بررسی بیان ژن MALAT1 در دودمان‌های سلولی میلوئیدی و لنفوئیدی

جواد احمدی (M.Sc)، سعید کاویانی *(Ph.D)، امیر آتشی (Ph.D)
دانشگاه تربیت مدرس، تهران، دانشکده علوم پزشکی، گروه هماتولوژی

چکیده

سابقه و هدف: اخیراً چندین RNA غیر کد شونده بلند مرتبط با سرطان از قبیل رونوشت مرتبط با متاستاز آدنوکارسینومای ریه (MALAT1، HOTAIR) و ANRIL شناسائی شده‌اند. مطالعات نشان داده‌اند که MALAT1، در بسیار ی از تومورهای توپر افزایش بیان داشته و نقش تنظیمی مهمی در بیولوژی، متاستاز و عود سرطان دارا می‌باشد. لوسمی میلوئیدی حاد (AML) و لوسمی لنفوئیدی حاد (ALL) گروهی از سرطان‌ها هستند که رده‌های میلوئیدی و لنفوئیدی سلول‌های خونی را درگیر می‌کنند و با رشد سریع سلول‌های سفید خون، انباشت سلول‌های سفید غیر طبیعی در مغز استخوان و اختلال در تولید سلول‌های طبیعی خون شناسایی می‌شوند.

مواد و روش‌ها: دودمان‌های سلولی KG1 و Jurkat به ترتیب در محیط‌های کشت IMDM و RPMI-1640 کشت داده شدند. RNA توتال از دودمان‌های سلولی و سلول‌های طبیعی مغز استخوان استخراج و سطوح بیان ژن MALAT1 با استفاده از تکنیک qRT-PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: بیان ژن MALAT1 در دودمان سلولی KG1 در مقایسه با سلول‌های طبیعی مغز استخوان افزایش معنی‌داری داشت (p<۰/۰۵)، در حالی که بیان ژن MALAT1 در دودمان سلولی Jurkat نسبت به نمونه نرمال کاهش یافته بود (p<۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که افزایش و یا کاهش بیان این RNA تنظیمی می‌تواند در بیولوژی این سرطان‌ها دخالت داشته و هم‌چنین دارای یک عمل‌کرد بالقوه به عنوان یک بیومارکر جدید برای تشخیص، پیش آگهی و متاستاز باشد.

واژه‌های کلیدی: سلول های جورکت، سرطان خون میلوئید حاد، لنفوم - سرطان خون با پیش سلول لنفوبلاستیک

مقدمه

AML یک بیماری کلونال و هتروژنوس سلول‌های پروژنیتور هماتوپوئتیک و یکی از شایع‌ترین بدخیمی‌های میلوئیدی در بالغین است که در آن توانائی تمایز سلولی و پاسخ به تنظیم‌کننده‌های نرمال تکثیر از بین می‌رود. سن بروز بیماری معمولاً ۷۰ سال به بالا و درصد شیوع آن ۳/۸ مورد در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر است که این مقدار با افزایش سن تا ۱۷/۹ مورد در هر ۱۰۰/۰۰۰ نفر افزایش پیدا می‌کند. AML با ناهنجاری‌های کروموزومی از قبیل ناهنجاری کروموزوم‌های ۵ و ۷ و هم‌چنین تریزومی کروموزوم ۸ در ارتباط است. میزان بهبودی از طریق شیمی‌درمانی در بیماران مبتلا به AML حدود ۸۵-۵۰٪ است، ولی با این وجود اکثر بیماران دچار عود بیماری شده و بعد از ۲ سال از بهبودی دچار مرگ می‌شوند [۱-۳]. لوسمی لنفوبلاستی حاد (ALL) غالباً به عنوان یک بدخیمی حاد در کودکان شناخته می‌شود که به علت تکثیر نابه‌جای لنفوسیت‌های B و T ایجاد می‌شود. در ایالات متحده آمریکا تقریباً سالیانه ۲۵۰۰ مورد جدید لوسمی حاد تشخیص داده می‌شود که ۸۰٪ از این موارد

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۲۱ ۸۸۰۱۳۰۳۰
Email: kavianis@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۵/۱۸ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۱/۳۰

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

مربوط به ALL می‌باشد. ALL سالانه باعث ابتلاء ۴-۲ کودک زیر ۱۵ سال در هر ۱۰۰۰۰۰ نفر می‌شود. خستگی، بی‌حالی، تب مداوم، تظاهرات خونریزی، درد استخوان و مفاصل از شایع‌ترین علائم ALL می‌باشد [۴-۶].

Long noncoding RNAs (lncRNA) به RNA های تنظیمی اطلاق می‌شود که طولی بیش‌تر از ۲۰۰ نوکلئوتید داشته باشند و به پروتئین کد نشوند. این ملکول‌ها نقش‌های تنظیمی کلیدی را در بیولوژی سرطان بازی می‌کنند. lncRNA ها در انواع مختلفی از سرطان‌ها از تنظیم خارج می‌شوند و سطوح بیان بعضی از آن‌ها با عود، متاستاز و پیش‌آگهی سرطان ارتباط دارد. هم‌چنین ثابت شده که افزایش بیان بعضی از lncRNA ها (مانند انکوژن‌ها) می‌تواند رشد تومور و matrix invasion سلول‌های سرطانی را افزایش دهد. به عنوان مثال افزایش بیان MALAT1 در کارسینوم هپاتوسلولار با مهار کاسپاز ۳ باعث القاء تکثیر (proliferation) و در نهایت متاستاز شده از طرفی تخلیه و کاهش MALAT1 در فیبروبلاست‌های نرمال انسانی (HDFs) پاسخی که متعاقب آسیب به DNA ایجاد می‌شود را القاء کرده و در نتیجه منجر به فعال‌سازی P53 و ژن‌های هدف آن و درنتیجه آپوپتوز می‌شود.

اخیراً چندین lncRNA به عنوان lncRNA مختص سرطان شناسائی شده‌اند که شامل MALAT1، HOTAIR و ANRIL می‌باشند. این lncRNA های مرتبط با سرطان اغلب به صورت نابه‌جا بیان می‌شوند و پیشرفت سرطان را تحت تاثیر قرار می‌دهند، لذا این احتمال وجود دارد که این ملکول‌ها بتوانند به عنوان بیومارکرهای جدید برای تشخیص، پیش‌آگهی، متاستاز و پیش‌گوئی پاسخ به درمان عمل کنند و هم‌چنین به عنوان اهداف درمانی جدید، مهار شده یا تحت کنترل درآیند [۷-۹].

MALAT1 (Metastasis associated lung adenocarcinoma transcript1) یا NEAT2 (noncoding nuclear_enriched abundant transcript2) یک lncRNA فراوان و منحصر در هسته با طولی در حدود ۸/۷ کیلوباز است که در سال ۲۰۰۳ به‌وسیله آقای Ji از طریق هیبریداسیون کاهشی به عنوان یک پارامتر پیش‌آگهی‌کننده متاستاز در بیماران مبتلا به آدنوکارسینومای ریه یا NSCL (فاز ۱) و بیماران مبتلا به کارسینومای سلول squamous شناسائی شد. در ژنوم انسان MALAT1 بروی کروموزوم q13 ۱۱، ناحیه‌ای که با تومورژنزیز و متاستاز در ارتباط است، قرار گرفته است. ژن MALAT1 به صورت حفاظت شده در ۳۳ گونه از پستانداران یافت می‌شود [۱۰،۸،۷]. MALAT1 در تنظیم کردن دو فرایند بیولوژیکی مهم دخالت دارد. این فرایندها عبارتند از: ۱- تنظیم بیان ژن ۲- آلترناتیو اسپلایسینگ MALAT1 (AS) یکی از تنظیم‌کننده‌های مهم تومورساپرسورها نیز است. یکی از مهم‌ترین تومورساپرسورها که به‌وسیله MALAT1 تنظیم می‌شود P53 است. کاهش و تخلیه سلول از MALAT1 منجر به فعال شدن P53 و متعاقب آن موجب مهار تکثیر سلول‌های توموری می‌شود [۹،۷-۱۱]. MALAT1 در مسیر آپوپتوز نیز دخالت دارد به این صورت که خاموش‌سازی MALAT1 باعث افزایش تنظیم کاسپاز ۳ و ۸ و کاهش تنظیم Bcl-2 و Bcl-xl می‌شود [۱۲،۷]. هم‌چنین این lncRNA در چندین تومور جامد (پستان، پانکراس، کولون، پروستات و سرطان کبد) به صورت مثبت تنظیم (upregulated) می‌شود و بیان افتراقی آن با متاستاز و عود سرطان در ارتباط است. MALAT1 به عنوان یک پارامتر پیش‌آگهی‌کننده برای بقاء بیماران مبتلا به آدنوکارسینوما و سلول اسکوآموس در مرحله‌ی ۱ بیماری و هم‌چنین یک پارامتر مرتبط با متاستاز در NSCLC (Non Small Cell Lung Carcinoma) شناخته شده است [۱۰]. با توجه به مطالب ذکر شده، می‌توان بیان داشت که MALAT1 نقش بسیار مهمی در فرایندهای مختلف سلولی از جمله تکثیر، تمایز، آپوپتوز، عود و متاستاز دارد، لذا اهمیت آن ما را بر آن داشت تا با توجه به شیوع بیماری AML و ALL، به عنوان اولین قدم در بررسی این RNA تنظیمی در این بیماری‌ها میزان بیان MALAT1 را در دودمان‌های سلولی مربوط به AML و ALL بسنجیم.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

مواد و روش‌ها

مواد. در این مطالعه کـه بـه روش تجربـی انجـام گرفـت، محیط‌های کشت IMDM و RPMI-1640 از شـرکت Sigma آلمـان و سـرم جنینـی گـاو ۲۰٪ از شـرکت Invitrogen، آنتی‌بیوتیک‌های استرپتومایسین و پنی‌سیلین از شرکت Gibco آلمان و فلاسک‌های کشـت سـلول از شـرکت jetbiofil تهیـه گردید. رده سلولی KG1 و JURKAT از انستیتوپاستور تهران (ایران) و محلول فایکول از شرکت GE Healthcare خریداری شد.

کشت سلول و استخراج RNA. رده‌های سـلولی KG1 و JURKAT به ترتیب در محیط‌های IMDM و RPMI-1640 غنـی‌شـده بـا سـرم جنینـی گـاو ۲۰٪، آنتـی‌بیوتیـک‌هـای استرپتومایسین (۱۰۰l/mlμ) و پنی‌سیلین (۱۰۰ U/ml) و ال- گلوتامین (mM2)، کشت داده شدند. سلول‌ها در مدت کشـت سلولی در انکوباتور بـا شـرایط co2 ۵٪، رطوبـت ۹۵٪ و در دمای ^{o}C ۳۷ قـرار گرفتنـد، و هـر ۲ روز یـک بـار پاسـاژ و تعویض مجدد محیط کشت صورت گرفت.

نمونه مغز استخوان طبیعی از افراد دهنـده پیونـد (donor) مراجعه‌کننده به بیمارستان شریعتی تهران تحت نظـر پزشـک و کسب رضایت آنان بر اساس دستورالعمل‌های اخلاق پزشـکی بیمارستان مذکور، تهیه گردید. با اسـتفاده از محلـول فـایکول سلول‌هـای تـک هسـته‌ای و سـلول‌هـای مربـوط بـه ناحیـه گلبول‌های قرمز جدا شد.

جهـت اسـتخراج RNA از سـلول‌هـای رده KG1 و JURKAT، از کیت Rneasy Mini kit (50) به روش سـتونی و بر طبق پروتکل به این ترتیب استفاده شد:

۱- سلول‌های مربوطه با PBS سرد شسته شد ۲- محلول رویی دور ریخته و سلول‌هـا بـه میکروپلیـت RNAase free انتقال داده شد ۳- میکروپلیت به مدت ۵ دقیقه در دور g ۳۰۰ سانتریفیوژ و سپس محلول رویی دور ریخته و میکروپلیت بـر روی دستمال خشک شد ۴- در یـک تیـوپ جدیـد بـه ۷۰۰ میکرولیتر محلول RLT، ۷ میکرولیتر محلـول 2-ME اضـافه، پیپتاژ و به سلول‌ها اضافه شد ۵- با اسـتفاده از یـک سـرنگ انسولین، محلول ۲۰-۱۰ مرتبه پیپتاژ شد ۶- محلـول داخـل میکروپلیت به ستون‌های DNA Eliminator (ستون‌های آبـی رنگ) منتقل و به مدت ۳۰ ثانیه در دور g ۸۰۰۰ سـانتریفیوژ شد ۷- به محلول زیر فیلتر، ۷۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ (تهیه شده با آب تزریقی) اضافه و پیپتاژ شد ۸- ۱۴۰۰ میکرولیتـر محلول در دو نوبت (هـر نوبـت ۷۰۰ میکرولیتـر) بـه سـتون RNeasy (ستون‌های صورتی رنگ) منتقل و ۲۰ ثانیه در دور g۸۰۰۰ سانتریفیوژ شـد ۹- ۵۰۰ میکرولیتـر بـافر RW1 بـه ستون صورتی رنـگ اضـافه و بـه مـدت ۲۰ ثانیـه در دور g۸۰۰۰ سانتریفیوژ و سپس محلـول زیـرین دور ریختـه شـد ۱۰- در یـک میکروپلیـت RNAse free، ۷۵ میکرولیتـر آب تزریقی، ۱۵ میکرولیتر محلول I DNase و ۱۵ میکرولیتر بـافر ریخته، مخلوط و به ستون صورتی رنگ اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد ۱۱- محلـول زیـرین دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول RW1 به ستون اضـافه و در دور g ۸۰۰۰ به مدت ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ و محلول زیرین دور ریخته شد ۱۲- ۵۰۰ میکرولیتر محلـول RPE بـه سـتون اضافه و در دور g ۸۰۰۰ به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد (این مرحله ۲ مرتبه انجام شـد) ۱۳- تیـوپ زیـرین میکروتیـوپ صورتی عـوض شـد و بـه جـای آن یـک میکروتیـوپ ۱/۵ میلی‌لیتری قرار داده شـد ۱۴-۵۰ میکرولیتـر آب تزریقـی در تیوپ صورتی ریختـه و بـه مـدت ۱ دقیقـه در دور g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد ۱۵- بلافاصله تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری بـر روی کیسه یخ قرار داده شد.

جهت استخراج RNA از سلول‌های مغز اسـتخوان طبیعـی جدا شده به روش فـایکول از کیـت QIAamp RNA Blood Mini Kit (50) و بر طبق پروتکل استفاده شد، به این ترتیـب که:

۱- یک حجم از نمونه بـا ۵ حجـم از بـافر EL در یـک تیوپ مناسب مخلوط شد ۲- محلول به مدت ۱۵ دقیقه بروی یخ انکوبه و هر ۲ دقیقه مختصراً به وسیله‌ی ورتکس مخلـوط شد ۳- محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سـانتی‌گـراد در

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

دورg ۴۰۰ سانتریفیوژ و محلول رویی کاملاً حذف شد ۴- دو حجم از بافر EL به تکمه سلولی اضافه و مختصراً به وسیله‌ی ورتکس مخلوط شد ۵- محلول به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی‌گراد در دور g ۴۰۰سانتریفیوژ و محلول رویی کاملاً حذف شد ۶- ۶۰۰ میکرولیتر بافر RLT به تیوپ اضافه و مخلوط شد ۷- محلول داخل میکروپلیت به ستون QIAshredder spin (ستون بنفش رنگ) منتقل و به مدت ۲ دقیقه با سرعت بالا سانتریفیوژ شد ۸- ۶۰۰ میکرولیتر اتانول ۷۰٪ به محلول اضافه و پیپتاژ شد ۹- محلول به ستون QIAamp spin (ستون سفید رنگ) منتقل و به مدت ۱۵ ثانیه در دور g ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد ۱۰- ستون سفید رنگ به یک تیوپ جدید منتقل و ۷۰۰ میکرولیتر بافر RW1 به آن اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه در دور g ۸۰۰۰ سانتریفیوژ شد ۱۱- در یک میکروپلیت RNAse free، ۷۵ میکرولیتر آب تزریقی، ۱۵ میکرولیتر محلول I DNase و ۱۵ میکرولیتر بافر ریخته، مخلوط و به ستون سفید رنگ اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای محیط قرار داده شد ۱۲- محلول زیرین دور ریخته شد و ۵۰۰ میکرولیتر محلول RW1 به ستون اضافه و در دور ۸۰۰۰g به مدت ۲۰ ثانیه سانتریفیوژ و محلول زیرین دور ریخته شد ۱۳- ستون سفید رنگ به یک تیوپ جدید منتقل، ۵۰۰ میکرولیتر بافر RPE اضافه و به مدت ۱۵ ثانیه در دور ۸۰۰۰g سانتریفیوژ شد (این مرحله دو مرتبه انجام شد) ۱۴- ستون سفید رنگ به یک میکروتیوپ جدید ۱/۵ میلی‌لیتری منتقل، ۵۰ میکرولیتر آب تزریقی اضافه و به مدت ۱ دقیقه در دورg ۸۰۰۰ سانتریفوژ شد ۱۵- بلافاصله تیوپ ۱/۵ میلی‌لیتری بر روی کیسه یخ قرار داده شد. پس از استخراج RNA، غلظت ۱ به ۵۰ از RNA تهیه و غلظت RNA استخراج شده از سلول‌ها به وسیله دانسیتومتری نوری (OD) مورد سنجش قرار گرفت و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجش و از غلظت و خلوص RNA استخراج شده اطمینان حاصل شد.

سنتز cDNA: به منظور ساخت cDNA از کیت CinnaGen استفاده شد.

۱۳ میکرولیتر RNA تام استخراج شده به همراه ۱ میکرولیتر پرایمر Oligo (dT) در ۶۵۰ C انکوبه شد و سپس master mix که شامل آنزیم M-MLV (۱ میکرولیتر)، آنزیم RNase Inhibitor (۱ میکرولیتر)، بافر X ۱۰(۲ میکرولیتر) و dNTP (۲میکرولیتر) می‌باشد به آن اضافه گردید. سپس میکروتیوپ‌ها در دستگاه ترموسیکلر (۱ ساعت در ۴۲°C، ۱۰دقیقه در ۷۰°C) قرار داده شد و نمونه‌های cDNA ساخته شدند. به منظور اطمینان از سالم بودن cDNA ساخته شده، نمونه‌ها توسط یک House Keeping gene مانند β-actin، با استفاده از PCR (۵ دقیقه °C ۹۴، ۳۰ ثانیه °C ۹۴، ۳۰ ثانیه °C۶۲، ۴۰ ثانیه °C ۷۲، ۵ دقیقه °C ۷۲ در ۴۰ سیکل) بررسی شد و در نهایت نمونه‌ها برای ژن MALAT1 مورد بررسی قرار گرفت.

PCR: برای هر واکنش از ۱۰ میکرولیتر master mix آماده با غلظت X2، ۲ میکرولیتر cDNA و ۰/۵ میکرولیتر از پرایمرهای Forward و Reverse استفاده شد و حجم نهایی با آب استریل به ۲۰ میکرولیتر رسانده شد. توالی پرایمرهای استفاده شده در جدول زیر نشان داده شده است (جدول ۱). جهت اطمینان از یکتا بودن محل اتصال پرایمرهای استفاده شده، در مورد هر دو پرایمر از نرم‌افزار BLAST در مورد ژنوم انسان جستجو انجام شد. مراحل PCR به‌صورت زیر می‌باشد:

۵ دقیقه °C ۹۴، ۳۰ ثانیه °C ۹۴، ۳۰ ثانیه °C ۶۲، ۴۰ ثانیه °C ۷۲، ۵ دقیقه °C ۷۲ در ۴۰ سیکل. محصولات PCR بروی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شدند. اندازه باندهای مربوط به ژن MALAT1، bp ۸۴ می‌باشد (شکل ۱و ۲).

Real-Time PCR: واکنش Real-Time PCR در دستگاه AB applied biosystems انجام شد. درون هر چاهک از پلیت ۴۶ خانه‌ای مخلوطی به حجم ۱۰ میکرولیتر متشکل از ۵ میکرولیتر مخلوط اصلی سایبرگرین (SYBR Green Master Mix) خریداری شده از شرکت Ampliqon، ۰/۳ میکرولیتر از پرایمرهای اختصاصی هر ژن، ۱ میکرولیتر cDNAو ۳/۷ میکرولیتر آب مقطر تهیه شد. برنامه زمانی و

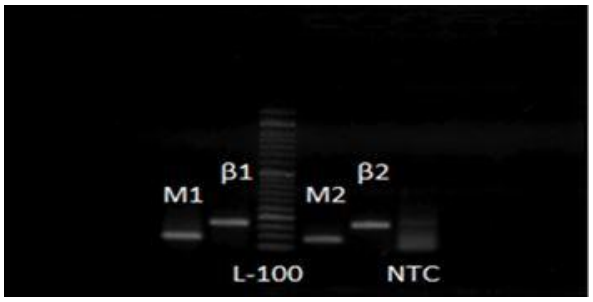
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

دمایی واکنشReal-Time PCR در دو مرحله عبارت است از:

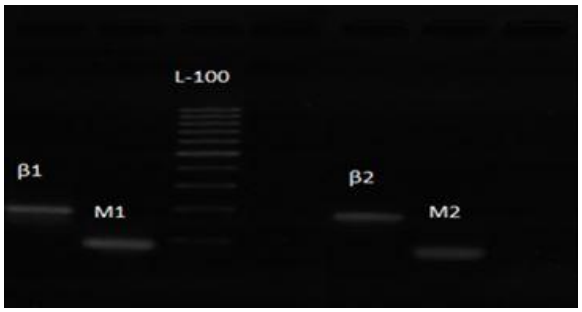
مرحله اول در یک چرخه به منظور فعال‌سازی آنزیم Taq پلیمراز شروع داغ (Hot start Taq polymerase) با دمای ۹۵°C به مدت ۱۰ دقیقه و مرحله دوم به صورت متناوب در طول ۴۰ چرخه با دمای ۹۵°C به مدت ۲۵ ثانیه و ۶۲°C به مدت ۶۰ ثانیه انجام شد. واکنش Real-Time PCR برای هر نمونه به صورت سه تایی (Triplecat) انجام شد.

جدول ۱. توالی پرایمرهای استفاده شده در بررسی بیان ژن MALAT1

	توالی	دمای انیلینگ	طول محصول
MALAT1(F)	5′ GAATTGCGTCATTTAAAGCCTAGTT3′	۶۰	۸۴
MALAT1(R)	5′ GTTTCATCCTACCACTCCCAATTAAT3′	۶۱	۸۴
β-Actin(F)	5′TGAAGATCAAGATCATTGCTCCC3′	۵۷,۲	۱۶۸
β-Actin(R)	5′AGTCATAGTCCGCCTAGAAGC3′	۵۶,۶	۱۶۸



شکل ۱: بیان ژن MALAT1 در رده سلولی Jurkat و سلول های طبیعی مغز استخوان.β1 و M1= بیان ژن MALAT1 و β actin در رده سلولی Jurkat. β2 و M2= بیان ژن MALAT1 و β actin در سلول های طبیعی مغز استخوان



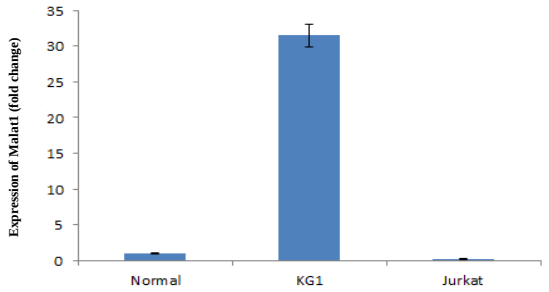
شکل ۲: بیان ژن MALAT1 در رده سلولی KG1 و سلول های طبیعی مغز استخوان. β1 و M1= بیان ژن MALAT1 و β actin در رده سلولی KG1. β2 و M2= بیان ژن MALAT1 و β actin در سلول های طبیعی مغز استخوان

نتایج

محاسبه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Ct: های محاسبه شده توسط دستگاه Real-Time PCR (جدول ۲) با استفاده از فرمول Pfaffl آنالیز و $2^{-\Delta\Delta Ct}$ های مربوط به سلول‌های طبیعی مغز استخوان و رده‌های سلولی KG1 و JURKAT توسط این فرمول محاسبه شد. با توجه به نتایج، بیان ژن MALAT1 در رده سلولی KG1 نسبت به بیان آن در سلول‌های طبیعی مغز استخوان با ضریب اطمینان ۹۵٪ افزایش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۳۲)، در حالی که بیان ژن MALAT1 در رده سلولی JURKAT نسبت به بیان آن در سلول‌های طبیعی مغز استخوان کاهش معنی‌داری داشت (p=۰/۰۰۲) (شکل ۳).

جدول ۲. CTهای محاسبه شده توسط qRT-PCR

CT	دودمان های سلولی		نمونه طبیعی مغز استخوان	
	β-Actin	MALAT1	β-Actin	MALAT1
KJ1	17.54	17.28	15.94	20.95
JURKAT	14.29	17.94	21.01	17.24



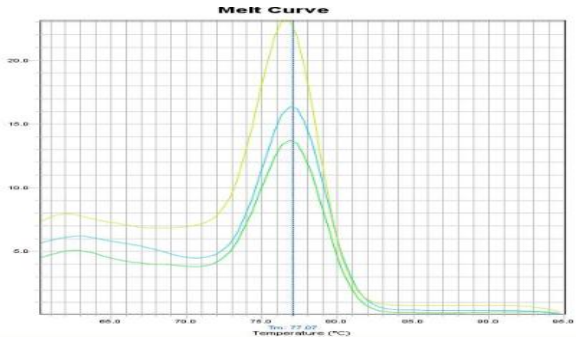
شکل ۳. مقایسه میانگین بیان ژن MALAT1 در رده های سلولی KG1 و JURKAT در مقایسه با سلول های مغز استخوان طبیعی

بررسی میانگین Ct های رده‌های سلولی KG1 و JURKAT با Ct های نمونه مغز استخوان طبیعی: بررسی میانگین Ct ها با استفاده از نرم‌افزار SSPS 18 انجام شد. داده‌هایی که به صورت سه تایی (Triplicate) توسط نرم‌افزار pfaffl محاسبه شده بود، با استفاده از نرم‌افزار SSPS 18 مورد بررسی قرار گرفت و آزمون t-test مستقل برای تمامی داده‌ها انجام شد.

بررسی کارایی پرایمرهای طراحی شده جهت شناسایی ژن MALAT1: پس از پایان هر سیکل Real-Time PCR

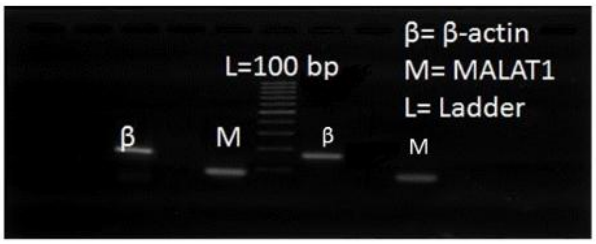
[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

منحنی‌های ذوب (melt curve) پرایمرهای مورد نظر آنالیز شد. نتایج حاکی از آن بود که محصولات واکنش، اختصاصی هستند (شکل ۴).



شکل ۴. منحنی های ذوب(Melt Curve) مربوط به پرایمر های MALAT1

تایید نتایج تکثیر ژن مورد نظر در واکنش Real-Time PCR با استفاده از ژل آگارز ۲٪ و نشانگر ۱۰۰bp: پس از انجام Real-time PCR، محصولات واکنش بروی ژل آگارز ۲٪ الکتروفورز شد. نتایج نشان داد که طول باند ایجاد شده بر روی ژل آگارز با طول ژن مورد نظر (MALAT1= 84bp) هم‌خوانی دارد (شکل ۵).



شکل ۵. الکتروفورز محصولات Real Time PCR بروی ژل آگارز ۲٪ با استفاده از نشانگر ۱۰۰bp

بحث و نتیجه‌گیری

سرطان به عنوان یک بیماری تهدیدکننده حیات بشر همواره توجه محققین را برای یافتن راه‌هایی برای تشخیص زود هنگام و یا یافتن راه‌های جدید درمانی به خود جلب کرده است. سرطان یک بیماری ژنتیکی است که به دنبال از تنظیم خارج شدن شبکه ژنومی و ایجاد تغییرات ژنتیک کلونال در ژن‌های تومور ساپرسور کلیدی و انکوژن‌ها به وجود می‌آید. از این رو مطالعه تغییرات ایجاد شده بر روی ماده ژنتیکی سلول‌ها از طریق موتاسیون و یا تغییرات اپی‌ژنتیکی و عوامل تاثیرگذار بر روی آن‌ها یک جنبه مهم و پویا در مطالعات ملکولی می‌باشد.

کشف نقش عناصر تنظیمی از قبیل RNA های غیر کدشونده یا Long none coding-RNAs (lncRNA) در بیان ژن‌ها می‌تواند یک پیشرفت کلیدی در کاوش مکانیسم‌های ملکولی سرطان باشد [۱۳].

lncRNA ها، RNA های غیر کد شونده‌ای هستند که در سرتاسر ژنوم یوکاریوت‌ها رونویسی می‌شوند. lncRNA ها نقش‌های مهمی در برنامه‌ریزی و تنظیم ژنوم پستانداران بازی می‌کنند. بیان lncRNA ها با بسیاری از بیماری‌های انسانی از جمله سرطان در ارتباط است. مکانیسم‌هایی که از طریق آن lncRNA ها منجر به توسعه سرطان می‌شوند متفاوت و گوناگون است. lncRNA ها باعث اعمال تغییرات اپی‌ژنتیک از قبیل متیلاسیون هیستون‌ها بر روی ژن‌های کدکننده پروتئین می‌شوند. شواهد موجود حاکی از آن است که یکی از نقش‌های اصلی lncRNA ها هدایت اختصاصی مجموعه‌های بازآرایی‌کننده کروماتین به جایگاه‌های خود برای تحت تاثیر قرار دادن تغییرات اپی‌ژنتیک است. مطالعات اخیر نشان داده‌اند که lncRNA ها چندین فرایند بیولوژیکی مهم از قبیل رونویسی، ترجمه، تمایز سلول، تنظیم بیان ژن، تنظیم سیکل سلولی، بازآرایی کروماتین و کنترل ترافیک بین هسته و سیتوپلاسم را تنظیم می‌کنند [۱۴،۱۳].

MALAT1 یک lncRNA است که در ابتدا به عنوان یک بیومارکر برای متاستاز در سرطان ریه شناسایی شده است [۱۴]. مطالعات نشان داده‌اند که MALAT1 به عنوان یک مارکر ژنتیکی بالقوه برای سرطان محسوب می‌شود و همچنین دارای نقش چشمگیری در رخدادهای ملکولی نئوپلاسم‌ها می‌باشد [۱۵]. بیان MALAT1 در بسیاری از سرطان‌ها از قبیل سرطان پستان، پانکراس، ریه، کلون، پروستات و کبد افزایش می‌یابد و بر زنده ماندن، تکثیر و مهاجرت سلولی و همچنین بر ایجاد کلونی سلولی و رشد تومور تأثیر می‌گذارد [۱۶،۱۰،۸]. اخیراً MALAT1 پتانسیل تومورژنیک خود را از

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

طریق تنظیم رونویسی p53 نشان داده است و هم‌چنین باعث افزایش تغییر سلول‌های اپیتلیالی به سلول‌های مزانشیمی (EMT) می‌شود، که این عمل را از طریق فعال‌سازی مسیر catenine_βwnt/ در سلول‌های سرطانی مثانه انجام می‌دهد [۱۷،۱۳]. بیان MALAT1 در مرحله‌ی پیشرفت سرطان از تنظیم خارج می‌شود و می‌توان از آن به عنوان یک تومور مارکر بالقوه برای تشخیص و مداخلات درمانی استفاده کرد [۱۵]. MALAT1 در سرطان سلول‌های کبدی در نمونه‌های توموری موشی و انسانی از تنظیم خارج می‌شود (upregulated) و با ریسک عود تومور بعد از پیوند کبد ارتباط دارد [۱۹،۱۸،۱۵]. این RNA تنظیمی در مراحل اولیه سرطان پستان از تنظیم خارج می‌شود upregulated [۲۰،۲۱] MALAT1 یک فاکتور پیش‌آگهی‌کننده منفی در بیماران مبتلا به استئوسارکوما است و با پاسخ تومور به شیمی‌درمانی ارتباط دارد [۲۲]. در این مطالعه میزان بیان ژن MALAT1 در رده سلولی لوسمی میلوئیدی حاد (KG1) و رده سلولی لوسمی لنفوئیدی حاد (JURKAT) نسبت به میزان بیان آن در سلول‌های مغز استخوان طبیعی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که میزان بیان ژن MALAT1 در رده سلولی KG1 نسبت به نمونه نرمال افزایش داشت، در حالی که میزان بیان آن در رده سلولی JURKAT نسبت به نمونه نرمال کاهش بیان داشت. این در حالی است که در خصوص میزان بیان این ژن در سرطان‌های خون مطالعه منتشر شده‌ای در پایگاه‌های اطلاعاتی یافت نشد اما در مورد سرطان‌های دیگر می‌توان بیان داشت که در سال ۲۰۰۶ و ۲۰۰۷ به ترتیب آقای Jain-Hua Luo و آقای Lin و همکاران در بررسی سرطان سلول‌های کبدی به این نتیجه رسیدند که MALAT1 در نمونه‌های توموری موشی و انسانی از تنظیم خارج می‌شود upregulated [۱۹،۱۵]. هم‌چنین در سال ۲۰۱۳ آقای Han و همکاران در بررسی سلول‌های سرطانی مثانه به این نتیجه رسیدند که MALAT1 در تکثیر سلولی تومور، مهاجرت سلولی و آپوپتوز را تحت تأثیر قرار می‌دهد و با درجه تومور در ارتباط است [۱۴]. در مطالعه‌ای دیگر آقای Ellis و همکاران در سال ۲۰۱۲ مشاهده کردند که MALAT1 در سرطان مجرای پستان حذف شده و یا جهش یافته است [۲۳،۲۱،۲۰].

در مطالعه حاضر، نتایج حاصله مبنی بر الگوی بیان ژن MALAT1 در رده سلولی KG1 با مطالعات انجام شده در سرطان‌های دیگر مطابقت دارد (بیان ژن MALAT1 نسبت به نمونه نرمال upregulated شده است) اما الگوی بیان آن در رده سلولی JURKAT با دیگر مطالعات انجام گرفته بر روی سرطان‌های دیگر متفاوت است (بیان ژن MALAT1 نسبت به نمونه نرمال downregulated شده است) و لذا می‌تواند نشان‌دهنده نقش بالقوه این RNA تنظیمی در بیولوژی این نوع سرطان‌ها باشد. در مجموع از آن‌جایی که در مورد میزان بیان ژن MALAT1 در سرطان‌های خون اطلاعاتی در دسترس نیست بنابراین این الگوی متفاوت بیان در این دو سرطان خون می‌تواند دریچه‌ای برای انجام مطالعات بیش‌تر در راستای کشف عمل‌کرد این RNA تنظیمی باشد.

منابع

[1] Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. The Lancet 2006; 368: 1894-1907.

[2] Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute myeloid leukemia. N Engl J Med 1999; 341: 1051-1062.

[3] Shipley JL, Butera JN. Acute myelogenous leukemia. Exp Hematol 2009; 37: 649-658.

[4] Poplack DG. Acute lymphoblastic leukemia. New Directions in Cancer Treatment: Springer; 1989; p: 546-551.

[5] Ali N. Acute lymphoblastic leukemia. 1990.

[6] Chan KW. Acute lymphoblastic leukemia. Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care 2002; 32: 40-49.

[7] Qiu M-T, Hu J-W, Yin R, Xu L. Long noncoding RNA: an emerging paradigm of cancer research. Tumor Biology 2013; 34: 613-620.

[8] Tano K, Akimitsu N. Long non-coding RNAs in cancer progression. Front Genet 2012; 3: 219.

[9] Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A, Giri S, Freier SM, Wu X, Zhang Y, Gorospe M, Prasanth SG, Lal A. Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. PLoS Genet 2013; 9: e1003368.

[10] Gutschner T, Hämmerle M, Diederichs S. MALAT1—a paradigm for long noncoding RNA function in cancer. J Mol Med 2013; 91: 791-801.

[11] Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. Mol Cell 2010; 39: 925-938.

[12] Guo F, Li Y, Liu Y, Wang J, Li Y, Li G. Inhibition of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in CaSki human cervical cancer cells suppresses cell proliferation and invasion. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2010; 42: 224-229.

[13] Li G, Zhang H, Wan X, Yang X, Zhu C, Wang A, He L, Miao R, Chen S, Zhao H. Long Noncoding RNA Plays a Key Role in Metastasis and Prognosis of Hepatocellular Carcinoma. Bio Med Res Int 2014; 2014.

[14] Han Y, Liu Y, Nie L, Gui Y, Cai Z. Inducing cell proliferation inhibition, apoptosis, and motility reduction by silencing long noncoding ribonucleic acid metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 in urothelial carcinoma of the bladder. Urology 2013; 81: e1-7.

[15] Lin R, Maeda S, Liu C, Karin M, Edgington T. A large noncoding RNA is a marker for murine hepatocellular carcinomas and a spectrum of human carcinomas. Oncogene 2007; 26: 851-858.

[16] Yang L, Lin C, Liu W, Zhang J, Ohgi KA, Grinstein JD, et al. ncRNA-and Pc2 methylation-dependent gene relocation between nuclear structures mediates gene activation programs. Cell 2011; 147: 773-788.

[17] Ying L, Chen Q, Wang Y, Zhou Z, Huang Y, Qiu F. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. Mol BioSyst 2012; 8: 2289-2294.

[18] Lai Mc, Yang Z, Zhou L, Zhu Qq, Xie Hy, Zhang F, et al. Long non-coding RNA MALAT-1 overexpression predicts tumor recurrence of hepatocellular carcinoma after liver transplantation. Med Oncol 2012; 29: 1810-1816.

[19] Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, et al. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. Hepatology 2006; 44: 1012-1024.

[20] Ellis MJ, Ding L, Shen D, Luo J, Suman VJ, Wallis JW, et al. Whole-genome analysis informs breast cancer response to aromatase inhibition. Nature 2012; 486: 353-360.

[21] Guffanti A, Iacono M, Pelucchi P, Kim N, Soldà G, Croft LJ, et al. A transcriptional sketch of a primary human breast cancer by 454 deep sequencing. BMC Genomics 2009; 10: 163.

[22] Fellenberg J, Bernd L, Delling G, Witte D, Zahlten-Hinguranage A. Prognostic significance of drug-regulated genes in high-grade osteosarcoma. Mod Pathol 2007; 20: 1085-1094.

[23] Praz V, Jagannathan V, Bucher P. CleanEx: a database of heterogeneous gene expression data based on a consistent gene nomenclature. Nucleic Acids Res 2004; 32: D542-D547.

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]

Evaluation of MALAT1 gene expression in AML and ALL cell lines

Javad Ahmadi (M.Sc), Saeid Kaviani (PhD)*, Amir Atashi (PhD)
Dept. of Hematology, Faculty of Medical sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 9 Aug 2014; Accepted: 19 Apr 2015)

Introduction: Recently, several long non-coding RNAs (lncRNAs) have been identified as being cancer-specific, namely metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1 (MALAT1), HOTAIR, and ANRIL. Studies have revealed that MALAT1, is up-regulated in many solid tumors and it have important regulatory roles in cancer biology, metastasis and recurrence. Acute myeloid leukemia (AML) and Acute lymphoblastic leukemia (ALL) are cancers of the myeloid and lymphoid blood cells lines, characterized by the rapid growth of abnormal white blood cells that accumulate in the bone marrow and interfere with the production of normal blood cells.

Materials and Methods: KG1 and Jurkat cell lines cultured in IMDM and RPMI-1640 mediums respectively. Total RNA extracted from the cell lines and normal bone marrow cells and MALAT1 gene expression was measured by qRT-PCR.

***Results*:** MALAT1 gene expression was significantly increased in the KG1cell line ($P < 0.05$), while decreased in Jurkat cell line in compare to normal bone marrow cells ($P < 0.05$).

Conclusion: Our findings suggest that MALAT1 may function as novel biomarker for diagnosis, prognosis, metastasis, and predicting the response to therapy for the aforementioned types of cancers.

Keywords: Jurkat cells, Leukemia myeloid acute, Precursor cell lymphoblastic Leukemia-lymphoma, MALAT1 long non-coding RNA, human

* Corresponding author. Tel: +98 21 88013030
kavianis@modares.ac.ir

[Downloaded from koomeshjournal.semums.ac.ir on 2024-07-03]