DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6
مقاله پژوهشی

ارزیابی بیان RNA طویل غیرکدکننده RMST در پی القای تمایز نورونی در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2

نجمه عباسی[۱]، حسین فهیمی[۱]، سید حمید جمال الدینی عزآبادی[۱]، ریحانه رمضانی[۲*] و صادق باباشاه[۳*]

[۱] ایران، تهران، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی، دانشکده علوم و فناوری های نوین، گروه ژنتیک

[۲] ایران، تهران، دانشگاه الزهرا، پژوهشکده زنان، گروه خانواده درمانی

[۳] ایران، تهران، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی،گروه ژنتیک

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۰۳/۲۴ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۴/۱۴

چکیده

نورون زایی فرآیندی محدود است که در یک دوره بعد از تولد و در بزرگسالان نیز در دو منطقه زیر بطنی و هیپوکامپ مغز انجام می‌گیرد، به همین دلیل جایگزین کردن سلول عصبی به جای سلولهای تخریب شده برای درمان بیماریهای انحطاط عصبی، راه حلی ارزشمند است. اگرچه RNA های طویل غیرکدکننده در بسیاری از فرآیندهای سلولی درگیر می‌باشند، نقش آنها در تنظیم روند تمایز نورونی کاملاً شناسایی نشده است. بر این اساس این مطالعه به بررسی تغییرات بیانی RNA طویل غیرکدکننده RMST، در طی روند تمایز عصبی در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی می‌پردازد. در این مطالعه ابتدا سلولهای NT2 همراه با رتینوئیک اسید و کوکتیل تمایزی به سلولهای شبه عصبی متمایز شدند و روند تمایز ۷ روز ادامه پیدا کرد. سپس برای ارزیابی بیان مارکرهای عصبی و RNA طویل غیر کد کننده‌ی RMST، از روش Q-RT-PCR استفاده شد. در طی تمایز عصبی سلولهای NT2 افزایش معناداری در میزان بیان رونوشت ژنهای مارکر عصبی NSE و MAP2 مشاهده شد ($***P < 0.0001$). نتایج همچنین حاکی از افزایش بیان RNA طویل غیرکدکننده RMST در روز هفتم تمایز عصبی نسبت به گروه کنترل بود ($***P < 0.001$). تغییرات بیانی که در سطوح این lncRNA رخ داده است، پیشنهاد دهنده نقش بالقوه آن در طی روند نورون-زایی و تمایز عصبی می‌باشد. بنابراین از آن جا که lncRNA ها فعالیت تنظیمی رخدادهای سلولی را بر عهده دارند، شناسایی تغییرات بیانی RNA طویل غیر کد کننده RMST در طی روند تمایز عصبی می‌تواند گویای مسیر تنظیمی ویژه‌ای برای نورون‌زایی باشد.

واژه های کلیدی: RNA طویل غیرکدکننده، سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2، تمایز نورونی

* نویسندگان مسئول، تلفن: ۰۲۱۸۵۶۹۲۰۹۵ ، پست الکترونیکی: babashah@modares.ac.ir و re.ramezani@alzahra.ac.ir

مقدمه

بافت عصبی دارای ظرفیت محدودی برای ترمیم پس از آسیب است زیرا نورونهای بالغ فاقد توانایی ترمیم می‌باشند و نیز در مغز بالغ، نوروژنز به نواحی هیپوکامپ، ساب ونتریکولار و سیستم بویایی محدود شده است. از این رو، یافتن عوامل کلیدی درگیر در تنظیم تکوین سیستم عصبی، جهت به دست آوردن راهکار مناسب در ترمیم بافتهای آسیب دیده عصبی و به تبع آن درمان بیماریهای عصبی از اهمیت فراوانی برخوردار است (۷و۱۶).

یکی از عوامل مهم دخیل در تمایز عصبی، تغییر در بیان RNAهای غیرکدکننده می باشد که یکی از مهم ترین گروه از این RNAها، RNAهای طویل غیرکدکننده می باشند (۲۲). مطالعات Mercer و همکارانش در سالهای ۲۰۰۸ و

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6
مقاله پژوهشی

۲۰۱۰ و مطالعات Ponjavic و همکارانش در سال ۲۰۰۹ نشان داده است که LncRNAs (Long Non Coding RNA) نقش مهمی در مدولاسیون سلولهای عصبی را دارند (۱۲).

یکی از مهمترین مسائلی که محققان علم ژنتیک به دنبال شناخت آن بودند، مطالعه مکانیسمهای مختلف درون سلولی است که با همکاری یکدیگر در تنظیم بیان ژنها نقش دارند (۱). RNAهای غیر کد کننده با استفاده از روش تداخل RNA بیان ژنهای مختلف را در سطوح مختلف از قبیل: رونویسی، پردازش و ترجمه تنظیم می‌کنند (۲). LncRNAها رونوشتهای بلندی از RNA با طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که هیچ پروتئینی را کد نمی کنند. بسیاری از LncRNAها شبیه به mRNA هستند، به این معنی که RNA پلیمرازII از لوکوسهای ژنی با نواحی کروماتینی رونویسی می شوند. ساختار LncRNA ها شبیه به mRNAها است یعنی اغلب شامل پردازش، پلی آدنیلاسیون و کلاهک '۵ می باشند. مطالعات گسترده ای که روی بیان LncRNAها انجام شده به طور کلی نمایه‌های خاص بیانی از mRNA ها را نشان می دهند یعنی آنها در انواع سلولها، بافتها، مرحله تکاملی یا بیماری خاصی بیان می شوند. lncRNA ها در تنظیم ساختار کروماتین، تنظیم رونویسی، فرایندهای پس از رونویسی، تنظیم اپیژنتیک، تنظیم چرخه سلولی، آپاپتوز و پردازش RNA های کوچک نقش دارند. lncRNAها به عنوان داربست برای نگهداری پروتئینها برای جایگاههای خاصی از کروماتین عمل می کنند و یا ساختار موضعی کروماتین را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۱۵).

در سلولهای بنیادی چند توان، LncRNA ها با کمپلکس تغییر کروماتین و فاکتورهای رونویسی در حفظ Stem ness عملکرد دارند (۱۳). در حالی که یک تعداد از lncRNA ها به صورت سیس عمل می کنند و بیان mRNA را در طول تکامل تنظیم می‌کنند (۱۹). lncRNAها همچنین نقش مهمی در مدولاسیون سرنوشت سلول عصبی دارد (۱۱)، با مطالعات گسترده ی ژنومی مشخص شد lncRNA رابدومیوسارکم (Rhabdomyosarcom) با رونویسی در ارتباط است، بنابراین یک lncRNA ضروری برای تمایز نورونی می‌باشد (۱۳).

RMST دارای ۱۱ اگزون می باشد که در روی کروموزوم ۲۱q۱۲ قرار گرفته است و از لحاظ رونویسی با پیرایش متناوب در ژن lncRNA تنظیم می‌شود (۲۱). RMST اولین بار به عنوان lncRNA مهمی برای تشخیص عصبی مشخص شد. در مطالعه بعدی آشکار گردید که RMST به شدت در تنظیم تمایز عصبی انسان نقش دارد (۱۳). خاموش سازی RMST از تمایز عصبی جلوگیری می کند، مطالعات دیگر مشخص کرد که RMST در تنظیم نورونزایی نقش دارد (۳). RMST به عنوان (non-coding RNA in RMS NCRMS) شناخته شده و همچنین در رونویسی ژن PAX2 در مغز میانی نقش دارد، علاوه براین برخی دیگر از آنالیزها نشان دادند که یک ناحیه اتصالی بالادست RMST از REST وجود دارد که نشان می دهد RMST از لحاظ رونویسی توسط REST تنظیم می‌شود (۵).

RMST یک lncRNA چند اگزونی است که سه ایزوفرم پیرایش متغیر در سلولهای انسان دارد: AK056164 (2.5kb)، AF429305 (1.1kb) و AF4229306 (1.1kb). در موشهای بالغ بیانی از ایزوفرم RMST2 kb به طور گسترده محدود به CNS است (۲۱).

lncRNA RMST هسته های تمایز نورونی را تنظیم می کند و با رونویسی فاکتور SOX2 مرتبط است. ارتولوگهای RMST از انسان به قورباغه به خوبی در ناحیه تنظیم ژن مورد بحث و بررسی قرار گرفته اند که شامل نواحی پروموتوری، اولین اگزون و نواحی پیرایش می‌باشد (۶). خاموش سازی RMST در نورون پیشگام به وسیله siRNA ها از تمایز نورونی جلوگیری می کند و همچنین بیان بالایی از ایزوفرم بزرگ RMST(AK۰۵۶۱۶۴) در نورون انسانی پیشگام منجر به افزایش بیان مارکر نورونی شده که نشان دهنده اهمیت RMST در تمایز نورونی می‌باشد (۱۲).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6
مقاله پژوهشی

با توجه به ظرفیت محدود سیستم عصبی در ترمیم و با در نظر گرفتن نقش مهم سلولهای بنیادی جنینی پر توان در زمینه سلول درمانی، یافتن عوامل دخیل در تمایز عصبی این سلولها و بهبود شرایط تمایز آنها به سلولهای نورون امری ضروری به نظر می رسد. در این مطالعه به بررسی سطوح بیانی lncRNA RMST در طی روند تمایز نورونی با استفاده از سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 که تحت تیمار با رتینوئیک اسید به سلولهای نورونی متمایز میشوند پرداخته شد تا نقش این ژن در تمایز نرونی مشخص گردد. برای این کار از ژنهای NSE و MAP2 به عنوان مارکرهای تمایزی استفاده گردید.

ژن MAP2 (Microtubule Associated Protein2) وابسته به میکروتوبول دندریت در دندریتهای در حال رشد مغزی وجود داشته و در تکامل مغز نقش دارد. پروتئین مربوط به این ژن دارای ۳ ایزوفرم بوده که پروتئین MAP2a تراکم بالایی در سوماتا (Somata) عصبی و دندریتها دارد، MAP2b در تکامل مغز موش نقش دارد، ایزوفرم MAP2c در طول تکامل اولیه مغز وجود دارد و تا حد زیادی در مغز بالغین کم شده است (۸و۹).

بیان ژن NSE (Enolase Neuron Specific) ابتدا در نورونهایی که به بلوغ عملکردی رسیده بودند مشاهده شد و این نشان می‌دهد که زیرساخت NSE دارای برخی از ویژگیهای خاص عملکردی می‌باشد. اگرچه ویژگیهای کنتیک از همه انولاز مهره‌داران مشابه هستند چندین ویژگی مرتبط از زیرواحد NSE وجود دارد که شامل تعادل سطح کلراید، توانایی واکنش با دیگر ترکیبات سلولی در آکسون و سیناپس است. NSE در مطالعات مختلف مورد توجه است به دلیل کاربرد بالینی و همچنین مارکر مناسبی برای بیان خاص عصبی و آسیبهای عصبی و یک مدل مناسب برای مطالعات تنظیمات ژنهای عصبی است (۲۰).

مواد و روشها

کشت وتمایز نورونی سلول‌های NT2 : در این مطالعه تجربی، رده سلولی NT2 که از انستیتوپاستور ایران خریداری شده بود، در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium) حاوی ۱۰ درصد سرم جنینی گوساله (FBS Fetal Bovine Serum,) عاری از اگزوزوم، ۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین(Penicillin G)، ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین(Streptomycin) و در انکوباتور مرطوب با ۵ درصد دیاکسید کربن و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شد.

برای تمایز نورونی سلولها، در داخل فلاسک کشت سلول ۱۵ میلی لیتر ماتریژل اضافه گردید و بعد از خشک شدن، محیط کشت کامل به آن اضافه شد. بدین صورت که ۵ میکرولیتر رتیونوئیک اسید حل شده در HSA به هر فلاسک ریخته شد و فلاسک به مدت ۳ ساعت در انکوباتور قرار داده شد سپس ۳۲۰ میکرولیتر کوکتیلی از فاکتورهای رشد شامل: ۱۲۰ میکرولیتر Uridine، ۲۰ میکرولیتر Cytosine Arabinoside، ۵۰ میکرولیتر Fluorodeoyuridine و ۱۳۰ میکرولیتر NGF می باشد به هر فلاسک اضافه شد بعد از ۴۸ ساعت ۳/۵ میکرولیتر محیط کامل اضافه گردید و مجدداً ۳۲۰ میکرولیتر کوکتیل اضافه شد.

استخراج RNA : بعد از کشت سلولها و ایجاد تمایز سلولی، جهت بررسی بیان ژنهای مورد مطالعه، RNA تام با استفاده از واکنش‌گر ترایزول (Invitrogen) طبق پروتکل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت RNA استخراج شده با الکتروفورز روی ژل آگارز ۱/۵ درصد تایید و خلوص و غلظت آن توسط اسپکتروفتومتری با جذب نوری در طول موجهای ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر سنجیده شد.

واکنش رونویسی معکوس و سنجش Real-time PCR : برای سنتز cDNA، میزان ۳ میکروگرم از RNA تام استخراج شده توسط آنزیم نسخه بردار معکوس PrimeScript™ RTase (Takara) طبق پروتکل شرکت سازنده سنتز شد. برای انجام واکنش Real-time PCR، مخلوط واکنشی در

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6

حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر شامل ۱۰ میکرولیتر SYBR Green I Master Mix (Takara)، ۵ پیکومول از هر آغازگر، ۷ میکرولیتر آب و ۵ نانوگرم cDNA سنتز شده تهیه شد. واکنش Real-time PCR در دستگاه ABI StepOne sequence Detection System (Applied Biosystems) تحت شرایط دمایی و زمانی مشخص انجام شد. ابتدا ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه به عنوان مرحله واسرشتگی اولیه انجام شد و سپس برنامه دمایی زیر در ۴۰ چرخه تکرار شد: مرحله واسرشتگی در دمای ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، مرحله اتصال در دمای ۶۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و مرحله توسعه در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه. به منظور ترسیم منحنی ذوب نیز از برنامه زمانی و دمایی شامل ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد برای ۱ دقیقه و ۹۵ درجه سانتی گراد برای ۳۰ ثانیه استفاده شد. لیست آغازگرهای مورد استفاده در این پژوهش در جدول یک آورده شده است، پس از به دست آوردن توالی ژنی از سایت NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) طراحی آغازگرها با استفاده از نرم‌افزارهای Oligo7, Gene runner, Primer blust انجام شد. مقادیر رونوشت RNA طویل غیر کد کننده RMST و همچنین رونوشت ژنهای مارکر عصبی NSE و MAP2 در مقایسه با بیان ژن GAPDH به عنوان ژن خانه دار (Housekeeping) و با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه شد.

جدول۱- توالی و طول قطعه حاصل از پرایمرهای PCR

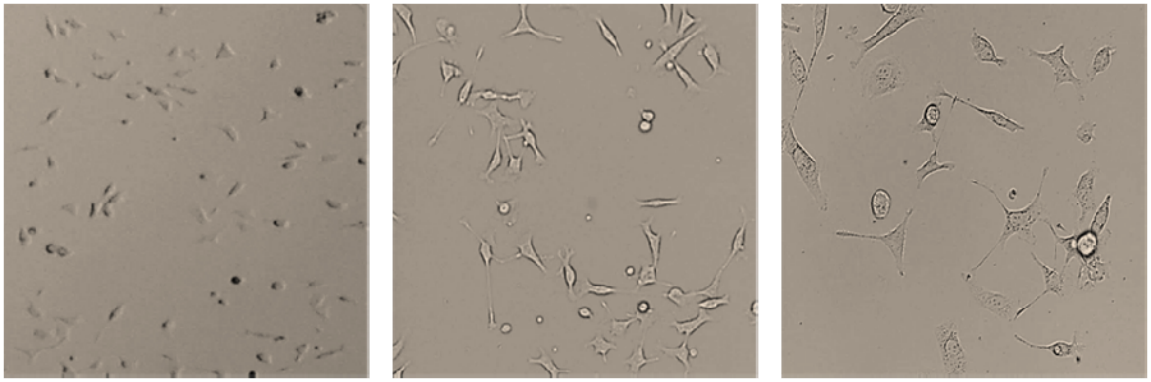
نام ژن	توالی پرایمرها	طول محصول PCR
RMST	F 5′ -…-3′ R 5′ -…-3′	
MAP2	F 5′-CTGCTTTACAGGGTAGCACAA -3′ R 5′-TTGAGTATGGCAAACGGTCTG-3′	**135**
NSE	F 5' -TCCTGGAGAACAGTGAAGCCT -3' R 5' -TGGTCCCCAGTGATGTATCGG -3'	**175**
GAPDH	F 5' -CCGAGCCACATCGCACAG -3' R 5' -GGCAACAATATCCACTTTACCAG -3'	**119**

آنالیز آماری داده ها: میزان بیان ژنها با روش CT = (CT target gene – ΔΔ CT GAPDH) $_{sample}$ – (CT target gene – CT GAPDH) calibrator اندازه گیری شد (۹و۱۰). این آزمایش در سه تکرار مستقل انجام شد و از آزمون *t*-test جهت آنالیز آماری تغییرات داده ها استفاده گردید. مقادیر *P* values کمتر از ۰/۰۵ از نظر آماری با معنی در نظر گرفته شدند.

نتایج

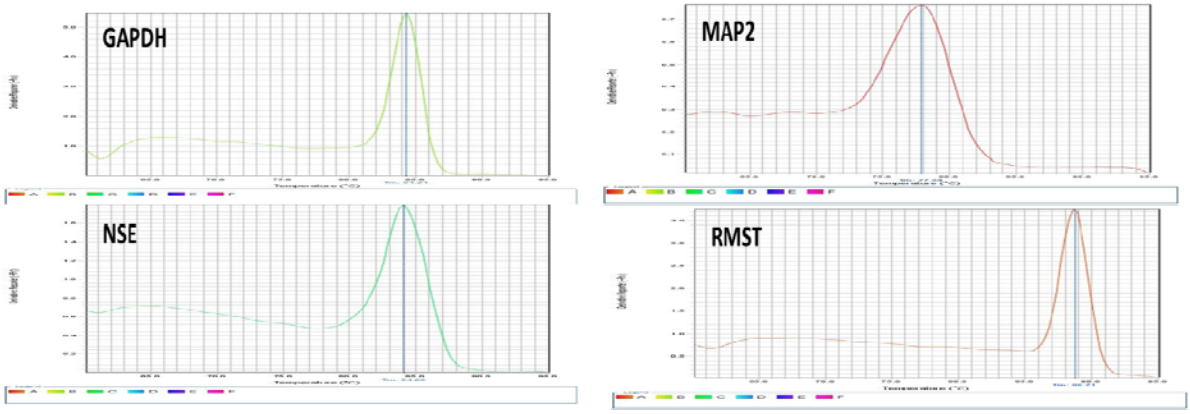
بررسی مورفولوژی سلولهای پرتوان جنینی NT2 : پس از کشت سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 مرفولوژی آنها در روزهای صفر، ۳ و ۷ تمایز مورد بررسی قرار گرفت که با توجه به شکل که توسط میکروسکوپ فاز کنتراست در روزهای مختلف از روند تمایز عکس برداری شده است. در روز اول و سوم سلولها تغییر حالتی را نشان ندادند که بیانگر عدم وجود تمایز می باشد ولی در روز ۷ تمایز، زواید تک قطبی و چند قطبی در سلولها مشاهده شد که نشاندهنده رخداد تمایز در این روز می‌باشد (شکل۱).

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6



شکل ۱- بررسی مرفولوژی سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی **NT2** در پی تیمار پروتکل تمایزی در روز های ۱، ۳ و ۷ تمایز. تصاویر میکروسکوپ فاز کنتراست روند تمایز سلولهای **NT2** را نشان می دهد. در روز ۷ سلولها زوائد یک قطبی و چند قطبی را تشکیل داده اند.

رسم منحنی ذوب برای تعیین اختصاصی بودن تکثیر در Real-time PCR : از آنجایی که رنگ SYBR Green I برای شناسایی محصول PCR استفاده می شود، به هر نوع DNA دو رشته ای متصل شده و توانایی تشخیص محصول اختصاصی از غیر اختصاصی را ندارد، بنابراین وجود مواردی چون دایمر پرایمر یا محصول غیر اختصاصی نیز سبب افزایش سیگنال نور فلورسانت می شوند. از این رو، به منظور تأیید صحت قطعه تکثیر شده و اطمینان از عدم وجود محصول غیر اختصاصی، دایمر پرایمر و آلودگی از آنالیز منحنی ذوب استفاده شد. همان گونه که در شکل ملاحظه می شود، وجود تنها یک پیک برای GAPDH، NSE، MAP2 و MSRT lncRNA در دمای مشخص برای هر ژن تکثیر یافته حاکی از اختصاصی بودن تکثیر است (شکل ۲).

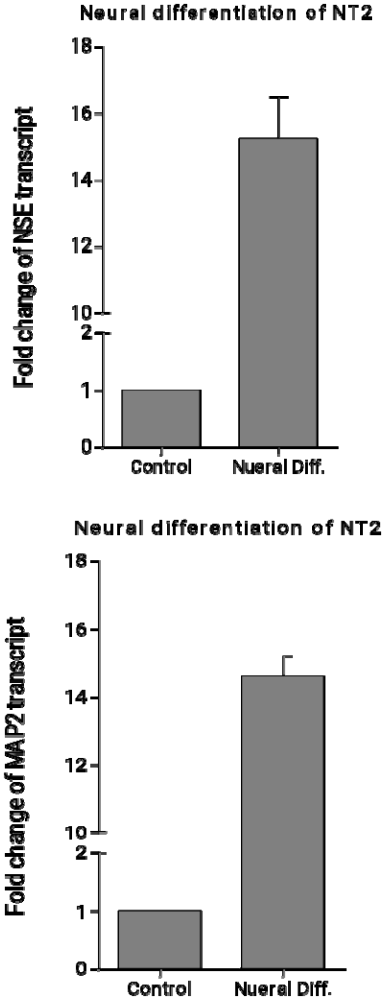


شکل ۲- منحنی ذوب و اختصاصیت تکثیر ژنها در واکنش Real-time PCR. وجود تنها یک پیک برای GAPDH، NSE، MAP2 و RMST lncRNA در دمای مشخص برای هر ژن تکثیر یافته حاکی از اختصاصی بودن تکثیر است.

ارزیابی بیان رونوشت ژن های NSE و MAP2 در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 پس از دوره تمایز عصبی: میزان بیان مارکر ویژه عصبی NSE و MAP2 در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 در روز ۷

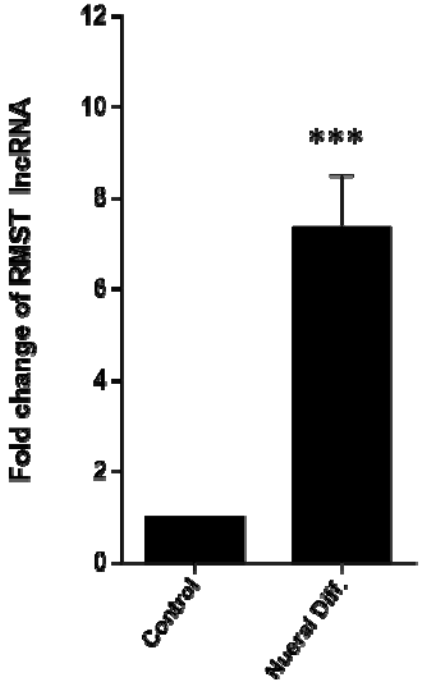
DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6

تمایزی با روش Real-time PCR مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف معنادار بین میزان بیان این ژنها در سلولهای NT2 در روز ۷ نسبت به روز اول دیده شد به این صورت که بیان این مارکر عصبی با طی روند تمایزی افزایش پیدا کرد (P <۰,۰۰۱) (شکل ۳).



شکل ۳- ارزیابی بیان رونوشت ژنهای مارکر عصبی NSE و MAP2 در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2. افزایش بیان مارکرهای عصبی تائیدی بر القای تمایز نورونی در سلولهای NT2 می باشد.

بررسی تغییرات بیانی RNA طویل غیر کدکننده RMST در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 پس از دوره تمایز عصبی: میزان بیان lncRNA RMST در سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 در روز ۷ تمایزی با روش qRT-PCR مورد بررسی قرار گرفت و اختلاف معنادار بین میزان بیان این lncRNA در سلولهای NT2 تمایز یافته نسبت به روز ابتدای دوره تمایزی مشاهده شد. نتایج Real-time PCR نشان داد با طی روند هفت روزه القای تمایز نورونی، بیان RNA طویل غیر کدکننده RMST در سلولهای NT2 افزایش یافته است (P <0.001) (شکل ۴).



شکل ۴- ارزیابی بیان RNA طویل غیر کدکننده RMST در طی روند تمایزی سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2. افزایش معنادار در میزان بیان lncRNA RMST در طی روند تمایز نورونی مشهود است.

بحث و نتیجه گیری

در مطالعه حاضر تمایز سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 به سلولهای نورونی با استفاده از رتینوئیک اسید انجام شد، سپس برای تأیید ایجاد تمایز، مورفولوژی سلولها و همچنین میزان بیان مارکرهای عصبی NSE و MAP2 در روزهای اول، سوم و هفتم تمایزی بررسی شد، با توجه به تغییرات مرفولوژیکی ایجاد شده در سلولها از جمله تشکیل زواید یک قطبی و چند قطبی و همچنین افزایش میزان بیان

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6
مقاله پژوهشی

مارکرهای عصبی NSE و MAP2 در روز هفتم تمایز نسبت به روز اول و سوم تمایز، تمایز سلول‌های پرتوان کارسینومای جنینی NT2 به سلولهای عصبی در روز هفتم تأیید شد (شکل های۲ و ۳).

بعد از تمایز سلولهای پرتوان کارسینومای جنینی NT2 میزان بیان LncRNA RMST مورد بررسی قرار گرفت، بررسیها نشان داد که اختلاف معنی داری بین میزان بیان RMST در سلولهای تمایز یافته نسبت به روز صفر وجود دارد که طبق نتایج به دست آمده میزان بیان RMST افزایش معناداری را نشان میدهد (P value=۰,۰۰۱) که این افزایش بیان منجر به تمایز سلولهای بنیادی به سلولهای عصبی شده است که مطابق با مطالعات Shi-Yan Ng و همکارانش در سال ۲۰۱۳ می باشد که به بررسی کنش میان LncRNA RMST و SOX2 پرداختند که طبق این مطالعه تغییرات بیانی در ژن RMST در فرآیند نوروژنز نقش دارد (۱۴). طبق مطالعات قبلی RMST در مدولاسیون نوروژنز نقش دارد و همچنین افزایش و کاهش بیان این ژن، بیان تعداد زیادی از ژنهای دیگر را تحت تأثیر قرار می دهد؛ از جمله این ژنها می توان به ژن SOX2 اشاره کرد که در تمایز نورونی نقش دارد و متاثر از میزان بیان RMST می‌باشد. این تغییر بیانی که در LnRNA RMST رخ داده است آبشاری از تغییرات را در بیان ژنها منجر شده و تمایز را تحت تأثیر قرار داده است (۱۲). به نظر می رسد میزان بیان RNA طویل غیر کد کننده RMST در سلولهای NT2 تمایز نیافته، بسیار پایین بوده که با پیشرفت روند تمایز میزان بیان این ژن نیز افزایش پیدا کرده است و به طبع ژنهای دیگر را تحت تأثیر قرار داده است و منجر به تمایز سلولی در سلولهای NT2 شده است (۱۷). مطالعات Ng و همکارانش در سال ۲۰۱۲ نشان داد که با استفاده از یک رویکرد کلی ژنوم برای بررسی LncRNA های نروژنیک، LncRNA RMST به عنوان یک LncRNA مورد نیاز برای تمایز عصبی است (۱۲). مطالعات اخیر Uhde و همکارانش در سال ۲۰۱۰ در مدلهای موش نقش RMST را در مغز کشف کرده اند. در مقایسه با بقیه مغز، طبق این بررسیها شدت بیان RMST در پیش سازهای نورونهای دوپامینرژیک midbrain بود و این مطالعات همچنین نشان داد که RMST با فاکتور رونویسی midbrain Lmx1a در مغز در حال رشد موش همخوانی دارد (۲۱). RMST به واسطه تمایز نورون hESC ها به وجود می آید، و جداسازی آن از طریق اتصال SOX2 مانع تمایز سلولهای عصبی می شود (۱۳،۴و۱۸).

تغییرات بیانی که در lncRNA RMST رخ داده است، حاکی از نقش آنها در طی روند نورون زایی و تمایز عصبی می باشد. بنابراین از آنجا که lncRNA ها فعالیت تنظیمی رخداد های سلولی را بر عهده دارند، شناسایی تغییرات بیانی lncRNA RMST که در طی روند تمایز عصبی رخ داده است، می تواند گویای مسیر تنظیمی ویژه ای برای نورون زایی باشد. در حال حاضر مطالعات زیادی به منظور بررسی پتانسیل سلولهای بنیادی عصبی برای درمان اختلالات CNS در حال انجام است. بعد از پیوند این سلولها به نواحی مختلف لازم است ردیابی این سلولها با استفاده از مارکرهای اختصاصی هر چه دقیق تر صورت گیرد. بنابراین مارکرهای مولکولی برای شناسایی سلولهای بنیادی عصبی در حالت in vivo یک نیاز اساسی است.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر برگرفته از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته ژنتیک است. نویسندگان مراتب قدردانی خود را نسبت به همکاریهای صورت گرفته در دانشگاه الزهرا (س) و دانشگاه تربیت مدرس اعلام می دارند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6

منابع

۱. سهرابی, س. س., سید سجاد, اسماعیلی, احمد, نظریان فیروزآبادی, فلاحی, حسین. (۲۰۲۰). شناسایی و تعیین خصوصیات میکروRNA های حفاظت شده در عدس . *پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)*، ۳۲(۴), ۶۰۶-۶۱۶.

۲. زارع میرک آباد ,و بنی‌رضی مطلق. (۲۰۲۰). کشف رابطه‌ی میان تنظیم بیان ژن‌ها و تغییرات هیستون استیلاسیون با استفاده از شبکه عصبی .*مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران)(علمی)*، ۳۲(۴), ۵۲۷-۵۳۸.

3.Amaral PP, Mattick JS. Noncoding RNA in development. Mammalian Genome. 2008;19(7-8):454-92.

4.Aprea J, Prenninger S, Dori M, Ghosh T, Monasor LS, Wessendorf E, et al. Transcriptome sequencing during mouse brain development identifies long non-coding RNAs functionally involved in neurogenic commitment. The EMBO journal. 2013;32(24):3145-60.

5. Bouchard M, Grote D, Craven SE, Sun Q, Steinlein P, Busslinger M. Identification of Pax2-regulated genes by expression profiling of the mid-hindbrain organizer region. Development. 2005;132(11):2633-43.

6. Chodroff RA, Goodstadt L, Sirey TM, Oliver PL, Davies KE, Green ED, et al. Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes. Genome biology. 2010;11(7):R72.

7. Freed CR, Greene PE, Breeze RE, Tsai W-Y, DuMouchel W, Kao R, et al. Transplantation of embryonic dopamine neurons for severe Parkinson's disease. New England Journal of Medicine. 2001;344(10):710-9.

8. Garner CC, Tucker RP, Matus A. Selective localization of messenger RNA for cytoskeletal protein MAP2 in dendrites. Nature. 1988;336(6200):674.

9. Kindler S, Garner CC. Four repeat MAP2 isoforms in human and rat brain. Molecular brain research. 1994;26(1-2):218-24.

10. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2− ΔΔCT method. methods. 2001;25(4):402-8.

11. Mercer TR, Qureshi IA, Gokhan S, Dinger ME, Li G, Mattick JS ,et al. Long noncoding RNAs in neuronal-glial fate specification and oligodendrocyte lineage maturation. BMC neuroscience. 2010;11(1):14.

12. Ng S-Y, Bogu GK, Soh BS, Stanton LW. The long noncoding RNA RMST interacts with SOX2 to regulate neurogenesis. Molecular cell. 2013;51(3):349-59.

13. Ng SY, Johnson R, Stanton LW. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. The EMBO journal. 2012;31(3):522–33.

14. Parpura V, Heneka MT, Montana V, Oliet SH, Schousboe A, Haydon PG, et al. Glial cells in (patho) physiology. Journal of neurochemistry. 2012;121(1):4-27.

15. Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. Nature Reviews Genetics. 2016;17(1):47.

16. Rakic P. Adult neurogenesis in mammals: an identity crisis. Journal of Neuroscience. 2002;22(3):614-8.

17.Ramos AD, Andersen RE, Liu SJ, Nowakowski TJ, Hong SJ, Gertz CC, et al. The long noncoding RNA Pnky regulates neuronal differentiation of embryonic and postnatal neural stem cells. Cell stem cell. 2015;16(4):439-47.

18.Schmitz SU, Grote P, Herrmann BG. Mechanisms of long noncoding RNA function in development and disease. Cellular and molecular life sciences. 2016;73(13):2491-509.

19.Tochitani S, Hayashizaki Y. Nkx2. 2 antisense RNA overexpression enhanced oligodendrocytic

DOR: 20.1001.1.23832738.1401.35.4.6.6

differentiation. Biochemical and biophysical research communications. 2008;372(4):691-6.

20.Twyman RM, Jones EA. Sequences in the proximal 5′ flanking region of the rat neuron-specific enolase (NSE) gene are sufficient for cell type-specific reporter gene expression. Journal of Molecular Neuroscience. 1997;8(1):63-73.

21.Uhde CW, Vives J, Jaeger I, Li M. Rmst is a novel marker for the mouse ventral mesencephalic floor plate and the anterior dorsal midline cells. PLoS One. 2010;5(1):e8641.

22.Wu A-M, Ni W-F, Huang Z-Y, Li Q-L, Wu J-B, Xu H-Z, et al. Analysis of differentially expressed lncRNAs in differentiation of bone marrow stem cells into neural cells. Journal of the neurological sciences. 2015;351(1-2):160-7.

Assessment of the expression of long noncoding RNA RMST following induction of neuronal differentiation of NT2 pluripotent embryonic carcinoma cells

Abbasi N.[1], Fahimi H.[1], Jamaleddini S.H.[1], Ramezani R.[2] and Babashah S.[3]

[1] Dept. of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, I.R. of Iran

[2] Dept. of Family Therapy, Women Research Center, Alzahra University, Tehran, I.R. of Iran

[3] Dept. of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, I.R. of Iran

Abstract

Aim: The majority of neurogenesis is terminated soon after birth and in adults new neurons generated only in the sub ventricular zone and the hippocampus accordingly neurodegenerative disorders and nerve damage are vital problem. Although long non-coding RNAs (lncRNAs) are involved in several cellular process, their function in the regulation of neurogenesis should be further clarified. In this regards, this study aim to analyze expression levels of LncRNA RMST during neuronal differentiation of human pluripotent embryonal carcinoma NT2 cells. In this study, human pluripotent embryonal carcinoma NT2 cells were neurally differentiated though retinoic acids and a cocktail of neural. The expression levels of neural markers were analyzed by RT-PCR. During neural differentiation of NT2 cells, the expression levels of neural specific markers NSE and MAP2 were observed (***P<0.001). The expression levels of LncRNA RMST was increased during neural differentiation of NT2 cells (***P<0.001). Alteration in expression levels of the lncRNA RMST suggest a role for it during neural differentiation and neurogenesis. Since lncRNAs considered as regulatory RNAs in cellular process, it seems that alteration in expression levels of the lncRNA RMST might be responsible for neurogenesis.

Keywords: Long non-coding RNAs, Human pluripotent embryonal carcinoma NT2 cells, Neural differentiation