Archive of SID

ISSN: 2476-6917; Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):609-615

Investigation of the Expression and the Effect of SPTBN4-miR1 in Process of Nerve Differentiation of NT2 Cells

ARTICLE INFO

Article Type
Original Research

Authors
Hosseini F.S.[1] *MSc,*
Mohamad Soltani B.*[1] *PhD,*
Baharvand H.[2] *PhD,*
Hosseinkhani S.[3] *PhD*

How to cite this article
Hosseini F.S, Mohamad Soltani B, Baharvand H, Hosseinkhani S. Investigation of the Expression and the Effect of SPTBN4-miR1 in Process of Nerve Differentiation of NT2 Cells. Modares Journal of Biotechnology. 2019;10(4):609-615.

[1]Genetics Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
[2]Royan Institute, Tehran, Iran
[3]Biochemistry Department, Biological Sciences Faculty, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

**Correspondence*
Address: Tarbiat Modares University, Nasr Bridge, Jalal-Al-Ahmad Highway, Tehran, Iran. Postal Code: 1411713116
Phone: +98 (21) 82884703
Fax: -
soltanib@modares.ac.ir

Article History
Received: January 6, 2019
Accepted: March 13, 2019
ePublished: December 21, 2019

ABSTRACT

The SPTBN4 gene, a part of the spectrin protein family, plays important roles in various cellular processes, including cell cycle, nerve cell development, and so on. Recently, a new miRNA has been found in this SPTBN4 gene, which was registered at the NCBI database. The aim of the present study was to investigate the expression of this miRNA, called SPTBN4-miR1, in the process of differentiation of human embryonal carcinoma cell line NT2 and also the overexpression effect of this miRNA on the differentiation of these cells. RT-qPCR results indicate that SPTBN4-miR1-5p and SPTBN4-miR1-3p show a significant increase in expression in the process of neural differentiation from day three until the 8th and 14th day of differentiation. Then, after overexpressing the SPTBN4-miR1 precursor in NT2 cells and retinoic acid treatment, the expression of pluripotent and differentiation revealed the role of SPTBN4-miR1-5p and SPTBN4-miR1-3p in promoting differentiation and exclusion from the pluripotent state. It seems that by making further studies and finding out the possible targets of these miRNAs, a distinctive marker can be achieved and used to improve the differentiation process.

Keywords Human Embryonal Carcinoma cell line NT2; Differentiation; miRNA; SPTBN4

CITATION LINKS

[1] βIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of Ranvier in the central and peripheral ... [2] A recessive mutation in beta-IV-spectrin (SPTBN4) associates with congenital myopathy, neuropathy, and central ... [3] Spectrin: Structure, function and ... [4] βIV spectrinopathies cause profound intellectual disability, congenital hypotonia, and motor axonal ... [5] Identification of mammalian microRNA host genes and transcription ... [6] Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are ... [7] MicroRNA biogenesis and ... [8] MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and ... [9] The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and ... [10] Origins and mechanisms of miRNAs and ... [11] Transcription and processing of human microRNA ... [12] Noncoding RNAs in the mammalian central nervous ... [13] miRNA and ... [14] Non-coding RNAs in the nervous ... [15] Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem ... [16] MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle ... [17] OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent ... [18] A novel multi-gene detection platform for the analysis of miRNA ... [19] Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in ... [20] MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate ... [21] MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem ... [22] Concise review: Harmonies played by microRNAs in cell fate ... [23] Arrayed functional genetic screenings in pluripotency reprogramming and ... [24] Postnatal development of spasticity following transgene insertion in the mouse ... [25] The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb ... [26] A novel human pluripotent stem cell-derived neural crest model of Treacher Collins Syndrome shows defects in ... [27] Eyes: Variety, development and ... [28] Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and ... [29] MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell ... [30] Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic ... [31] Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 ... [32] MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple ... [33] Mechanisms of TGF-β signaling in regulation of cell growth and ...

Copyright© 2019, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.

www.SID.ir

Archive of SID

بررسی بیان و اثر SPTBN4-miR1 در روند تمایز عصبی سلول‌های NT2

فهیمه‌سادات حسینی MSc
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
بهرام محمدسلطانی* PhD
گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
حسین بهاروند PhD
پژوهشکده رویان، تهران، ایران
سامان حسینخانی PhD
گروه بیوشیمی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

چکیده
ژن *SPTBN4* از اعضای خانواده پروتئینی اسپکترین در فرآیندهای مختلف سلول از جمله چرخه سلولی، تکوین سلول‌های عصبی و غیره نقش ایفا می‌کند. اخیراً یک miRNA جدید در این ژن *SPTBN4* پیدا شده که در پایگاه NCBI به ثبت رسیده است. هدف از مطالعه حاضر، بررسی بیان این miRNA، با نام *SPTBN4-miR1* در روند تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی NT2 و همچنین بررسی اثر بیش‌بیانی آن بر روند تمایزی این سلول‌ها است. نتایج RT-qPCR بیانگر آن بود که *SPTBN4-miR1-5p* و *SPTBN4-miR1-3p* در روند تمایز عصبی افزایش بیان معنی‌داری را از روز سوم شروع و تا روزهای ۸ و ۱۴ تمایزی نشان می‌دهند. سپس، بعد از بیش بیان پیش‌ساز *SPTBN4-miR1* در سلول‌های NT2 و تیمار با رتینوئیک‌اسید، بررسی بیان مارکرهای پرتوانی و تمایزی، بیانگر نقش *SPTBN4-miR1-5p* و *SPTBN4-miR1-3p* در پیشبرد تمایز و خروج از حالت پرتوانی بود. به نظر می‌رسد با انجام مطالعات بیشتر و پیداکردن اهداف احتمالی این miRNAها، می‌توان به یک مارکر تمایزی دست یافت و از آن برای بهبود روند تمایز بهره برد.

کلیدواژه‌ها: سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی NT2، تمایز، miRNA، *SPTBN4*

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۰/۱۶
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۷/۱۲/۲۲
*نویسنده مسئول: soltanib@modares.ac.ir

مقدمه
ژن *SPTBN4* که یکی از اعضای خانواده پروتئینی اسپکترین بتا را کد می‌کند؛ در مغز، سیستم اعصاب محیطی، پانکراس و ماهیچه‌های اسکلتی بیان می‌شود[1]. اسپکترین‌ها همچنین در ارگانل‌های داخل سلولی مانند گلژی، لیزوزوم‌ها و وزیکول‌های ترشحی یافت می‌شوند[1]. مولکول اسپکترین یک تترامر شامل دو زیرواحد آلفا و دو زیرواحد بتا است که ژن *SPTBN4* زیرواحد بتا را کد می‌کند. این ژن که روی کروموزوم ۱۹ قرار گرفته است و ۳۶ اگزون دارد[1]. جهش در این ژن با میوپاتی مرکزی، نوروپاتی و ناشنوایی مرکزی همراه است[2]. همچنین در بیماری‌های مختلف دیگری از جمله سرطان، موتاسیون در این ژن گزارش شده است[3]. یک ژن بسیار مشابه در موش برای موضع‌گیری پروتئین‌های غشایی خاص در مناطق قطبی نورون مورد نیاز است[4].

ریز RNAها (miRNAها)، RNAهای کوچک غیرکدکننده‌ای با اندازه تقریبی ۱۰ تا ۳۷ نوکلئوتید هستند[5] که بیان ۳۰٪ یا بیشتر ژن‌های حیوانی را تنظیم می‌کنند[5, 6]. از ژن‌های رمزگذار miRNAها رونوشت‌های پلی‌آدنین‌داری رونویسی می‌شود که توسط RNAsIII هسته‌ای دروشا برش خورده و سپس با انتقال به سیتوپلاسم توسط مولکول اکسپورتین ۵، توسط RNAseIII دایسر پردازش شده و دابلکس‌های دورشته‌ای تولید می‌شود[7, 8]. این مولکول‌ها قادر به تنظیم همزمان بیان صدها ژن هستند[9] و در تنظیم بسیاری از فرآیندهای سلولی از جمله تمایز، مرگ برنامه‌ریزی‌شده، تکثیر، نمو و غیره دخالت دارند[10, 11].

miRNAها همچنین به‌طور فراوانی در مغز بزرگسالان بیان شده[12] و به نظر می‌رسد که در حفظ صفات عصبی بالغ و پلاستیک سیناپسی ایفای نقش می‌کنند[13]. مطالعات متعدد نشان می‌دهد که miRNAها به‌شدت در عملکرد و ویژگی‌های سیناپسی در هنگام شکل‌گیری حافظه دخیل هستند[14]. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که miRNAها در تعیین سرنوشت‌های مختلف سلول از جمله عصبی، عضلات و غیره دخیل هستند[15, 16]. از آنجایی که نقش miRNAها در تمایز سلول‌های عصبی کمتر شناخته شده است و با توجه به این که *SPTBN4-miR1* (*5p, 3p*) درون ژن *SPTBN4* واقع شده است و به‌عنوان یک نقطه داغ ژنی در سیستم عصبی تلقی می‌شود؛ هدف از مطالعه حاضر بررسی بیان و نقش این miRNAها در مسیر تمایز سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی انسان NT2 است. بنابراین ابتدا الگوی بیانی آنها در روند تمایز عصبی بررسی و سپس تاثیر افزایش بیان این miRNAها بر روند تمایز عصبی بررسی شد.

مواد و روش‌ها
کشت سلول: رده سلولی NT2 از مرکز ملی ذخایر ژنتیکی و بیولوژیکی ایران خریداری و در محیط کشت DMEM-LG (اینویتروژن؛ ایالات متحده) کشت داده شد. این محیط با پنی‌سیلین ۱۰۰واحد بر میلی‌لیتر، استرپتومایسین ۱۰۰میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (سیگما؛ ایالات متحده) و سرم جنین گاوی ۱۰% (اینویتروژن؛ ایالات متحده)، در دمای ۳۷°C با ۵% دی‌اکسیدکربن، تکمیل شد.

ساخت سازه بیانی و ترنسفکشن: تقریباً ۱۵۰جفت‌باز در DNA ژنوم انسان، که نشان‌دهنده توالی پیش‌ساز *SPTBN4-miR1* بود، در وکتور pEGFP-C1 پایین‌تر از توالی *GFP* کلون شد. به‌منظور بررسی صحت سازه مورد نظر، سازه نوترکیب حاصل توالی‌یابی شد.

ترنسفکشن سلول‌های NT2: به‌منظور بیش بیان *SPTBN4-miR1* در سلول‌های NT2، این سلول‌ها روی پلیت ۶ چاهکه (۱/۲×۱۰۵ سلول در هر چاهک) کشت داده شدند؛ پس از ۲۴ساعت سلول‌ها با ۲میکروگرم از وکتور بیانی pEGFP-C1 حاوی پیش‌ساز *SPTBN4-miR1* و معرف ترانسفکشن لیپوفکتامین تیمار شدند. بیان ژن پروتئین فلورسنت سبز (GFP) ۲۴ساعت پس از ترانسفکشن با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت مدل Eclipses Te2000-s (Nikon؛ ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت و سلول‌ها برای آزمایش‌های بعدی استفاده شدند.

تمایز سلول‌های NT2: به‌منظور القای تمایز عصب اکتودرم از

www.SID.ir

Archive of SID

سلول‌های NT2، تیمار با رتینوئیک‌اسید در این سلول‌ها (به‌صورت دو بار تکرار) مطابق روش انجام‌شده توسط *اطلسی* و همکاران[17] با برخی اصلاحات انجام شد. برای این منظور، رتینوئیک‌اسید در غلظت نهایی ۱۰میلی‌متری، به محیط کشت اضافه و دو بار در هفته به‌مدت ۱۴ روز، محیط تمایز در فواصل زمانی منظم تجدید شد. سپس بیان نشانگرهای بنیادین و تمایزی تحت نظارت قرار گرفت.

استخراج RNA: استخراج RNA تام از سلول‌ها با استفاده از ریبوکس (GeneAll؛ کره جنوبی) طبق دستورالعمل شرکت تولیدکننده انجام شد. تمام RNAهای استخراج‌شده تا زمان استفاده در فریزر ۸۰°C- نگهداری شدند. کیفیت RNAهای استخراج‌شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز، و غلظت آن با استفاده از دستگاه اسپکتروفومتری اندازه‌گیری شد. حذف آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراج‌شده، با تیمار آنزیم DNaseI (فرمنتاز؛ ایالات متحده) به‌مدت ۲۸دقیقه در ۳۷°C انجام شد. سپس به‌منظور غیرفعال‌نمودن آنزیم DNaseI، از EDTA با غلظت ۵۸میلی‌مولار در دمای ۶۵°C استفاده شد.

سنتز cDNA: قبل از سنتز cDNA، با استفاده از پلیA- پلیمراز (تاکارابیو؛ ژاپن) دم‌پلیA به انتهای ´۳ کلیه RNAها اضافه شد (با توجه به دستورالعمل شرکت تولیدکننده). سپس طبق پروتکل شرکت سازنده آنزیم ترانس‌کریپتاز معکوس (RT؛ Thermo Fisher Scientific؛ ایالات متحده) و با استفاده از RT و استفاده از پرایمر اختصاصی Anchored-Oligo-dT سنتز cDNA انجام شد.

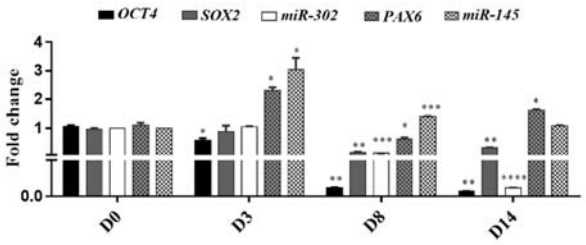
واکنش زنجیره‌ای پلیمراز کمی (Real Time PCR): واکنش PCR کمی با استفاده از دستگاه ABI به کمک پرایمرهای طراحی‌شده و در حضور شناساگر سایبرگرین برای ۴۸ سیکل در شرایط دمایی ۸۵°C به‌مدت ۱۵ثانیه، ۶۸°C به‌مدت ۲۸ثانیه و ۷۲°C به‌مدت ۲۸ثانیه انجام شد. برای نرمال‌کردن سطح بیان miRNAها از ژن *U48* و برای mRNAها از ژن *GAPDH* استفاده شد. داده‌های حاصل با استفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ و نرم‌افزار GraphPad آنالیز شد. لیست پرایمرهای مورد استفاده در جدول ۱ ذکر شده است. تمام آزمایشات به‌صورت دو بار تکرار انجام شد.

جدول ۱) لیست پرایمرهای مورد استفاده

نام پرایمر	توالی پرایمر ´۵ به ´۳ (از چپ به راست)
U48	رفت: TGACCCCAGGTAACTCTGAGTGTGT
Universal	برگشت: AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG
SPTBN4-miR1-5p	رفت: CCCAGAGAGGGTGGTGAGG
SPTBN4-miR1-3p	رفت: CCCGGCCCAGGGCGGCTCCGCC
SOX2	رفت: GACTAGGACTGAGAGAAAGAAGAG برگشت: AAGAGAGAGGCAAACTGGAATC
POU5F1(OCT4)	رفت: TCGCAAGCCCTCATTTC برگشت: CCATCACCTCCACCACCT
NANOG	رفت: AATACCTCAGCCTCCAGCAGATG برگشت: TGCGTCACACCATTGCTATTCTTC
GAPDH	رفت: GCCACATCGCTCAGACAC برگشت: GGCAACAATATCCACTTTACCAG

یافته‌ها

به‌منظور بررسی بیان *SPTBN4-miR1* در روند تمایزی سلول‌های NT2 به سلول‌های شبه‌عصبی، سلول‌های بنیادی کارسینومای جنینی انسان (NT2) طی روندی ۱۴روزه و با استفاده از رتینوئیک‌اسید، به سلول‌های شبه‌عصبی تمایز داده شدند. برای اطمینان از تحصیل تمایز طی این روند تمایزی، بیان مارکرهای مولکولی بنیادینگی و نیز عصبی، مورد ارزیابی قرار گرفتند. طی روند تمایز عصبی، ژن *OCT4* به‌عنوان یکی از اصلی‌ترین مارکرهای بنیادینگی، طی روزهای ۳، ۸ و ۱۴ کاهش بیان معنی‌داری را نسبت به روز صفر تمایزی (کنترل) نشان داد. همچنین شاهد کاهش بیان معنی‌دار ژن *SOX2* در روزهای ۸ و ۱۴ تمایزی بودیم. اخیراً علاوه بر mRNAها، miRNAها نیز به‌عنوان مارکر بنیادینگی و تمایزی شناخته شده‌اند. از جمله می‌توان به مارکر بنیادینگی *miR-302* اشاره کرد که در مطالعه حاضر طی روند تمایزی، کاهش بیان معنی‌داری را در روزهای ۸ و ۱۴ تمایزی از خود نشان داد (نمودار ۱). طی این روند تمایزی، ژن *PAX6* به‌عنوان یکی از مارکرهای تمایز عصبی نیز، افزایش بیان معنی‌داری را در روزهای ۳، ۸ و ۱۴ نشان داد. همچنین، بیان *miR-145* به‌عنوان یک مارکر تمایزی دیگر، در روزهای ۳ و ۸ دچار افزایش بیان شده بود (نمودار ۱).



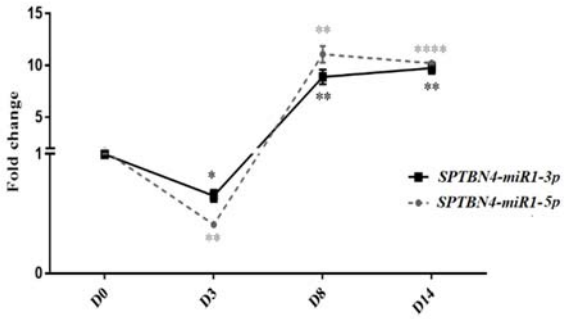
نمودار ۱) بررسی بیان ماکرهای بنیادینگی و تمایز عصبی طی تمایز عصبی سلول‌های NT2؛ طی روند تمایز سلول‌های NT2 شاهد کاهش بیان مارکرهای بنیادینگی مانند *OCT4*، *SOX2* و *miR-302* بودیم. همچنین مارکرهای تمایزی مثل *miR-145* و *PAX6* (مارکر تمایز عصبی) افزایش بیان معنی‌داری را نشان دادند. سطح معنی‌داری p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱***، p<۰/۰۰۰۱**** را نسبت به کنترل ماک به‌وسیله T-test نشان می‌دهند.

همان‌طوری که در نمودار ۲ مشاهده می‌شود؛ به دنبال بررسی بیان *SPTBN4-miR1* در روند تمایز شبه‌عصبی سلول NT2، شاهد کاهش بیان معنی‌دار هر دو فرم (*SPTBN4-miR1*-3p و *SPTBN4-miR1*-5p) در روز ۳ تمایزی نسبت به روز صفر (کنترل) بودیم. اما در ادامه روند تمایز در روزهای ۸ و ۱۴ بیان آنها به‌طور معنی‌داری نسبت به روز صفر (کنترل) افزایش پیدا کرد (نمودار ۲). به‌منظور بررسی تاثیر بیش بیان *SPTBN4-miR1* بر روند تمایز شبه‌عصبی سلول NT2، این سلول‌ها با سازه بیش بیان‌کننده آن ترنسفکت شدند. نتایج حاصل از RT-qPCR حاکی از بیش بیان موفق *SPTBN4-miR1-5p* و *SPTBN4-miR1-3P* در سلول‌های ترانسفکت‌شده NT2 بود (نمودار ۳). سپس این سلول‌ها در کنار

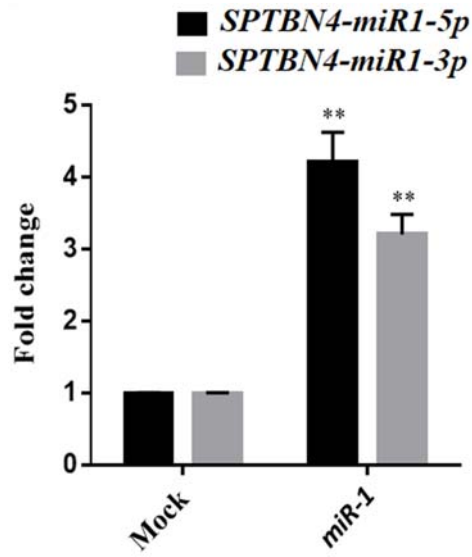
www.SID.ir

Archive of SID

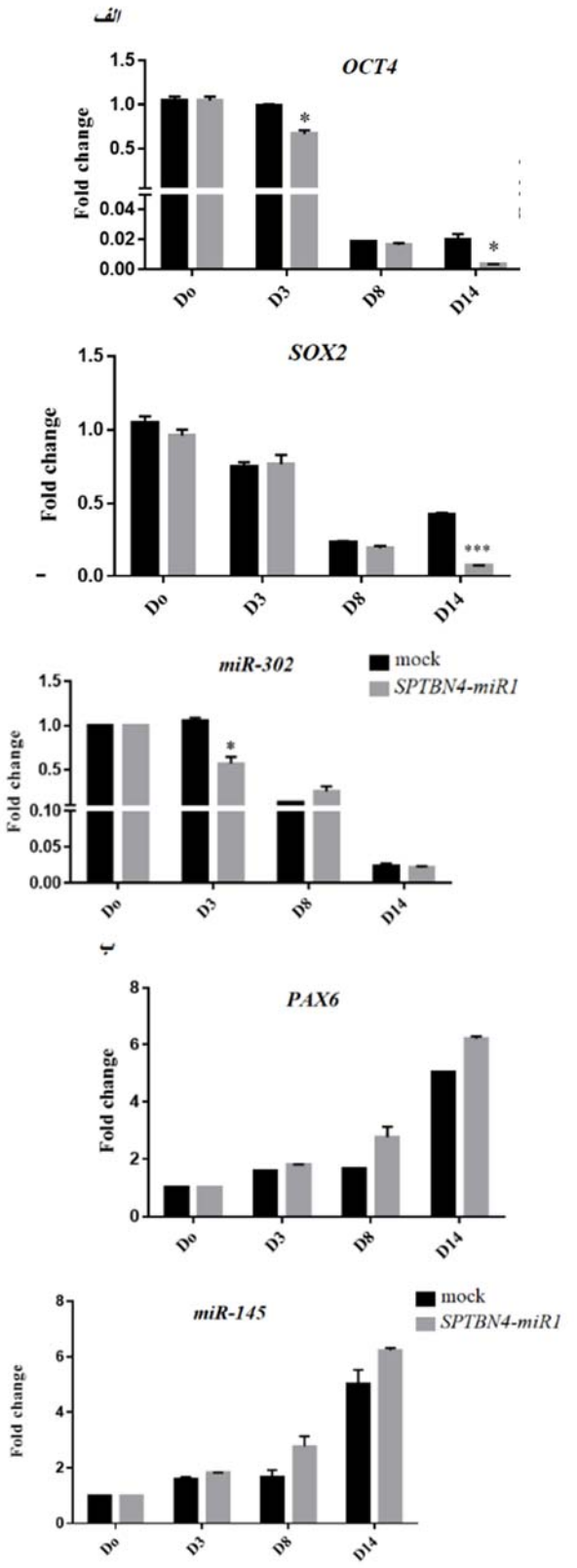
سلول‌های ترنسفکت‌شده با وکتور ماک (به‌عنوان کنترل)، با استفاده از تیمار رتینوئیک‌اسید تمایز داده شدند. با استفاده از روش PCR کمی تغییرات مارکرهای بنیادینگی و تمایزی در نمونه ترنسفکت‌شده و کنترل بررسی شد تا اثر بیش بیان *SPTBN4-miR1* بر تمایز این سلول‌ها بررسی شود. نتایج حاکی از آن بود که در روز سوم تمایز مارکرهای بنیادینگی *OCT4* و *miR-302* کاهش بیان معنی‌داری نسبت به نمونه کنترل پیدا کرده‌اند. همچنین در روز ۱۴ تمایز شاهد کاهش بیان معنی‌دار مارکرهای *OCT4* و *SOX2* بودیم (نمودار ۴).



نمودار ۲) بیان نسبی *SPTBN4-miR1* طی روند تمایز عصبی سلول‌های NT2 (بیان *SPTBN4-miR1-5p* و *SPTBN4-miR1-3P* در روز سوم تمایز کاهش معنی‌داری را نسبت به روز صفر نشان داد. از روز سوم به بعد تا روز هشتم تمایزی، افزایش معنی‌داری در بیان این miRNA نسبت به روز صفر تمایزی مشاهده شد. سپس از روز هشتم میزان افزایش‌یافته بیان هر دوی این miRNAها تا روز آخر ثابت ماند. سطح معنی‌داری p<۰/۰۵*، p<۰/۰۱**، p<۰/۰۰۱**** را نسبت به کنترل ماک به‌وسیله T-test نشان می‌دهند.)



نمودار ۳) تایید بیش بیان *SPTBN4-miR1* در سلول‌های NT2؛ سلول‌های NT2 با استفاده از سازه بیش بیان‌کننده *SPTBN4-mir1* ترنسفکت شده و سپس با استفاده از روش RT-qPCR بیش بیان هر دوی *SPTBN4-miR1-5p* و *SPTBN4-miR1-3P* در روز سوم تمایزی تایید شد. سطح معنی‌داری p<۰/۰۱** را نسبت به کنترل ماک به‌وسیله T-test نشان می‌دهند.



نمودار ۴) بررسی تاثیر بیش بیان *SPTBN4-mir1* بر روند تمایزی سلول‌های NT2؛ به دنبال ترنسفکت موفق سلول‌های NT2 و تمایز این سلول‌ها با استفاده از ماده رتینوئیک‌اسید، مارکرهای بنیادینگی و تمایز عصبی بررسی شد. نتایج حاکی از آن بود که به دنبال بیش بیان *SPTBN4-mir1*، مارکرهای بنیادین *OCT4* (روز های ۳ و ۱۴)، *SOX2* (روز ۱۴) و *miR-302* (روز ۳) کاهش بیان معنی‌داری را نسبت به نمونه کنترل ماک نشان می‌دهند. سطح معنی‌داری p<۰/۰۵* را نسبت به کنترل ماک به‌وسیله T-test نشان می‌دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

بحث

مولکول‌های RNA کوچک غیرکدکننده متعلق به خانواده microRNAها به‌عنوان یک کلاس جدید از عوامل تعیین‌کننده سرنوشت سلولی ظهور کرده‌اند[15]. تاکنون بیش از ۲۵۰۰ miRNA در انسان شناخته شده است[18] و همانند عوامل رونویسی، یک miRNA به‌تنهایی می‌تواند بیان ژن‌های متعدد را تنظیم کند[9]. تعامل miRNA با mRNAهای مربوطه به‌طور معمول منجر به بی‌ثبات‌شدن یا سرکوب ترجمه mRNAهای هدف می‌شود[9]. مانند فاکتورهای رونویسی، الگوی بیان miRNAها از لحاظ مکان و زمان بسیار تنظیم شده و به تغییرات ایجادشده در وضعیت سلولی پاسخ می‌دهد[19]. شناسایی الگوی بیانی miRNAها در شرایط مختلف سلولی به درک ما از پتانسیل این مولکول‌های کوچک برای پیشبرد برنامه‌هایی که سرنوشت و شخصیت سلول را تعریف می‌کنند، می‌افزاید.

تغییر و تبدیل سلول پرتوان به رده‌های سلولی مشخص با کاهش مارکرهای پرتوانی و خودنوسازی و فعال‌شدن ژن‌های اختصاصی رده همراه است. این تغییرات چشمگیر با تغییرات بیان miRNAهای زیادی همراه است[20]. نتایج نشان می‌دهد که miRNAها به‌طور کلی برای دستیابی به ویژگی‌های پرتوانی و تمایزی ضروری هستند. در حالی که برخی از miRNAها، مانند *miR-145*، در ترویج خروج از حالت پرتوانی با هدف قراردادن عوامل چندگانه پرتوانی (به‌عنوان مثال، *KLF4*، *SOX2* و *OCT4*) عمل می‌کنند[21]، دیگر miRNAها در ثبات حالت پرتوانی نقش دارند[22, 23]. در مطالعه حاضر به بررسی بیان و نقش miRNAای پرداخته‌ایم که از ژن *SPTBN4* تولید می‌شود. این ژن که از خانواده اسپکترین‌ها است نقش مهمی در شکل‌گیری نورون‌ها دارد[1]. همچنین اهمیت این ژن برای حفظ کنترل مسیر حرکتی مفاصل و فراهم‌کردن دوره زمانی تکوین مشخص شده است[24]. بنابراین بررسی بیان و نقش این miRNA در تمایز عصبی حائز اهمیت است. در تحقیق حاضر، نتایج حاصل از بررسی بیان مارکرهای بنیادینگی و تمایز عصبی حاکی از تمایز موفق سلول‌های NT2 به سمت سلول‌های پیش‌ساز عصبی بود. به‌طوری که به دنبال تیمار سلول‌ها با رتینوئیک‌اسید شاهد کاهش چشمگیر مارکرهای پرتوانی همچون *OCT4*، *SOX2* و همچنین کاهش میزان *miR-302* بودیم (نمودار ۱). تکثیر سلولی در سلول‌های بنیادی جنینی از طریق فعالیت یک مجموعه کوچک از عوامل رونویسی که در اطراف OCT4 و *SOX2* قرار دارند و بیان ژن‌های "خودتجدید" و "تمایز" را کنترل می‌کنند، حفظ می‌شود[25]. بیان ژن *PAX6* (اختصاصی رده عصبی) و نیز بیان *miR-145* (که در ترویج خروج از حالت پرتوانی نقش دارد)، طی این روند افزایش بیان پیدا کرده بودند. ژن *PAX6* یک فاکتور رونویسی حاضر طی رشد جنین است[26]. پروتئین کدشده توسط این ژن تنظیم‌کننده اصلی طی تکوین چشم و مغز است[27, 28].

به دنبال تمایز موفق سلول‌های NT2 به سمت سلول‌های شبه‌عصبی، به بررسی بیان *SPTBN4-miR1-5P* و *SPTBN4-miR1-3P* در این دوره تمایزی پرداختیم که هر دو این miRNAها از یک ساختار حلقه- ساقه مربوط به پیش‌ساز کلون‌شده تولید می‌شدند. نتایج نشان داد که این miRNAها به دنبال یک کاهش بیان در روز سوم تمایزی، افزایش بیان معنی‌داری را تا روز ۸ تمایزی نشان می‌دهند و سپس در بقیه دوره در همین سطح می‌مانند (نمودار ۲). این نتایج نشان‌دهنده نقش بالقوه این miRNAها در تمایز عصبی است. از آنجایی که بیان این miRNA در روز سوم دچار کاهش می‌شود، اثر بیش بیان آنها را در روز سوم تمایزی بر روند تمایز این سلول‌ها سنجیدیم. نتایج حاصل از RT-qPCR حاکی از انتقال موفق سازه بیش بیان‌کننده این miRNAها به داخل سلول NT2 و بیش بیان آن در روز سوم تمایزی بود (نمودار ۳). سپس به‌منظور بررسی تاثیر آنها بر روند تمایز این سلول‌ها، مجدداً بیان مارکرهای پرتوانی و ژن‌ها اختصاصی رده را بررسی کردیم. همان‌طور که در نمودار ۴ نشان داده شده است بیش بیان این miRNA در سلول‌های NT2 باعث تسریع روند تمایز و خروج از حالت پرتوانی شده است. به‌طوری که شاهد کاهش بیان مارکرهای پرتوانی *OCT4* و *miR-302* در روز سوم تمایزی و ژن SOX2 در روز ۱۴ تمایزی در سلول‌های بیش بیان‌کننده *SPTBN4-miR1* نسبت به سلول‌هایی که با سازه کنترل mock ترنسفکت شده‌اند، بودیم (نمودار ۴). بنابراین نتایج به‌دست‌آمده از مطالعه حاضر نقش این miRNA را در پیشبرد تمایز شبه‌عصبی سلول‌های NT2 پیشنهاد می‌دهد. فرآیند تمایز سلول‌های بنیادی، تمرکز تحقیقات زیست‌پزشکی برای مهندسی بافت و درمان سلول‌های بنیادی است. یک مساله جاری در این زمینه نه‌تنها تعریف این مکانیزم‌ها است، بلکه شناسایی مراحل مختلف رشد و تمایز به انواع سلول‌ها نیز است. miRNAهای دیگری شبیه به *SPTBN4-miR1* بر روند تمایزی سلول‌های بنیادی دخیل بوده‌اند. همانند *miR-134*، *miR-296*، *miR-470*، *miR-145* و *let-7* که در خاموش‌شدن برنامه خودگردانی یا پیشبرد تمایز سلول‌های بنیادی دخیل هستند[21, 29, 30]. بنابراین شناسایی هر چه بیشتر این miRNAها در شناسایی هر چه بیشتر این مکانیزم‌ها و روش‌ها سودمند است.

در مطالعات گذشته نشان داده شده است که miR-32 بیان Hes1 را طی القای تمایز سلول‌های NT2 توسط رتینوئیک‌اسید تنظیم کرده و احتمالاً در تکوین نقش مهمی را ایفا می‌کند به‌طوری که مهار بیان این miRNA در سلول‌های NT2 مانع از تمایز این سلول‌ها پس از القا با رتینوئیک‌اسید شد[31].

علاوه بر این miR-125b در تنظیم تمایز عصبی حائز اهمیت است. بیش بیان این miRNA طی تمایز عصبی یک‌سری از mRNAهای هدف را تنظیم منفی می‌کند. از آنجایی که پروتئین‌هایی که توسط این mRNAها بیان می‌شوند به‌صورت نرمال تمایز را مهار می‌کند، القای miR-125b منجر به افزایش بیان ژن‌های عصبی مهمی می‌شود[32].

اسپکترین‌ها در مسیر سیگنالینگ TGF)-β/SMAD) به‌عنوان مولکول آداپتور SMAD3/4 دخیل هستند[3]. مولکول TGF-β یک

www.SID.ir

Archive of SID

پروتئین ترشحی است که تکثیر، تمایز و مرگ را در سلول‌های مختلف تنظیم می‌کند[33]. از آنجایی که میزبان این miRNA از دسته اسپکترین‌ها است به نظر می‌رسد که این miRNA هم‌راستا با ژن میزبانش در تمایز سلولی نقش داشته باشند. بنابراین این احتمال وجود دارد که SPTBN4-miR1 نیز از طریق این مسیر نقش خود را در مسیر تمایز ایفا کند و می‌توان بین ژن‌های موثر در این مسیر سیگنالینگ به دنبال ژن‌های هدف احتمالی این miRNA پرداخت.

نتیجه‌گیری

در مجموع می‌توان گفت اگرچه زمینه زیست‌شناسی miRNAها نسبتاً جوان است، اما تاثیر آن در درک ما از تنظیم عملکرد سلول بسیار وسیع است. این مطالعه نشان می‌دهد که این miRNAها در پیشبرد تمایز و خروج از حالت پرتوانی نقش ایفا می‌کنند و این امید وجود دارد که با بررسی اهداف این miRNAها بتوانیم درک عمیق‌تری نسبت به مکانیزم‌های تنظیمی عملکرد سلول و مسیرهای تمایزی به دست بیاوریم. نتایج ما نشان می‌دهد که دو miRNA بالغ که از یک ساختار حلقه- ساقه مشتق شده‌اند و با هم رونویسی می‌شوند دارای عملکردهای بیولوژیکی یکسانی هستند. این یافته‌های جدید پیامدهای بالقوه‌ای در زمینه مارکرهای تمایزی دارند.

تشکر و قدردانی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
تاییدیه‌اخلاقی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
تعارض منافع: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.
سهم نویسندگان: فهیمه‌سادات حسینی (نویسنده اول)، نگارنده مقدمه/پژوهشگر اصلی/تحلیلگر آماری (۲۵%)؛ بهرام محمدسلطانی (نویسنده دوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)؛ حسین بهاروند (نویسنده سوم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)؛ سامان حسینخانی (نویسنده چهارم)، روش‌شناس/نگارنده بحث (۲۵%)
منابع مالی: موردی از سوی نویسندگان بیان نشده است.

منابع

1- Berghs S, Aggujaro D, Dirkx R, Maksimova E, Stabach P, Hermel JM, et al. βIV spectrin, a new spectrin localized at axon initial segments and nodes of Ranvier in the central and peripheral nervous system. J Cell Biol. 2000;151(5):985-1001.
2- Knierim E, Gill E, Seifert F, Morales-Gonzalez S, Unudurthi SD, Hund TJ, et al. A recessive mutation in beta-IV-spectrin (SPTBN4) associates with congenital myopathy, neuropathy, and central deafness. Hum Genet. 2017;136(7):903-10.
3- Zhang R, Zhang C, Zhao Q, Li D. Spectrin: Structure, function and disease. Sci China Life Sci. 2013;56(12):1076-85.
4- Wang CC, Ortiz-González XR, Yum SW, Gill SM, White A, Kelter E, et al. βIV spectrinopathies cause profound intellectual disability, congenital hypotonia, and motor axonal neuropathy. Am J Hum Genet. 2018;102(6):1158-68.
5- Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. Genome Res. 2004;14(10a):1902-10.
6- Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. Cell. 2005;120(1):15-20.
7- Gregory RI, Shiekhattar R. MicroRNA biogenesis and cancer. Cancer Res. 2005;65(9):3509-12.
8- Kim VN. MicroRNA biogenesis: Coordinated cropping and dicing. Nat Rev Mol Cell Biol. 2005;6(5):376-85.
9- Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. Nat Rev Genet. 2010;11(9):597-610.
10- Carthew RW, Sontheimer EJ. Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. Cell. 2009;136(4):642-55.
11- Cullen BR. Transcription and processing of human microRNA precursors. Mol Cell. 2004;16(6):861-5.
12- Cao X, Yeo G, Muotri AR, Kuwabara T, Gage FH. Noncoding RNAs in the mammalian central nervous system. Annu Rev Neurosci. 2006;29:77-103.
13- Trivedi S, Ramakrishna G. miRNA and neurons. Int J Neurosci. 2009;119(11):1995-2016.
14- Mehler MF, Mattick JS. Non-coding RNAs in the nervous system. J Physiol. 2006;575(2):333-41.
15- Schoolmeesters A, Eklund T, Leake D, Vermeulen A, Smith Q, Aldred SF, et al. Functional profiling reveals critical role for miRNA in differentiation of human mesenchymal stem cells. PLoS One. 2009;4(5):e5605.
16- Callis TE, Chen JF, Wang DZ. MicroRNAs in skeletal and cardiac muscle development. DNA Cell Biol. 2007;26(4):219-25.
17- Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Gokhale PJ, Andrews PW. OCT4 spliced variants are differentially expressed in human pluripotent and nonpluripotent cells. Stem Cells. 2008;26(12):3068-74.
18- Hsieh CH, Chen WM, Hsieh YS, Fan YC, Yang PE, Kang ST, et al. A novel multi-gene detection platform for the analysis of miRNA expression. Sci Rep. 2018;8(1):10684.
19- Siomi H, Siomi MC. Posttranscriptional regulation of microRNA biogenesis in animals. Mol Cell. 2010;38(3):323-32.
20- Ivey KN, Srivastava D. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. Cell Stem Cell. 2010;7(1):36-41.
21- Xu N, Papagiannakopoulos T, Pan G, Thomson JA, Kosik KS. MicroRNA-145 regulates OCT4, SOX2, and KLF4 and represses pluripotency in human embryonic stem cells. Cell. 2009;137(4):647-58.
22- Moradi S, Asgari S, Baharvand H. Concise review: Harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. Stem Cells. 2014;32(1):3-15.
23- Panepucci RA, De Souza Lima IM. Arrayed functional genetic screenings in pluripotency reprogramming and differentiation. Stem Cell Res Ther. 2019;10(1):24.
24- Kichkin E, Visvanathan A, Lovicu FJ, Shu DY, Das SJ, Reddel SW, et al. Postnatal development of spasticity following transgene insertion in the mouse βIV spectrin gene (SPTBN4). J Neuromuscul Dis. 2017;4(2):159-64.
25- Amini S, Fathi F, Mobalegi J, Sofimajidpour H, Ghadimi T. The expressions of stem cell markers: Oct4, Nanog, Sox2, nucleostemin, Bmi, Zfx, Tcl1, Tbx3, Dppa4, and Esrrb in bladder, colon, and prostate cancer, and certain cancer cell lines. Anat Cell Biol. 2014;47(1):1-11.

www.SID.ir

Archive of SID

2008;455(7216):1124-8.
30- Melton C, Judson RL, Blelloch R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. Nature. 2010;463(7281):621-6.
31- Kawasaki H, Taira K. Hes1 is a target of microRNA-23 during retinoic-acid-induced neuronal differentiation of NT2 cells. Nature. 2003;423(6942):838-42.
32- Le MT, Xie H, Zhou B, Chia PH, Rizk P, Um M, et al. MicroRNA-125b promotes neuronal differentiation in human cells by repressing multiple targets. Mol Cell Biol. 2009;29(19):5290-305.
33- Moustakas A, Pardali K, Gaal A, Heldin CH. Mechanisms of TGF-β signaling in regulation of cell growth and differentiation. Immunol Lett. 2002;82(1-2):85-91.
26- Serrano F, Bernard WG, Granata A, Iyer D, Steventon B, Kim M, et al. A novel human pluripotent stem cell-derived neural crest model of Treacher Collins Syndrome shows defects in cell death and migration. Stem Cells Dev. 2019;28(2):81-100.
27- Fernald RD. Eyes: Variety, development and evolution. Brain Behav Evol. 2004;64(3):141-7.
28- Walcher T, Xie Q, Sun J, Irmler M, Beckers J, Öztürk T, et al. Functional dissection of the paired domain of Pax6 reveals molecular mechanisms of coordinating neurogenesis and proliferation. Development. 2013;140(5):1123-36.
29- Tay Y, Zhang J, Thomson AM, Lim B, Rigoutsos I. MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. Nature.

www.SID.ir