

مقایسه بیان RNA های غیر کدکننده بلند GAS5 و NEAT1 در مبتلایان به سرطان سینه و افراد سالم

اصغر عرشی^{۱*}، حسین انصاری^۲، محمد مهدی قهرمانی سنو^۳، عباس دوستی^۴، میلاد خرمیان^۲، حسین سازگار^۵

^۱مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران، ^۲مرکز تحقیقات میکروبیولوژی، کنترل و کیفیت، کشت و صنعت نیشکر دهخدا، اهواز، ایران، ^۳گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه فردوسی مشهد، مشهد، ایران، ^۴گروه ژنتیک مولکولی، دانشگاه میشیگان، آن آرپور، میشیگان، آمریکا، ^۵گروه فیزیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران

تاریخ وصول: ۱۳۹۴/۹/۱۹ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۲/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: سرطان سینه ۱۰ درصد از کل سرطان‌های موجود در دنیا را شامل می‌گردد و از زنان مبتلا به انواع سرطان‌ها ۳۰ درصد مبتلا به سرطان سینه هستند. RNAهای غیرکدکننده بلند (lncRNA)، گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان هستند که از بخش وسیعی از ژنوم یوکاریوت‌ها رونویسی شده و در تنظیم فرآیندهای متنوع زیستی نقش‌های مهمی ایفا می‌کنند. هدف از این مطالعه مقایسه میزان بیان lncRNAهای GAS5 و NEAT1 در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان سینه به روش RT-qPCR بود.

روش بررسی: در این مطالعه مورد شاهد از بافت توموری ۴۰ فرد مبتلا به سرطان سینه و همچنین ۴۰ نمونه بافت غیر توموری از همان افراد تحت نظارت مستقیم متخصص پاتولوژیست و با توجه به علایم بالینی و یافته‌های آزمایشگاهی از بیمارستان شهید فقیهی شیراز جمع‌آوری شدند. پس از استخراج RNA از بافت‌های توموری و نرمال، ساخت cDNA طبق پروتکل و روش RT-qPCR به وسیله SYBR[®]Premix Ex Taq[™] II kit انجام شد. سطح بیان lncRNA ژن‌های GAS5 و NEAT1 با استفاده از روش $\Delta\Delta CT$ محاسبه گردید. داده‌ها با استفاده از آزمون تی تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: نتایج ارزیابی‌های Real Time Reverse transcription-PCR نشان داد میانگین میزان بیان نسبی lncRNA از ژن GAS5 در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال، کاهش بیان، و میانگین میزان بیان نسبی lncRNA از ژن NEAT1 در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال افزایش بیان دارد. این تغییرات بیان درباره lncRNA از ژن مربوط به GAS5 حدود ۱/۵ برابر و برای lncRNA از ژن NEAT1 در حدود ۲ برابر مشاهده گردید.

نتیجه‌گیری: با توجه به این که ای دو lncRNA ی انتخاب شده به عنوان ژن مهار کننده تومور در سرطان سینه بیان آنها نسبت به سلول‌های اپیتلیوم نرمال سینه به طور معنی‌داری تغییر می‌یابد، پتانسیل این lncRNA ها به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری بالا می‌رود. همچنین تغییرات بیان این lncRNA ها در بیماران با نژادهای مختلف و ساب تایپ‌های متفاوت سرطان سینه، اهمیت استفاده از این مولکول‌ها را به عنوان بیومارکر برای تشخیص و پیش آگهی بیماری تشدید می‌کند.

واژه‌های کلیدی: سرطان سینه، بیان ژن، lncRNA، GAS5، NEAT1، RT-qPCR.

*نویسنده مسئول: اصغر عرشی، شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی

Email:geneticspub@yahoo.com

نشان داده است رونویسی در ژنوم پستانداران به وفور انجام می‌گیرد، که حداقل ۸۰ درصد این رونویسی منحصرأ در ارتباط با lncRNA ها هستند و مطالعه‌های زیادی نشان داده است که lncRNA ها به عنوان ژن‌های کد کننده پروتئینی کوچک ایفای نقش می‌کنند (۶). lncRNA ها به‌طور کلی RNA های غیر کدکننده بالای ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشند. lncRNA ها بر خاموشی ژن، سیگنال‌های آدنیلایسیون و فاکتورهای مؤثر بر رونویسی تأثیر دارند (۴). همچنین lncRNA ها بر اساس جایگاه آنان نسبت به ژن‌های mRNA طبقه‌بندی می‌شوند. این طبقه‌بندی شامل: lncRNA سنس، lncRNA آنتی‌سنس، lncRNA ایترونی و lncRNA بین ژنی می‌باشد (۷). lncRNA GAS5 دارای یک ساختار سنجاق سر در انتهای ۳' خود است که به گیرنده‌های گلیکوکورتیکوئیدی متصل می‌شود و رونویسی از ژن‌های هدف گیرنده‌های گلیکوکورتیکوئید مانند G6pase، PEPCK و ciAP2 را سرکوب می‌کند، این ژن‌ها در متابولیسم گلوکوز نقش اساسی دارند. بنابراین lncRNA GAS5 ممکن است عملکردی در استفاده از منابع انرژی در پاسخ به تغذیه نیز داشته باشد. lncRNA GAS5 به عنوان یک ژن مهارکننده تومور در سرطان سینه است که بیانش نسبت به سلول‌های اپیتلیوم نرمال سینه به طور معنی‌داری کاهش می‌یابد. همچنین در سلول‌های سرطان سینه به عنوان یک تنظیم کننده آپوپتوز نیز می‌باشد (۸).

lncRNA NEAT1 به عنوان یک هدف اصلی برای گیرنده‌های استروژنی است و در بیان این گیرنده‌ها

مقدمه

سرطان به عنوان یک بیماری کشنده و مرگ‌آور توأم با درد و ناتوانی در اذهان مردم جای گرفته است، لذا تشخیص سرطان یک بحران جدی در زندگی فرد تلقی می‌شود و موجب به هم خوردن تعادل زندگی وی می‌گردد. سرطان سینه بیماری پیچیده‌ای است که تحت تأثیر عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد و به عنوان یکی از شایع‌ترین تومورهای بدخیم در بین زنان شناخته شده است. سرطان سینه ۱۰ درصد از کل سرطان‌های موجود در دنیا را شامل می‌گردد و از زنان مبتلا به انواع سرطان‌ها ۳۰ درصد مبتلا به سرطان سینه هستند (۱). بنا بر گزارش‌های منتشر شده علاوه بر افزایش تعداد مبتلایان به این بیماری در سال‌های اخیر، میزان خطر ابتلا به این سرطان نیز دو برابر شده است (۲). RNA های غیر کد کننده (ncRNAs) گروه جدیدی از ژن‌های شناخته شده در ژنوم انسان هستند که در تنظیم فرآیندهای مختلف زیستی نقش دارند. همچنین اخیراً به نقش این RNA ها در بیماری‌های پیچیده انسانی از جمله سرطان و بیماری‌های عصبی توجه زیادی شده است. طی سال‌های اخیر و با چندین طرح غربالگری مختلف، شمار شگفت‌آوری از ژن‌های ncRNA ها شناسایی شده‌اند (۳-۵).

مطالعه‌های گسترده ترانس کریپتومیک ژنومی (مطالعه کل RNA های کد شونده و غیر کد شونده)

تأثیر می‌گذارد، به این صورت که در بیماری مانند سرطان پروستات IncRNA NEAT1 باعث افزایش بیان گیرنده‌های استروژنی می‌گردد. عملکرد IncRNA NEAT1 به عنوان تنظیم‌کننده رونویسی است و همچنین نقش آن به عنوان نقطه آغاز تومورزایی نیز شناخته شده است. این احتمال می‌رود که IncRNA NEAT1 به وسیله همکاری با کروماتین‌ها و برهمکنش با هیستون‌ها در نسخه برداری ژن نقش داشته باشد. این IncRNA در سرطان سینه با افزایش بیان همراه است(۹).

بیان IncRNA در بافت‌های سرطان، پتانسیل این مولکول‌ها را به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری بالا می‌برد. برای مثال IncRNA PCA3 (سومین ژن سرطان پروستات) در سرطان پروستات در مقایسه با بافت نرمال افزایش بیان دارد و امروزه به صورت روتین در مراکز درمانی برای کمک به تشخیص سرطان پروستات و کاهش آزمایش‌های بیوپسی غیرضروری استفاده می‌شود. از طرف دیگر حدود ۱۰۰ IncRNA شناخته شده در سرطان سینه به صورت مخصوص در مقایسه با دیگر سرطان‌ها تغییر کرده‌اند که می‌توانند به عنوان بیومارکرهای سرطان سینه به کار گرفته شوند(۱۰ و ۱۱). هدف از این مطالعه مقایسه میزان بیان IncRNAهای GAS5 و NEAT1 در نمونه‌های توموری و نرمال افراد مبتلا به سرطان سینه به روش RT-qPCR بود.

روش بررسی

در این مطالعه مورد-شاهدی، پروفایل بیان IncRNAهای GAS5 و NEAT1 بر روی ۴۰ نمونه توموری سرطان سینه و ۴۰ نمونه غیرتوموری مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌ها از بیمارستان شهید فقیهی شیراز جمع‌آوری گردیدند و قبل از نمونه‌گیری از همه بیماران رضایت‌نامه کتبی اخذ شد. افراد گروه شاهد این مطالعه، همان افراد گروه بیمار هستند که از بخش‌های کاملاً سالم سینه آنها نمونه‌گیری بافت به عمل آمد. همه این نمونه‌های بافت (تومور و غیرتومور) به وسیله یک پزشک متخصص پاتولوژیست، معاینه و طبق معیارهای گزارش شده، از نظر تومور یا سالم بودن نمونه، مورد تأیید قرار گرفتند. نمونه‌های انتخاب شده هیچ‌کدام پیشتر جراحی، شیمی درمانی یا رادیوتراپی انجام نداده بودند. همه افراد مورد مطالعه به پرسش‌نامه کتبی شامل سوالاتی از جمله: محل تولد، نژاد، نوع ازدواج، سن شروع سرطان، سابقه خانوادگی سرطان، سابقه مصرف دارو پاسخ دادند. مقدار ۲۰۰ میکروگرم از نمونه‌های بافت بلافاصله پس از جراحی درون محلول RNA Later مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد واحد شهرکرد منتقل گردیدند. نمونه‌های غوطه‌ور در محلول RNAlater، ابتدا ۲۴ ساعت در دمای محیط و سپس در دمای ۴ تا ۸ درجه نگهداری شدند.

RNA کلی، با استفاده از کیت استخراج RNA شرکت Roche آلمان طبق دستورالعمل شرکت سازنده تخلیص و بلافاصله جهت سنتز cDNA مورد استفاده

حجم مورد نظر، واکنش PCR در ۴۵ سیکل، شامل ۱ دقیقه در ۹۴ درجه سانتی‌گراد، ۱ دقیقه در ۵۸ درجه سانتی‌گراد و ۱ دقیقه در ۷۲ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. یک مرحله اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه نیز در ابتدا انجام شد. هم‌چنین ژن PUM1، ژنی با قابلیت ثبات در شرایط مختلف (Reference Gene)، به منظور مقایسه و سنجش درستی بیان ژن استفاده شد. برنامه دمایی PCR برای هر سه ژن یکسان انتخاب شد. پس از اتمام چرخه‌های PCR، منحنی ذوب با برنامه دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر چرخه و بین دمای ۶۵-۹۹ درجه سانتی‌گراد به منظور بررسی اختصاصیت واکنش PCR رسم گردید. از هر نمونه سه تکرار مورد آزمایش قرار گرفت.

در روش لیواک (۱۲) با فرض این که Efficiency ژن مورد نظر و ژن مرجع با هم برابر هستند می‌توانیم تغییرات بیان را محاسبه کنیم. مزیت روش $\Delta\Delta CT$ در سهولت مراحل کار است و یک بار رسم منحنی استاندارد کافی می‌باشد و در صورتی از این روش استفاده می‌شود که کارایی PCR در نمونه‌های کنترل و هدف نزدیک به ۱۰۰ درصد باشد و بین آنها تفاوت کارایی PCR بیشتر از ۱۰ درصد نباشد. فرمول‌های مورد استفاده در این روش به شرح زیر هستند.

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{patient}} - \Delta CT_{\text{control}}$$

$$2^{-\Delta\Delta CT} = \text{برای بیان ژن هدف}$$

قرار گرفت. کیفیت RNA با استفاده از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد و مشاهده باندهای 18S و 28S بررسی گردید (شکل ۱). هم‌چنین غلظت RNAها با استفاده از دستگاه نانو دراپ سنجیده شد.

جهت اطمینان از عدم آلودگی RNA استخراج شده با DNA ژنومی از آنزیم DNase I (TaKaRa, Japan) عاری از RNase مطابق دستور العمل شرکت سازنده استفاده شد. برای سنتز cDNA به عنوان الگو در واکنش Reverse transcription-PCR ابتدا غلظت و خلوص RNA استخراج شده به وسیله دستگاه نانو دراپ تعیین شد. سپس ۱ میکروگرم از RNA استخراج شده با استفاده از آغازگر الیگومر تیمیدین (Oligo dT) و کیت شرکت تاکارا ژاپن، در حجم ۱۰ میکرولیتر طبق دستورالعمل شرکت سازنده به cDNA تبدیل گردید.

برای انجام آزمایش qPCR از دستگاه SYBR®Premix Ex (Corbett, Australia) RG-6000 و کیت Taq™ II kit (TaKaRa, Japan) استفاده شد. تمامی پرایمرهای مورد استفاده در این پژوهش به وسیله نرم‌افزار Oligo 7 طراحی شده و اختصاصی بودن الیگوهای طراحی شده برای ژن هدف به وسیله نرم‌افزار Blast آزمایش گردیدند. توالی پرایمرها در جدول ۱ آورده شده است. هر واکنش در حجم ۱۵ میکرولیتر، شامل ۷/۵ میکرولیتر SYBR Green Master Mix، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (غلظت ۵ پیکومول)، ۱ میکرولیتر cDNA (غلظت ۱۰۰ نانوگرم بر میکرولیتر) و ۴/۵ میکرولیتر آب مقطر انجام گردید. پس از تهیه

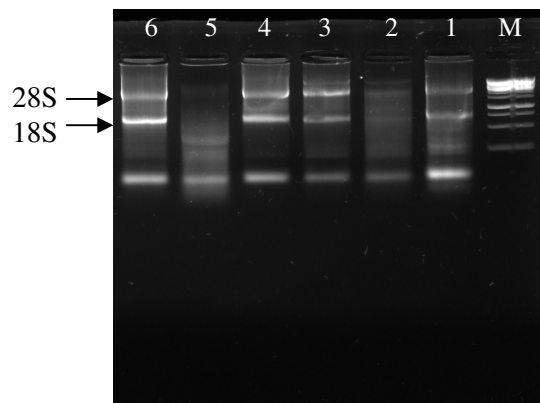
می‌دهد. در ضمن محصول PCR نیز بر روی ژل آگارز ۱ درصد قرار گرفت و مشاهده شد که در هر کدام از واکنش‌های انجام شده با پرایمرهای GAS5، NEAT1 و PUM1 یک باند اختصاصی وجود دارد که این نیز اختصاصی بودن نتایج PCR در نمونه‌های مورد نظر را تأیید کرد.

بررسی میانگین بیان نسبی lncRNA های GAS5 و NEAT1 نرمال شده نسبت به ژن مرجع (PUM1) در ۴۰ نمونه توموری و ۴۰ نمونه نرمال با استفاده از روش Real-time qRT-PCR انجام شد. در ادامه، مقایسه میزان میانگین بیان نسبی GAS5 lncRNA در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال، نشان داد میانگین میزان بیان نسبی GAS5 lncRNA در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال، کاهش بیان دارد. همچنین مقایسه میزان میانگین بیان نسبی NEAT1 lncRNA در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال، افزایش بیان NEAT1 lncRNA را در نمونه‌های توموری نسبت به نرمال نشان داد (نمودار ۱). همچنین منحنی‌های تکثیر مربوط به GAS5 و NEAT1 lncRNA های ۳ و ۴ نشان داده شده است.

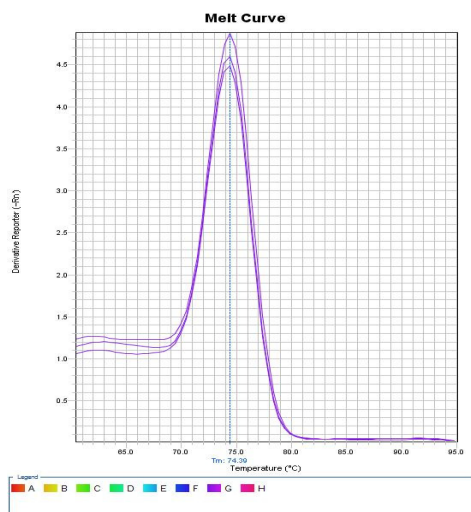
داده‌های جمع‌آوری شده با استفاده از نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل و برای آنالیز نتایج مربوط به بررسی کمی بیان ژن، اطلاعات به دست آمده از بیان ژن PUM1 به عنوان ژن رفرنس، با نتایج حاصل از بیان ژن‌های GAS5 و NEAT1، نرمالایز گردید. آنالیز داده‌ها با استفاده از متد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام شد و معنی‌داری اختلافات برای بیان ژن گروه بیمار و سالم به وسیله آزمون آماری تی تخمین زده شد. نرمال بودن داده‌ها برای توزیع متغیرها به وسیله تست کولموگروف اسمیرنوف تعیین شد و متوسط متغیرها با استفاده از میانگین \pm انحراف معیار بیان شد.

یافته‌ها

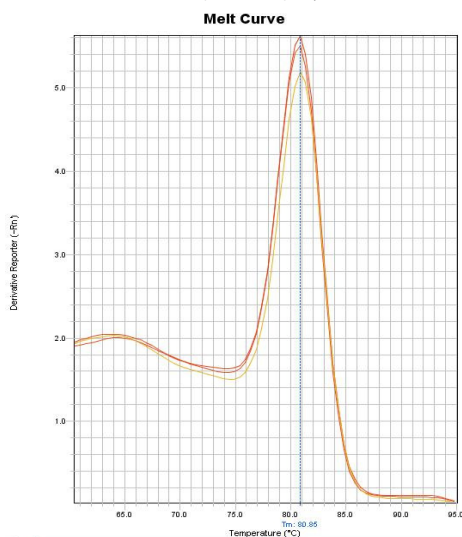
بررسی بیان lncRNA های GAS5 و NEAT1 به روش RT-qPCR با استفاده از SYBER@Premix Ex Taq™ II kit انجام شد. منحنی‌های ذوب مربوط به GAS5، NEAT1 و ژن PUM1 به صورت تک قله به دست آمد که این خود بیان‌گر تنها یک محصول خاص در PCR است. شکل ۲ و ۳ منحنی‌های ذوب مربوط به GAS5، NEAT1 و ژن PUM1 را نشان



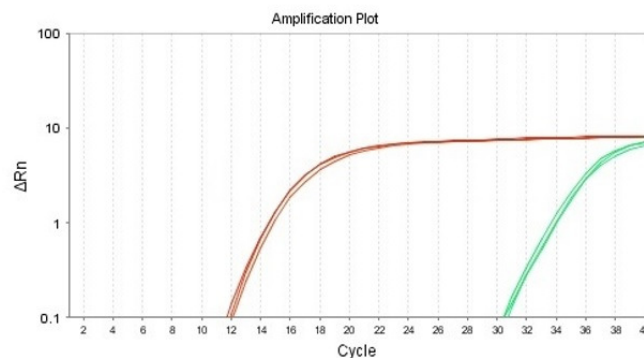
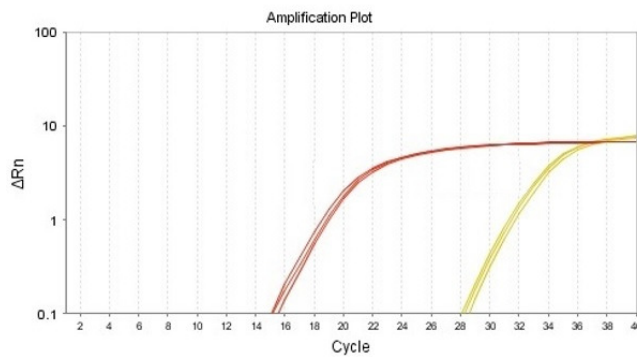
شکل ۱: RNA استخراج شده با کیت شرکت Roche. چاهک M: مارکر 1kb، چاهک ۱-۶: نمونه های RNA



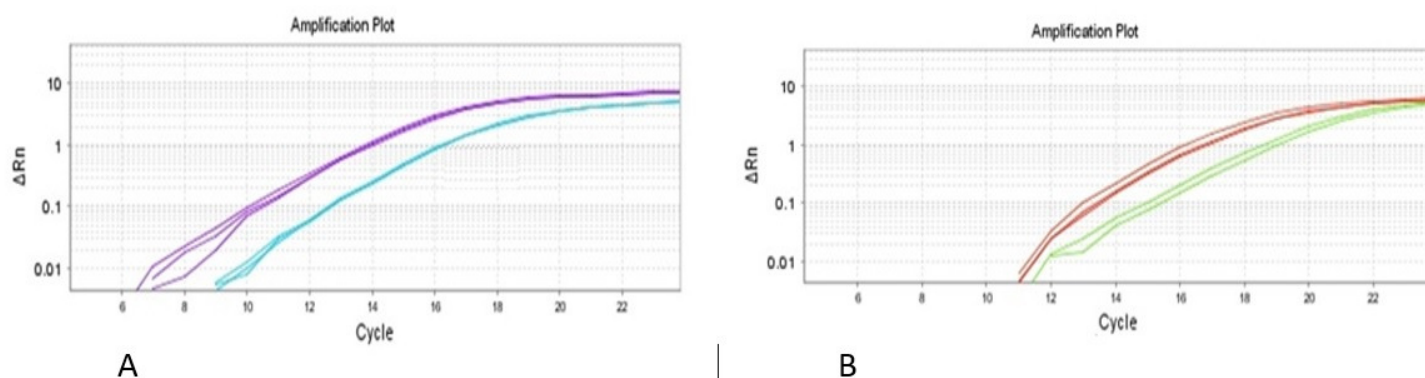
شکل ۲: منحنی ذوب مربوط به ژن IncRNA GAS5



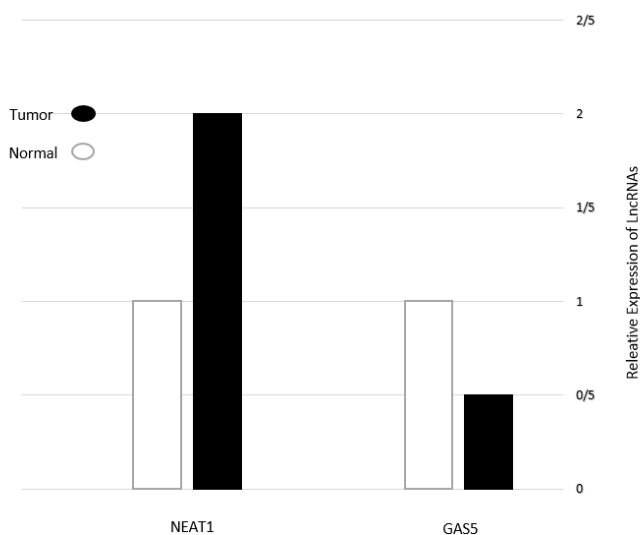
شکل ۳: منحنی ذوب مربوط به IncRNA NAET1



شکل ۴: منحنی های تکثیر مربوط به IncRNA GAS5 (شکل A: منحنی تکثیر مربوط به نمونه های نرمال؛ شکل B: منحنی تکثیر مربوط به نمونه های تومور)



شکل ۵: منحنی های تکثیر مربوط به lncRNA NAET1 (شکل A: منحنی تکثیر مربوط به نمونه های تومور؛ شکل B: منحنی تکثیر مربوط به نمونه های نرمال)



نمودار ۱: مقایسه‌ی میانگین بیان نسبی ژن GAS5 و NEAT1 در نمونه‌های توموری و نرمال سرطان سینه

جدول ۱: توالی آغازگرهای مورد استفاده در روش RT-qPCR

دمای اتصال	توالی پرایمر	نام ژن
58 °C	F: 5'-TGGCTAGCTCAGGGCTTCA-3'	NEAT1
	R: 5'-TCTCCTTGCCAAGCTTCCTT-3'	
58 °C	F: 5'- CTTGCCTGGACCAGCTTAAT -3'	GAS5
	R: 5'- CAAGCCGACTCTCCATACCT -3'	

بحث

همکاران در مطالعه‌ای نشان دادند که miR-21 قادر است lncRNA GAS5 را سرکوب کند. این ارتباط منفی بین miR-21 و lncRNA GAS5 در نمونه‌های سرطان سینه نیز مشاهده شده است. lncRNA GAS5 نیز همچنین قادر است بیان miR-21 را مهار کند. آن‌ها همچنین یک جایگاه اتصال برای miR-21 روی اگزون شماره ۴ lncRNA GAS5 مشخص کردند که حذف این جایگاه اتصال، باعث از بین رفتن فعالیت miR-21 خواهد شد (۱۵). منگ و همکاران، بیان lncRNA‌ها را در بیش از ۸۸۷ نمونه سرطان سینه مورد بررسی قرار دادند. مجموعه‌ای از چهار ژن در نمونه‌ها شناسایی گردید که عبارت بودند از: U79277، AK024118، AK000974 و BC040204. آن‌ها همچنین در این مطالعه رابطه سن و زیر گروه‌ها با lncRNA‌ها را مورد بررسی قرار دادند (۱۶). دینگ و همکاران در مطالعه‌ای به منظور بررسی lncRNA‌های بین ژنی در بیماران مبتلا به سرطان سینه، ۲۵ نمونه بافت توموری سینه به همراه بافت‌های نرمال مجاور آن‌ها را مورد بررسی قرار دادند. نتایج کار آن‌ها نشان داد ۱۳۴ و ۶۲ lincRNA به ترتیب در بافت‌های سرطانی و نرمال بیان می‌شوند. همچنین آن‌ها ۴ lincRNA را به صورت اختصاصی مورد بررسی قرار دادند که نتایج این بررسی نشان داد. linkRNA-BC5 ارتباط مستقیمی با سن بیماران، مرحله بندی سرطان و تراکم گیرنده های پروژسترون دارد. lincRNA-BC8 ارتباط منفی با بیان گیرنده‌های پروژسترون دارد و lincRNA-

سرطان سینه شایع‌ترین بدخیمی زنان در سراسر دنیا است، به طوری که ۳۰ درصد از کل سرطان‌ها و ۱۵ درصد از مرگ‌های ناشی از سرطان در میان زنان مربوط به آن است. این سرطان که شایع‌ترین سرطان در بین زنان ایرانی نیز هست، هنوز یک مشکل بزرگ سلامتی در کشورهای درحال توسعه و توسعه‌یافته به شمار می‌رود. در ایران، ۷۶ درصد سرطان‌های شایع زنان مربوط به سینه است و باید آن را در بین زنان ایرانی پنجمین عامل مرگ ناشی از سرطان پس از سرطان معده، لوسمی، سرطان‌های ریه و کبد و مجاری صفراوی دانست به طوری که باعث ۱۲۰۰ مرگ در هر سال می‌شود و میزان آن ۳/۴ در هر صد هزار نفر خانم است (۱۳). بیشتر lncRNA‌ها به وسیله RNA polymerase II رونویسی می‌شوند. بنابراین هم دارای 5' Cap و هم دم پلی A هستند. lncRNA‌ها دارای بیان خاص سلولی هستند و طی آزمایش‌های مختلف به محرک‌ها پاسخ داده‌اند و همین امر اثبات کرد که بیان آن‌ها تحت کنترل رونویسی است. وانگ و همکاران به بررسی مکانیسم‌های مولکولی lncRNA‌ها پرداختند. در این مطالعه عملکردهای بی‌شمار lncRNA‌ها در چهار گروه اصلی مطرح شده است که عبارتند از: Decoys, Signals, Scaffolds و Guides (۱۴). امروزه برهمکنش‌های میان lncRNA‌ها و RNA های غیرکدکننده کوتاه (miR) مورد توجه بسیاری از محققان قرار گرفته است. زانگ و

در سرطان سینه تقریباً مشخص شده است که به ترتیب کاهش و افزایش بیان را نشان می‌دهند.

تقدیر و تشکر

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد بوده است، که با حمایت مالی بنیاد ملی نخبگان انجام شد.

BC4 در سرطان سینه پیشرفته بیان بالایی از خود نشان می‌دهد (۱۷). چودهری و همکاران، lncRNA NEAT1 را به عنوان یک lncRNA در سرطان سینه که با افزایش بیان همراه است مورد بررسی قرار دادند. نتایج این مطالعه که بر روی ۲۰۰۰ بیمار مبتلا به سرطان سینه انجام گرفت، نشان داد lncRNA NEAT1 ارتباط ویژه‌ای با نتایج کلینیکی و آسیب شناسی بالینی دارد (۱۸).

پیشنهاد می‌شود، می‌توان مواردی هم‌چون افزایش تعداد نمونه‌های بافتی از ساب تایپ‌ها و درجه‌های مختلف سرطان سینه برای مطالعه بیان این lncRNAها و هم‌چنین سرکوب بیان lncRNAها در رده‌های سلولی سرطانی سینه به منظور بررسی عملکرد آن را مطرح نمود. تغییرات بیان lncRNAها در بیماران با نوع ساب‌تایپ سرطان و نژاد متفاوت، اهمیت استفاده از این مولکول‌ها را به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری تشدید می‌کند.

نتیجه‌گیری

در چند سال اخیر lncRNAها، به ویژه lncRNAها و miRها به خاطر ویژگی‌های منحصر به فرد خود توجه محققان را به خودش جلب کرده‌اند. آنجا که lncRNAها در بافت‌های سرطانی نسبت به بافت‌های نرمال بیان متغیر دارد، پتانسیل این مولکول‌ها را به عنوان بیومارکر برای تشخیص بیماری بالا می‌برد. بیان lncRNAهای GAS5 NEAT1

REFERENCES

1. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Jarrahi AM, Harirchi I. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. *The Breast J* 2007; 13(4): 383-91.
2. Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, Risch HA, Eyfjord JE, Hopper JL, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *Am J Hum Genet* 2003; 72(5): 1117-30.
3. Eddy SR. Computational genomics of noncoding RNA genes. *Cell* 2002; 109: 137-40.
4. Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF. Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 2009; 458: 223-7.
5. Washietl S, Hofacker IL, Lukasser M, Huttenhofer A, Stadler PF. Mapping of conserved RNA secondary structures predicts thousands of functional noncoding RNAs in the human genome. *Nat Biotechnol* 2005; 23: 1383-90.
6. Furuno M, Pang KC, Ninomiya N, Fukuda S, Frith MC, Bult C, et al. Clusters of internally primed transcripts reveal novel long noncoding RNAs. *PLoS Genet* 2006; 2: 37.
7. Meng J, Li P, Zhang Q, Yang Z, Fu S. A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. *J Exp Clin Canc Res* 2014; 33(84): 1-10.
8. Pickard MR, Williams GT. Regulation of apoptosis by long non-coding RNA GAS5 in breast cancer cells: implications for chemotherapy. *Breast Canc Res Treat* 2014; 145(2): 359-70.
9. Hirose T, Virnicchi G, Tanigawa A, Naganuma T, Li R, Kimura H, et al. NEAT1 long noncoding RNA regulates transcription via protein sequestration within subnuclear bodies. *Mol Biol Cell* 2013; 25: 169-83.
10. Lee GL, Dobi A, Srivastava S. Prostate cancer: diagnostic performance of the PCA3 urine test. *Nat Rev Urol* 2011; 8: 123-4.
11. Brunner AL, Beck AH, Edris B, Sweeney RT, Zhu SX, Li R, et al. Transcriptional profiling of long non-coding RNAs and novel transcribed regions across a diverse panel of archived human cancers. *Genome Biol* 2012; 13: R75.
12. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻(Delta Delta C (T)) Method. *Methods* 2001; 25(4): 402-8.
13. Akbari ME, Khayamzadeh M, Khoshnevis SJ, Nafisi N, Akbari A. Five & ten years survival in breast cancer patients mastectomies vs. breast conserving surgeries, personal experience. *Iran J Cancer Prev* 2008; 1(2): 53-7.
14. Wang KC, Chang HY. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 2011; 43(6): 904-14.
15. Zhang Z, Zhu Z, Watabe K, Zhang X, Bai C, Xu M, et al. Negative regulation of lncRNA GAS5 by miR-21. *Cell Death Diff* 2013; 20(11): 1558-68.

16. Meng J, Li P, Zhang Q, Yang Z, Fu S. A four-long non-coding RNA signature in predicting breast cancer survival. *J Exp Clin Canc Res* 2014; 33(84): 1-10.
17. Ding X, Zhu L, Ji T, Zhang X, Wang F, Gan S, et al. Long Intergenic Non-Coding RNAs (LincRNAs) Identified by RNA-Seq in Breast Cancer. *Plos one* 2014; 9(8): e103270.
18. Choudhry H, Schodel J, Albukhari A, Oikonomopoulos S, Haider S, Moralli D. Unlocking the complexity of hypoxia non-coding transcriptome landscape of breast cancer. *BMC Genom* 2014; 15(2): 30.

Comparison of GAS5 Long non-coding RNA Expression and NEAT1 in Breast Cancer Patients and Healthy People

Arshi A^{1*}, Ansari H², Ghahramani Seno MM³, Doosti A⁴, Khoramian M³, Sazgar H⁵

¹Biotechnology Research Center, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran, ²Microbiology Lab, Quality Control Management, Dehkhoda Sugarcane Agro- industry Company, ahwaz, iran, ³Department of Basic Sciences, Ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran, ⁴Biotechnology Research Center, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran, ⁵Department of Physiology, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran

Received: 10 Dec 2015 Accepted: 6 May 2016

Abstract:

Background & aim: Breast cancer entails 10% of all cancers in the world. Among all types of cancers, 30 percent of women are infected with breast cancer. Non-coding of long RNA (lncRNA) is a new group of known genes in the human genome transcribed from large parts of the genome of eukaryotes and play an important role in the regulation of different biological processes. The aim of the present study was to compare the expression level of GAS5 lncRNA and NEAT1 in normal and neoplastic samples from breast cancer patients by RT-qPCR.

Methods: In the present case-control study, 40 samples from patients with breast cancer tumor and 40 patients from non-tumor under the direct supervision of a pathologist specialist due to clinical presentation and laboratory findings were collected. After extracting DNA from normal and tumor tissues, cDNA synthesis method according to the protocol and RT-qPCR was performed by SYBR®Premix Ex Taq™ II kit. lncRNA expression levels of genes GAS5 and NEAT1 was calculated using $\Delta\Delta CT$. Data were analyzed using t-test.

Results: The results of Real Time Reverse transcription-PCR indicated that partial expression levels of GAS5 lncRNA gene in tumor samples compared to normal GAS5 lncRNA of the gene, decreasing the expression, and the mean relative expression levels of lncRNA and NEAT1 gene in tumor samples compared to normal was overexpressed. These variation gene expression of lncRNA related to GAS5 about 1.5 times and 2 times to lncRNA from NEAT1 gene was observed respectively.

Conclusion: Due to the previous reports, these lncRNAs act as tumor suppressor in breast cancer and had differential expression in tumor and normal tissues, which could be used as biomarker for cancer diagnosis. Moreover, expression of these lncRNAs in different breast cancer subtypes and patient with other blood raises the importance of this molecules as a biomarker for cancer diagnosis and prognosis.

Keyword: Breast cancer, lncRNA, GAS5, NEAT1, RT-qPCR.

Corresponding author: Arshi A, Biotechnology Research Center, Islamic Azad University of Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran
Email: geneticspub@yahoo.com

Please cite this article as follows:

Arshi A, Ansari H, Ghahramani Seno MM, Doosti A, Khoramian M, Sazgar H. Comparison of GAS5 Long non-coding RNA Expression and NEAT1 in Breast Cancer Patients and Healthy People. *Armaghane-danesh* 2016; 21 (3): 278-289.