

## بررسی بیان hsa-miR-6165 در روند تمایز شبه عصبی سلول‌های بنیادی NT2

مریم حسنلو<sup>1</sup>، بهرام محمد سلطانی<sup>2\*</sup>، سید جواد مولی<sup>3</sup>

1- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

2- دانشیار گروه ژنتیک مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

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

\* تهران، صندوق پستی 14115-111

soltanib@modares.ac.ir

(دریافت مقاله: 94/5/8 پذیرش مقاله: 94/10/23)

**چکیده-** نوروتروفین‌ها خانواده‌ای از فاکتورهای رشد ترشحی هستند که عملکرد خود را از طریق اتصال به گیرنده‌های اختصاصی (Trkها) و یا گیرنده عمومی خود (p75<sup>nr</sup>) انجام می‌دهند. P75<sup>nr</sup> نقش مهمی در بقا، تمایز و تکثیر بسیاری از انواع سلول‌ها دارد. MicroRNAها RNAهای کوچک غیر کد کننده‌ای هستند که باعث تنظیم پس از رونویسی بیان mRNA می‌شوند. اخیراً در ایترون شماره چهار گیرنده P75<sup>nr</sup> یک miRNA به نام hsa-miR-6165 کشف شده است. بررسی‌های بیوانفورماتیکی حاکی از نقش این miRNA در تنظیم بسیاری از مسیرهای پیام‌دهی سلولی و نیز مسیرهای دخیل در تمایز می‌باشد. بنابراین در تحقیق حاضر، بیان hsa-mir-6165 در روند تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی NT2 و همچنین در رده‌های سلولی عصبی و غیرعصبی انسانی بررسی شد. نتایج بیانگر آن است که hsa-miR-6165 نه تنها در روند تمایز سلول‌های NT2 و سلول‌های عصبی بیان می‌شود، بلکه در بسیاری از رده‌های سلولی غیرعصبی از جمله hFSF و Hela نیز بیان بالایی نشان می‌دهد. همچنین، بیان این miRNA بر خلاف ژن میزبان، در مراحل پایانی تمایز سلول‌های NT2 افزایش می‌یابد. این نتایج پیشنهاد کننده نقش داشتن hsa-mir-6165 در تمایز سلولی عصبی است. مطالعات بیشتری در این زمینه لازم است.

کلید واژگان: hsa-miR-6165، P75<sup>nr</sup>، تمایز عصبی.

### 1- مقدمه

می‌تواند منجر به بروز پاسخ آپوپتوز و نیز تکامل و بازسازی سیستم عصبی شود [1]. همچنین بیش بیان این ژن در بسیاری از شرایط پاتولوژیکی نظیر آترواسکلروز، ایسکمیا، انواع دیابت‌ها و سرطان دیده شده است [2-5]. P75<sup>nr</sup> می‌تواند در بسیاری از انواع

P75<sup>nr</sup> یک گیرنده سطح سلولی با عملکردهای مختلف است که در بسیاری از انواع سلول‌های انسانی از جمله سلول‌های رده‌های مغزی بیان می‌شود. این گیرنده

انکوباتور 37 درجه سانتی‌گراد با 5% CO<sub>2</sub> انکوبه شد. هفته‌ای یک بار محیط داخل فلاسک‌ها تجدید شد. رتینوئیک اسید نیز هفته‌ای دو بار تجدید شد. محیط فلاسک‌ها در روزهای 8 و 21 پس از تمایز تخلیه شده و RNA آنها توسط ترايزول استخراج شد. یک فلاسک نیز بدون افزودن رتینوئیک اسید، ولی در حضور DMSO کشت داده شد تا به عنوان کنترل برای نرمال‌سازی داده‌های qRT-PCR استفاده شود. پس از استخراج RNA و سنتز cDNA، الگوی تغییرات بیان مارکرهای عصبی و بنیادی بودن و همچنین بیان has-miR-6165 بررسی شد.

### 3-2- طراحی و آماده‌سازی پرایمرها

به کمک نرم‌افزارهای Primer3، Oligo و IDT OligoAnalyzer پرایمرهای مورد نیاز طراحی شد.

### 4-2- استخراج RNA، سنتز cDNA و انجام واکنش

#### Real-Time PCR

RNA رده‌های سلولی مختلف به کمک ترايزول (شرکت Invitrogen) و طبق دستورالعمل شرکت استخراج شد. پس از بررسی کمی و کیفی آن، با آنزیم DnaseI (شرکت فرمتناز) تیمار و به کمک پرایمر الیگو dT و رندوم هگزامر و آنزیم نسخه‌بردار معکوس از روی آن cDNA سنتز شد. به کمک آنزیم پلی پلی A پلیمراز و در حضور ATP (فرمتناز) به انتهای 3' مجموعه miRNAها یک توالی پلی A اضافه شد، سپس به کمک پرایمر الگو dT دنباله دار و در حضور آنزیم نسخه بردار معکوس (فرمتناز) واکنش سنتز cDNA صورت گرفت. به کمک پرایمرهای طراحی شده و در حضور شناساگر Evagreen واکنش qRT-PCR انجام شد. برنامه دستگاه برای انجام 40 دوره به ترتیب زیر انجام شد: 95 درجه سانتی‌گراد 15 ثانیه، 60 درجه سانتی‌گراد 20 ثانیه و 72 درجه سانتی‌گراد 20 ثانیه. داده‌های واکنش qRT-PCR به کمک روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و به کمک نرم‌افزار

سرطان‌ها به عنوان یک مهار کننده تومور عمل کند و سبب آپوپتوز و مهار تهاجم متاستازی شود. همچنین دیده شده است که این گیرنده در گلیوما و ملانوما باعث ایجاد پاسخ‌های تهاجم و متاستاز می‌شود [6,7]. لیگاندهای مختلفی برای P75<sup>ntr</sup> شناسایی شده است که بسته به شرایط سلول با تاثیر در انواع مختلفی از مسیرهای پیامدهی سلولی، سبب بقا یا مرگ سلول می‌شود [8]. همچنین عملکرد مستقل از لیگاند نیز برای این گیرنده سطح سلولی گزارش شده است [9]. اخیراً در اینترون چهار p75ntr یک MicroRNA تحت عنوان has-miR-6165 پیدا شده که مطالعات اولیه از نقش آن در به‌راه انداختن مسیرهای پیش آپوپتوزی خبر می‌دهد [10,11]. در این تحقیق بیان این miRNA در مسیر تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی انسانی NT2 و رده‌های سلولی عصبی و غیرعصبی انسان مورد بررسی قرار گرفت.

### 2- مواد و روشها

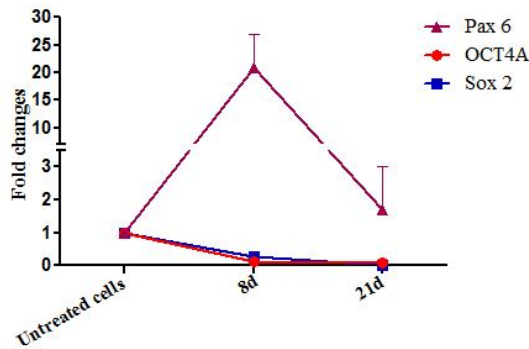
#### 2-1- کشت رده‌های سلولی جانوری

رده‌های سلولی NT2، A172، SKNMC، U87MG، MCF7، HUH7، SW480 و Fibroblast پوستی انسانی در محیط H-DMEM (Invitrogen) و سلول 5637 در محیط RPMI (Invitrogen) به همراه 10 درصد سرم گاوی جنینی (FBS، Invitrogen) کشت داده شد.

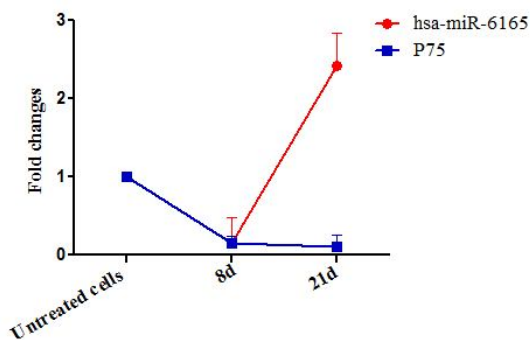
#### 2-2- تمایز سلول‌های NT2

سلول‌های NT2 بر اساس پروتکل ارائه شده توسط پیتر اندرو 1984 [12] انجام شد. برای این کار، تعداد 130000 سلول NT2 در فلاسک‌های T12 توزیع شد و داخل هر فلاسک 3 میلی‌لیتر محیط کشت کامل H-DMEM ریخته شد سپس به هر کدام از این فلاسک‌ها 3 میکرولیتر از رتینوئیک اسید-ترانس با غلظت  $10^{-2}$  مولار اضافه شد، (رتینوئیک اسید در DMSO حل شده بود)، و در

می‌رسد که بیان این miRNA پس از یک کاهش در روز هشتم در روز بیست و یکم افزایش می‌یابد.



شکل 2 بیان مارکرهاى بنیادی بودن و تمایز عصبی در طول تمایز سلول‌های NT2



شکل 3 لگوی بیان hsa-miR-6165 و p75 در طول تمایز سلول‌های NT2

#### 4- بحث

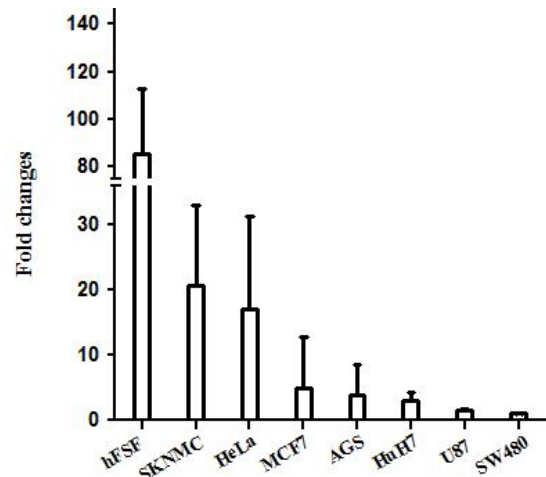
hsa-miR-6165 در اینترون چهارم گیرنده نروتروفینی  $p75^{ntr}$  قرار دارد [11]. مشخص شده است که  $p75^{ntr}$  در سلول‌های مختلفی از بدن و نه تنها در سلول‌های عصبی بلکه در سلول‌هایی خارج از سیستم عصبی مرکزی نیز بیان می‌شود [13]. ر مطالعه حاضر نیز بیان hsa-miR-6165 نه تنها در سلول‌های عصبی دیده شد بلکه بیشترین بیان آن در سلول‌های غیرعصبی یعنی فیبروبلاست پوستی جنینی مشاهده گردید (شکل 1). پیش از این، گزارش‌هایی بر نقش  $p75^{ntr}$  در تکامل سلول‌های جنینی

GraphPad آنالیز آماری شد.

### 3- نتایج

#### 3-1 بیان hsa-miR-6165 در رده‌های سلولی مختلف

به کمک واکنش PCR در زمان واقعی (qRT-PCR) بیان hsa-miR-6165 در رده‌های سلولی مختلف با منشا عصبی و غیرعصبی مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج نشان داد که در میان رده‌های سلولی بررسی شده، بیان hsa-miR-6165 کمترین بیان را در رده سلولی SW480 دارد و بیشترین بیان را در رده سلولی hFSF که فیبروبلاست پوستی جنینی انسان است، دارا می‌باشد (شکل 1).



شکل 1 بیان hsa-miR-6165 در رده‌های سلولی مختلف

#### 3-2 بیان hsa-miR-6165 در روند تمایز سلول‌های

##### بنیادی کارسینومای جنینی انسانی NT2

به کمک رتینوئیک اسید، سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی انسانی NT2 طی روندی 21 روزه به سلول‌های شبه عصبی تمایز داده شد. سپس، مارکرهاى بنیادی بودن و عصبی برای اطمینان از تحصیل تمایز مورد ارزیابی قرار گرفتند. پس از اطمینان از تمایز سلول‌ها، بیان hsa-miR-6165 در طول روند تمایز یعنی در روزهای هشتم و بیست و یکم مورد ارزیابی قرار گرفت (شکل 2). همان‌طور که شکل 3 نشان داده شده است، به نظر

- [5] Wang S, Bray P, McCaffrey T, March K, Hempstead BL, et al. (2000) p75(NTR) mediates neurotrophin-induced apoptosis of vascular smooth muscle cells. *Am. J. Pathology* 157(4), 1247–1258.
- [6] Marchetti D, Aucoin R, Blust J, Murry B, Greiter-Wilke A (2004) NGFR neurotrophin receptor functions as a survival receptor in brain-metastatic melanoma cells. *J. Cell. Biochem* 91(1), 206–215: DOI: 10.1002/jcb.10649. 10. Kanik AB, Yaar M, Bhawan J (1996) NGFR nerve growth factor receptor staining helps identify desmoplastic and neurotropic melanoma. *Journal of Cutaneous Pathology* 23(3), 205–210: DOI: 10.1111/j.1600-0560.1996.tb01468.x.
- [7] Johnston AL, Lun X, Rahn JJ, Liacini A, Wang L, et al. (2007) The NGFR neurotrophin receptor is a central regulator of glioma invasion. *PLoS Biol* 5(8) e212: DOI: 10.1371/journal.pbio.0050212.
- [8] Blochl A, Blochl R (2007) A cell-biological model of NGFR signaling. *J. Neurochem* 102(2), 289–305: DOI: 10.1111/j.1471-4159.2007.04496.x.
- [9] Vilar M, Charalampopoulos I, Kenchappa RS, Reversi A, Klos-Applequist JM, Karaca E, et al. (2009) Ligand-independent signaling by disulfide-crosslinked dimers of the p75 neurotrophin receptor. *Journal of Cell Science* 122(18), 3351–3357: doi: 10.1242/jcs.055061.
- [10] Barker PA (2009) A p75NTR pivoting paradigm propels perspicacity. *Neuron*(1)62: 5-3, doi:10.1016/j.neuron.2009.04.005.
- [11] Parsi S. (2012) Experimental Verification of a Predicted Intronic MiRNA in Human NGFR Gene with a Potential Pro-Apoptotic Function. *PlosONE*: 7(4) e35561.
- [12] Andrews P.W. (1984). Retinoic acid induces neuronal differentiation of a cloned human embryonal carcinoma cell line in vitro. *Dev. Biol.*103:285–293
- [13] Roux P. P., Barker A. P., (2002). Neurotrophin signaling through the p75 neurotrophin receptor, *Progress in Neurobiology* 67, 203–233.
- [14] Botchkareva N. V., Botchkarev V. A., et al. (1999). A Role for p75 Neurotrophin Receptor in the Control of Hair Follicle Morphogenesis, *Developmental Biology* 216, 135–153.

دیده شده است [14]؛ که به نظر می‌رسد بیان این miRNA بتواند توجه کننده بخشی از عملکردهای p75<sup>NTR</sup> در این سلول‌ها باشد.

از آنجا که طی تمایز سلول‌های بنیادی NT2 به سلول‌های عصبی، الگوی بیانی متفاوتی بین بیان p75<sup>NTR</sup> و hsa-miR-6165 در انتهای دوره تمایز دیده شد (شکل 2-ب)، به نظر می‌رسد که مطالعات بیشتری برای بررسی وجود پروموتور مستقل در بالادست این miRNA لازم باشد. بررسی اهداف پیش‌بینی شده برای این miRNA نشان می‌دهد که بیشتر این اهداف در مسیرهای سیگنال‌دهی مهم و مختلفی از جمله Wnt، PI3K و مسیرهای پیامدهی منتهی به سرطان نقش دارند. این مطلب بیانگر اهمیت این miRNA و نیاز مبرم انجام مطالعات آزمایشگاهی بیشتر بر روی آن است.

## 5- منابع

- [1] Gao X, Daugherty RL, Tourtellotte WG (2007) Regulation of low affinity neurotrophin receptor (NGFR) by early growth response (egr) transcriptional regulators. *Mol. Cell. Neurosci* 36(4), 501–514: doi: 10.1016/j.mcn.2007.08.013.
- [2] Cantarella G, Lempereur L, Presta M, Ribatti D, Lombard G, et al. (2002) Nerve growth factor-endothelial cell interaction leads to angiogenesis in vitro and in vivo. *The FASEB J.* 16(10), 1307–1309: doi: 10.1096/fj.01-1000fje.
- [3] Caporali A, Pani E, Horrovoets AJG, Kraenkel N, Oikawa A, et al. (2008) Neurotrophin NGFR receptor (NGFR) promotes endothelial cell apoptosis and inhibits angiogenesis: Implications for diabetes-induced impaired neovascularization in ischemic limb muscles. *Circ. Res* 103(2), e15-e26: doi: 10.1161/CIRCRESAHA.108.177386.
- [4] Salis MB, Graiani G, Desortes E, Caldwell RB, Madeddu P, et al. (2004) Nerve growth factor supplementation reverses the impairment, induced by type 1 diabetes, of hindlimb post-ischaemic recovery in mice. *Diabetologia* 47(6), 1055–1063: DOI: 10.1007/s00125-004-1424-5.