

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

Mahshid Malakootian¹, Fatemeh Mirzadeh-Azad², Parisa Naeli², Yousef Fouani², Seyed Javad Mowla^{3*}

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 ملکوتیان^۱، فاطمه میرزاده آزاد^۲، پرینا نائلی^۲، یوسف فوعانی^۱، سید جواد مولی^{۳*}

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: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، 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 نوروژنایی دخالت دارد. بررسی‌های جدید نشان دهنده نقش تشدیدکنندگی 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 نیافته 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 معدودی از رده‌های سلولی جدا شده از تومورهای معده (AGS)، کارسینومای مثانه (5637)، آدنوکارسینومای کولورکتال (Ht-29)، کارسینومای سلول‌های هپاتوسیت (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، lncRNA، OCT4، سرطان، سلول بنیادی

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

مقدمه

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

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

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

اخیراً چندین گروه روش‌هایی برای بازبرنامه‌ریزی سلول‌های بدنی موشی و انسانی به سلول‌های بنیادی پرتوان القا شده (Induced Pluripotent Stem Cells: IPS) معرفی کردند [۱۸-۲۱]. در سلول‌های انسانی، معمولاً استراتژی‌های بازبرنامه‌ریزی با معرفی ترکیبی از عامل‌های مرتبط با پرتوانی خصوصاً Oct-4، Sox2، Lin28 و Nanog یا Oct4، Sox2، c-Myc و Klf4 انجام می‌شود [۱۸، ۱۹]. بیان این عامل‌های مرتبط با پرتوانی برای حفظ شرایط پرتوانی سلول‌ها ضروری است و خاموش شدن بیان این ژن‌ها قدم مهمی در تمایز سلولی است [۲۲، ۲۳]. چندین مطالعه مجزا نشان دهنده اهمیت نقش RNAهای غیر کد کننده بلند در حفظ و تقویت پرتوانی سلول‌های بنیادین و همچنین اهمیت IncRNA ها در دوران جنینی و تمایز سلول‌های بنیادین به سلول‌های طبیعی است [۱۶، ۲۴]. مطالعه‌ای که شیخ محمد و همکاران روی سلول‌های موشی انجام دادند، نشان داد که IncRNA 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 RNAهای غیر کد کننده بلند (long non-coding RNAs: 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 این رو 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 به‌طور 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 نظارتی و عملکردی است. از جمله این عملکردها می‌توان دخالت در تغییرات اپی‌ژنتیکی در هسته [۸، ۹]، دخالت در پایداری mRNAها در سیتوپلاسم، مداخله در فرآیند پیرایش (Splicing) [۱۰، ۱۱]، دخالت در فرآیند رونویسی از طریق کمپلکس‌های باز آرایشی (Remodeling) [۲، ۱۲] یا دخالت مستقیم در فرآیند رونویسی از طریق فراخوان عامل‌های رونویسی ویژه [۱۰، ۱۳]، نقش تشدید

مختلف دودمان‌های سلولی سرطانی دارای کاربردهایی در زمینه سرطان و زیست‌شناسی سلول‌های بنیادی باشد.

مواد و روش‌ها

تهیه و کشت دودمان‌های سلولی NTeara2 (تراتوکارسینوما جینی پرتوان)، USSC (سلول‌های بنیادی استخراجی از خون بندناف)، Huvec (سلول‌های آندوتلیال وریدی بندناف)، Fibroblast (فیبروبلاست)، U-87MG (گلیوبلاستوما)، 1321N1 (آستروسیتوما)، DAOY (مدولوبلاستوما)، A172 (گلیوبلاستوما)، AGS (آدنوکارسینوما معده)، A549 (کارسینوما ریه)، 5637 (کارسینوما مثانه)، Ht-29 (آدنوکارسینوما کولورکتال)، KYSE (کارسینوما مری)، LNCAP (کارسینوما پروستات)، SW480 (آدنوکارسینوما کولورکتال)، MIA-PaCa2 (کارسینوما پانکراس)، HEK293T (کلیه جینی)، Huh-7 (کارسینوما کبد)، MCF-7 (آدنوکارسینوما پستان)، Hela (آدنوکارسینوما دهانه رحم)، HepG2 (کارسینوما سلول‌های هپاتوسیت)، PC3 (آدنوکارسینوما پروستات) و Skmel3 (ملانوما 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، فیبروبلاست، A549 و HEK293T توسط دکتر سلیمان از مرکز تحقیقات فن‌آوری بن‌یاخته اهدا شد. دودمان‌های سلولی سرطانی LNCAP، SW480، PC3 و Skmel3 را نیز دکتر صادقی‌زاده از دانشگاه تربیت مدرس اهدا کردند. دودمان‌های سلولی HUVEC، AGS، MG، U-87، DAOY، A172، Ht-29، KYSE، MIA-Pa-Ca2، Huh-7، MCF-7، Hela و HepG2 نیز از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. محیط کشت اختصاصی برای دودمان‌های توموری مغز (U-87MG، A172، 1321N1، DAOY، PC3، LNCAP، KYSE، 5637

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 فعال کردن ژن‌های هدف مؤثر است، می‌توان به Sox2 اشاره کرد که یک عامل رونویسی متعلق به خانواده ژن Sox (SR box) است. کمپلکس Oct4-Sox2 به‌طور متقابل در تنظیم رونویسی Oct4، Sox2، Nanog و تعدادی از ژن‌های مسئول پرتوانی در سلول‌های بنیادین جینی نقش دارد [25].

RNA غیر کد کننده بلند PSORS1C3 برای اولین بار در سال 2005 توسط هولم (Holm) و همکاران در ارتباط با بیماری پوستی پسوریازیس (Psoriasis) معرفی شد. این ژن دارای سه اگزون و دو اینترون است و یک جعبه توالی CAT با فاصله 35 جفت باز در بالادست نقطه شروع اگزون 1 وجود دارد. رونوشت RNA آن طبق این بررسی حدود 600 جفت باز است و بزرگ‌ترین ORF مشاهده شده در این رونوشت حاوی 58 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 نوترن بلات در بافت‌های مختلفی از جمله قلب، مغز، جفت، ریه، کبد، ماهیچه صاف، کلیه، پانکراس، تیموس، پروستات، طحال، بیضه، تخمدان، کولون، لوکوسیت، و روده تأیید کننده بیان محدود آن در بافت‌های بیضه، پانکراس و ماهیچه صاف بود [26].

با توجه به نقش حیاتی Oct-4 در سلول‌های بنیادی و سرطانی به‌نظر می‌رسد که RNA غیر کد کننده PSORS1C3 هم در سلول‌های بنیادی و سرطانی دارای بیان و عملکرد باشد. از آنجایی که تاکنون هیچ مطالعه‌ای در مورد امکان بیان آن در سلول‌های یاد شده صورت نگرفته است، به‌نظر می‌رسد که بررسی بیان این lncRNA در سلول‌های بنیادی و انواع

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

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 سانتی‌گراد انکوبه شد. سپس با اضافه کردن یک میکرولیتر EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) ۵۰ میلی‌مولار و انکوباسیون در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ دقیقه با آنزیم DNase I غیرفعال شد.

cdNA با یک میکروگرم از RNA تیمار شده با DNase I و با استفاده از آنزیم Prime Script RT در حضور آغازگرهای (oligo dT (Primers) و هگزامرهای تصادفی مطابق با پروتکل شرکت سازنده (Takara، ژاپن) و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد ساخته شد.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز

طراحی آغازگرهای مناسب ژن PSORS1C3 و

GAPDH

تمامی آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش توسط نرم‌افزارهای Gene runner و per primer 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 DNA 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 NR_026816.1 و GAPDH با شماره دسترسی بانک ژنی NM_001256799.2 به دست آمد. توالی آغازگرهای استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است.

KYSE .SW480، RPMI-1640، AGS محیط برای دودمان‌های سلولی NT2، Huh-7، HEK293T، HepG2، MIA-PaCa2 و Fibroblast، Huvec، MCF-7، Ht-29، Hela محیط DMEM High Glucose و برای دودمان USSC محیط DMEM Low Glucose و برای دودمان سلولی SKMEL3 هم محیط کشت alpha-MEM استفاده شد. در همه موارد محیط کشت سلول‌های مورد استفاده در این پژوهش با ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum:) و ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Invitrogen، آمریکا) تکمیل شد و سلول‌ها و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و CO₂ ۵ درصد کشت داده شدند.

استخراج RNA

RNA کل سلول‌ها با استفاده از ترايزول (Invitrogen، آمریکا) استخراج شد. به صورت خلاصه ابتدا به سلول‌های کشت داده شده یک میلی‌لیتر ترايزول اضافه شد و سپس با اضافه کردن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم و انکوباسیون به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، مخلوط حاصل در دور ۱۲۰۰۰ g و برای ۲۰ دقیقه سانتریفوژ 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 سانتریفوژ شد. به رسوب حاصل ۱ میلی‌لیتر اتانول ۷۵ درصد اضافه و در دور ۷۵۰۰ g برای ۱۰ دقیقه سانتریفوژ شد. در انتها پس از خشک شدن نسبی، رسوب حاصل در آب حل شد و برای ۱۰ دقیقه در دمای ۵۶ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. کیفیت RNA کل با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۱ درصد و مشاهده باندهای ۱۸S و ۲۸S مربوط به RNA ریپوزومی 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 پروت ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

جدول ۱ توالی آغازگرها و اندازه محصول تکثیر آن‌ها

ژن	آغازگر	توالی	طول قطعه حاصل از تکثیر
PSORS1C3	F	CAACCCACTCTCTGTGCTATGAC	۵۹۳ جفت باز
	R	GATACTTCACACACACCTTTATTATTAC	
GAPDH	F	GTGAACCATGAGAAAGTATGACAAC	۱۶۱ جفت باز
	R	CATGAGTCCTTCCACGATACC	

قطعه تخلیص شده در ناقل pTZ57R/T از کیت کلونینگ شرکت Fermentas (لیتوانی) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده کلون شد. مراحل کلون سازی به طور خلاصه شامل اتصال محصول خالص شده قطعه PSORS1C3 به ناقل pTZ57R/T، انتقال ناقل [مرحله ترانسفورماسیون (Transformation)]، نو ترکیب به باکتری های مستعد و تکثیر باکتری حاوی ژنوم نو ترکیب روی پلیت حاوی محیط کشت آنتی بیوتیک دار پنی سیلین به مدت یک شب در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد بود. سپس روی کلونی های رشد کرده، کلونی PCR با آغازگرهای اختصاصی ناقل گذاشته شد و کلونی هایی که حاوی قطعه تکثیر شده بود، در محیط کشت مایع همراه با آنتی بیوتیک در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد 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 نو ترکیب استخراج و برای انجام تعیین توالی به شرکت Macrogen (کره جنوبی) فرستاده شد.

نتایج

با بررسی بیوانفورماتیکی نواحی کروموزومی اطراف ژن Oct4، یک RNA غیر کد کننده در بالادست این ژن به طول ۶۰۰ جفت باز مشاهده شد که به علت همبستگی این ناحیه با بیماری پسونریازیس به نام PSORS1C3 معرفی شده بود. این ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم ۶ در ناحیه 21.33 واقع شده است (شکل ۱).

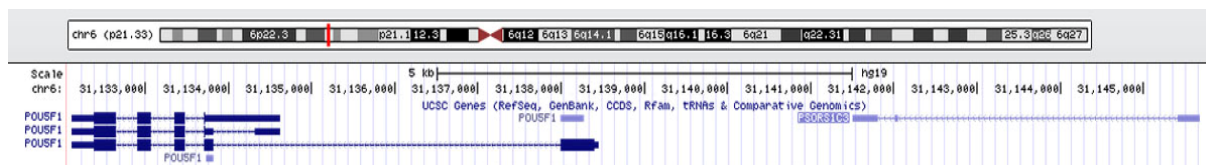
در واکنش PCR برای انجام چندین واکنش به صورت موازی و برای کاهش خطای احتمالی پیبت کردن، ابتدا یک مخلوط اصلی (Master Mix) کلی شامل آب، بافر، dNTP ها، آغازگرها و آنزیم Taq polymerase به ازای تعداد واکنش ها و یک نمونه اضافی درست شد و پس از تقسیم در تیوب های جداگانه به هر تیوب cDNA اختصاصی هر سلول اضافه شد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

- ۱- فعال شدن پلیمرز و واسرشتگی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه
- ۲- واسرشتگی DNA در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
- ۳- اتصال آغازگرها در دمای ۶۱ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه
- ۴- طولیل شدن محصول در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۴۲ ثانیه
- ۵- تکرار مراحل ۲-۴ برای ژن PSORS1C3 ۳۵ بار و برای GAPDH ۲۵ بار
- ۶- طولیل شدن نهایی محصول در دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۰ دقیقه

کلون سازی قطعه تکثیر شده ژن PSORS1C3

به منظور تعیین توالی قطعه تکثیر شده با اندازه مورد انتظار ۵۹۳ جفت بازی ژن PSORS1C3، این قطعه از روی ژل آغازز 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

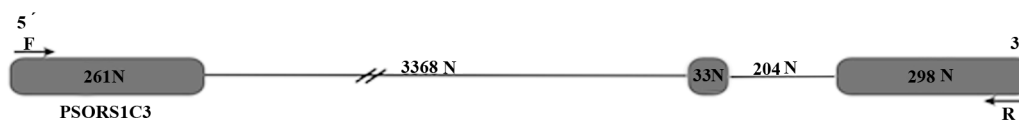
گونه‌ای طراحی شده بود که در ضمن تکثیر ژن وجود واریانت‌های احتمالی آن را نیز بتواند شناسایی کند. با این وجود به دلیل طراحی آغازگرها روی اگزون‌های مختلف، این آغازگرها قادر به تکثیر DNA ژنومی PSORS1C3 نبود. برای تکثیر قطعات مربوط به ژن‌های PSORS1C3 و GAPDH با توجه به T_m آغازگرها، دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد برای اتصال آغازگرها در PCR انتخاب شد. تعداد چرخه مناسب برای تکثیر ژن PSORS1C3، ۳۵ چرخه و برای ژن GAPDH، ۲۵ چرخه 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 اندکی دارد تشخیص داده شود و هم تکثیر ژن در نمونه‌هایی که بیان بالایی دارد، وارد فاز کفه (Plateau) نشده و در فاز نمایی (Exponential) باقی بماند.

به‌منظور بررسی احتمال بیان ژن PSORS1C3 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 ۲۸S، ۱۸S 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 آغازگرهای طراحی شده برای شناسایی بیان ژن PSORS1C3 در شکل ۲ نشان داده شده است. آغازگرها به



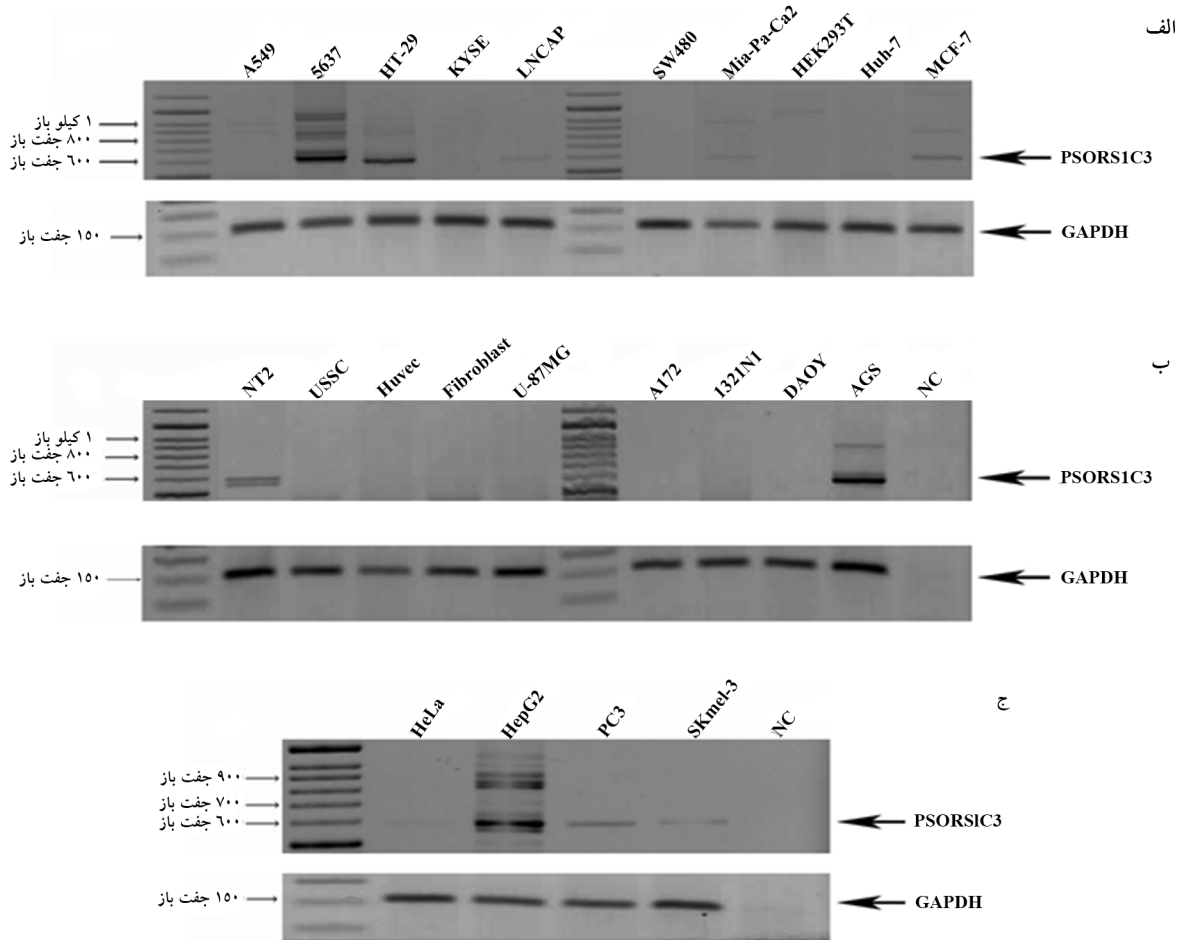
شکل ۲ شکل شماتیک از نواحی اگزون-اینترونی ژن PSORS1C3 و جایگاه آغازگرهای طراحی شده برای این ژن

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 به‌دست آمده از بافت‌های مغزی (U-87MG, A172, 1321N1 و DAOY)، جفت (Huvec)، ریه (A549)، مری (KYSE)، پانکراس (MIA-PaCa2)، کلیه (HEK293T)، پوست (SKMEL-3) و دهانه رحم (Hela) مشاهده نشد. همچنین

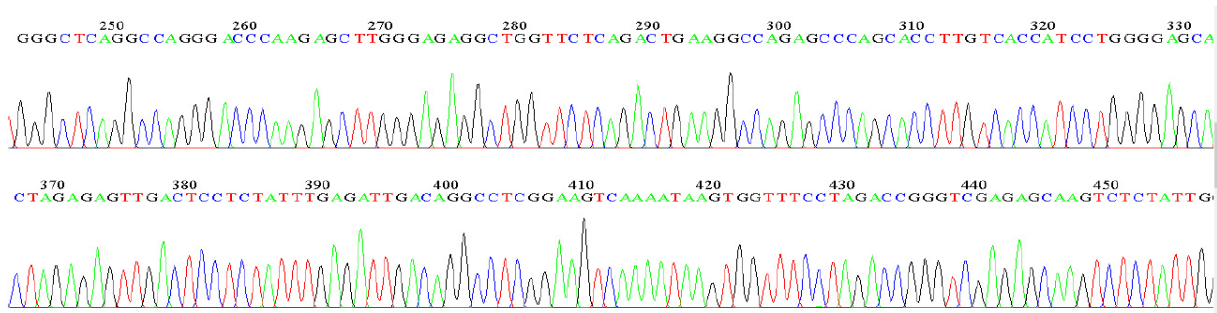
نتایج حاصل از RT-PCR برای شناسایی بیان ژن PSORS1C3 روی ۲۳ دودمان سلولی مورد بررسی در شکل ۳-الف، ۳-ب و ۳-ج نشان داده شده است. نتایج به‌دست آمده برای اولین بار بیان این ژن را در سلول‌های بنیادی جنینی NT2 تأیید کرد. علاوه بر این؛ این IncRNA تنها در ۶ دودمان سلولی سرطانی از میان ۲۳ دودمان سرطانی با منشأ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

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

دودمان سلولی طبیعی فیروپلاست 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 بروماید، 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 جنینی (Embryonic Stem: ES) و کارسینوما یوئانی (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]. Oct4 همچنین در سرطان‌های مثانه و پستان به میزان زیادی بیان می‌شود [۳۱، ۳۲]. یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که این lncRNA در سلول‌های پرتوان NT2 و سلول سرطانی مثانه 5637 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 دیگر، غیر فعال‌سازی کروموزوم X، نقش‌یست (Imprinting) ژنومی، حفظ تمامیت حیطه‌بندی‌های (Compartments) زیرسلولی، 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 نو ترکیب 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 نوروژنزی 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 است. این یافته‌ها نشان می‌دهد که PSORS1C3 که در بالادست عامل کلیدی پرتوانی سلول، Oct4، قرار گرفته در دودمان سلولی بنیادی NTera-2 و ۶ دودمان سلولی سرطانی ناشی شده از تومورهای معده (AGS)، مثانه (5637)، کولون (Ht-29)، کبد (HepG2)، پستان (MCF-7) و پروستات (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 بلات تأیید شده بود. یافته‌های بررسی حاضر نشان می‌دهد که این lncRNA به‌طور 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 به‌عنوان نشانگرهای

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از حمایت‌های مادی و معنوی ستاد توسعه

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

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, Ieko K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki 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, Tammoya K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovskiy 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, Collier J. Decapping of long noncoding RNAs regulates inducible genes. *Mol Cell* 2012; 45(3): 279-91.
- [12] Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammamparast 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, Ståhle 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, Baldrige 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, Ziaee 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.