورد نظر است [۱۸]. براساس این گزارش؛ بررسی کمی سطح بیان mRNA هدف با واکنش زنجیره ای پلیمرز کمی می تواند شاخص مناسبی برای آزمون اثر microRNA سلولی بر رونوشت های هدفش باشد. نتایج آزمون نشان داد که رونوشت LAT به صورت

تأثیر بیان رونوشت وابسته به نهفتگی بر مسیر TGF- β

به محاسبات REST از نظر آماری معنی دار نبود. به طور کلی با توجه به نتایج حاصل می توان گفت که microRNAهای مشتق از رونوشت LAT و ویروس HSV-1 قادر است مسیر TGF- β را با مهار پروتئین کلیدی Smad4 متوقف کند. با توجه به این که مسیر TGF- β در بیماری های گوناگونی از قبیل فیبروزها و بدخیمی ها دخیل است، مهار این مسیر به کمک microRNAهای LAT می تواند به عنوان مسیری که هدف بسیاری از داروهای شیمیایی و نو ترکیب است، مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق از رساله دکتری رشته ویروس شناسی دانشکده علوم پزشکی دانشگاه تربیت مدرس استخراج شده است. در ضمن بدین وسیله نویسندگان مقاله از حمایت های مالی دانشگاه تربیت مدرس و مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته تشکر و قدردانی می نمایند.

معنی داری سطح mRNAهای Smad4 را کاهش داده است. برای تأیید این آزمون گروهی دیگر از ژن های کلیدی و پایین دست ژن Smad4 نیز بررسی شد. ژن CyclinD به عنوان یک پروتئین مهم در تنظیم رفتار و تکثیر سلولی که با حضور خود باعث افزایش تکثیر سلولی می شود، یکی از پروتئین های است که تحت کنترل Smad4 قرار دارد. پروتئین Smad4 به کمک حد واسطه p21 که یک ممانعت کننده کینازهای وابسته به سایکلین است بیان CyclinD را تحت کنترل دارد به طوری که تحقیقات نشان داده که ممانعت از بیان Smad4 منجر به افزایش بیان CyclinD می شود [۱۹، ۲۰]. در این تحقیق نیز افزایش بیان CyclinD می تواند بیانگر کاهش Smad4 باشد. از سویی دیگر مطالعات گوناگونی تأیید می کند که ژن هایی دیگر در پایین دست مسیر TGF- β از قبیل Myc و CDK2 با مهار شدن Smad4 افزایش بیان پیدا می کند [۲۱-۲۳]. در این مطالعه نشان داده شد که رونوشت LAT باعث کاهش معنی دار بیان Smad4 و به همراه آن افزایش بیان CDK2 و Myc می شود؛ اگرچه افزایش بیان این دو ژن اخیر با توجه

منابع

- [1] Mador N, Goldenberg D, Cohen O, Panet A, Steiner I. Herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts suppress viral replication and reduce immediate-early gene mRNA levels in a neuronal cell line. *J Virol* 1998; 72(6): 5067-75.
- [2] Allen SJ, Hamrah P, Gate D, Mott KR, Mantopoulos D, Zheng L, Town T, Jones C, von Andrian UH, Freeman GJ, Sharpe AH, Benmohamed L, Ahmed R, Wechsler SL, Ghiasi H. The role of LAT in increased CD8+ T cell exhaustion in trigeminal ganglia of mice latently infected with herpes simplex virus 1. *J Virol* 2011; 85(9): 4184-97.
- [3] Perng GC, Jones C, Ciacci-Zanella J, Stone M, Henderson G, Yukht A, Slanina SM, Hofman FM, Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. Virus-induced neuronal apoptosis blocked by the herpes simplex virus latency-associated transcript. *Science* 2000; 287(5457): 1500-3.
- [4] Henderson G, Peng W, Jin L, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. Regulation of caspase 8- and caspase 9-induced apoptosis by the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript. *J Neurovirol* 2002; 8 Suppl 2: 103-11.
- [5] Bloom DC. HSV LAT and neuronal survival. *Int Rev Immunol* 2004; 23(1-2): 187-98.

- [6] Carpenter D, Hsiang C, Brown DJ, Jin L, Osorio N, BenMohamed L, Jones C, Wechsler SL. Stable cell lines expressing high levels of the herpes simplex virus type 1 LAT are refractory to caspase 3 activation and DNA laddering following cold shock induced apoptosis. *Virology* 2007; 369(1): 12-8.
- [7] Umbach JL, Kramer MF, Jurak I, Karnowski HW, Coen DM, Cullen BR. MicroRNAs expressed by herpes simplex virus 1 during latent infection regulate viral mRNAs. *Nature* 2008; 454(7205): 780-3.
- [8] Umbach JL, Wang K, Tang S, Krause PR, Mont EK, Cohen JI, Cullen BR. Identification of viral microRNAs expressed in human sacral ganglia latently infected with herpes simplex virus 2. *J Virol* 2010; 84(2): 1189-92.
- [9] Shen W, Sa e Silva M, Jaber T, Vitvitskaia O, Li S, Henderson G, Jones C. Two small RNAs encoded within the first 1.5 kilobases of the herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript can inhibit productive infection and cooperate to inhibit apoptosis. *J Virol* 2009; 83(18): 9131-9.
- [10] Gómez-Santos C, Ambrosio S, Ventura F, Ferrer I, Reiriz J. TGF-beta1 increases tyrosine hydroxylase expression by a mechanism blocked by BMP-2 in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Brain Res* 2002; 958(1): 152-60.
- [11] Sun Y, Fei T, Yang T, Zhang F, Chen YG, Li H, Xu Z. The suppression of CRMP2 expression by bone morphogenetic protein (BMP)-SMAD gradient signaling controls multiple stages of neuronal development. *J Biol Chem* 2010; 285(50): 39039-50.
- [12] Mira H, Andreu Z, Suh H, Lie DC, Jessberger S, Consiglio A, San Emeterio J, Hortigüela R, Marqués-Torrejón MA, Nakashima K, Colak D, Götz M, Fariñas I, Gage FH. Signaling through BMPR-IA regulates quiescence and long-term activity of neural stem cells in the adult hippocampus. *Cell Stem Cell* 2010; 7(1): 78-89.
- [13] Moustakas A, Souchelnytskyi S, Heldin CH. Smad regulation in TGF-beta signal transduction. *J Cell Sci* 2001; 114(Pt 24): 4359-69.
- [14] ten Dijke P, Hill CS. New insights into TGF-beta-Smad signalling. *Trends Biochem Sci* 2004; 29(5): 265-73.
- [15] Schuster N, Kriegelstein K. Mechanisms of TGF-beta-mediated apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307(1): 1-14.
- [16] Peng W, Jin L, Henderson G, Perng GC, Brick DJ, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. Mapping herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript sequences that protect from apoptosis mediated by a plasmid expressing caspase-8. *J Neurovirol* 2004; 10(4): 260-5.
- [17] Kent JR, Kang W, Miller CG, Fraser NW. Herpes simplex virus latency-associated transcript gene function. *J Neurovirol* 2003; 9(3): 285-90.
- [18] Guo H, Ingolia NT, Weissman JS, Bartel DP. Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature* 2010; 466(7308): 835-40.
- [19] Teng Y, Sun AN, Pan XC, Yang G, Yang LL, Wang MR, Yang X. Synergistic function of Smad4 and PTEN in suppressing forestomach squamous cell carcinoma in the mouse. *Cancer Res* 2006; 66(14): 6972-81.

- [20] Qiao W, Li AG, Owens P, Xu X, Wang XJ, Deng CX. Hair follicle defects and squamous cell carcinoma formation in Smad4 conditional knockout mouse skin. *Oncogene* 2006; 25(2): 207-17.
- [21] Trinh BQ, Barengo N, Naora H. Homeodomain protein DLX4 counteracts key transcriptional control mechanisms of the TGF- β cytostatic program and blocks the antiproliferative effect of TGF- β . *Oncogene* 2011; 30(24): 2718-29.
- [22] Liu R, Zhou Z, Huang J, Chen C. PMEPA1 promotes androgen receptor-negative prostate cell proliferation through suppressing the Smad3/4-c-Myc-p21 Cip1 signaling pathway. *J Pathol* 2011; 223(5): 683-94.
- [23] Baughn LB, Di Liberto M, Niesvizky R, Cho HJ, Jayabalan D, Lane J, Liu F, Chen-Kiang S. CDK2 phosphorylation of Smad2 disrupts TGF-beta transcriptional regulation in resistant primary bone marrow myeloma cells. *J Immunol* 2009; 182(4): 1810-7.