

# Therapeutic Efficacy Analysis of lncRNA NEAT1 Gene Knockout and Apoptosis Induction in Prostate Cancer Cell Line Using CRISPR/Cas9

Nastaran Haghighi<sup>1</sup> , Abbas Doosti<sup>2,\*</sup> , Jafar Kiani<sup>3</sup>

<sup>1</sup> PhD Student in Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>2</sup> Associate Professor, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

\* **Corresponding Author:** Abbas Doosti, Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran. Email: [abbasdoosti@yahoo.com](mailto:abbasdoosti@yahoo.com)

**Received:** 22.12.2020

**Accepted:** 13.04.2021

## How to Cite this Article:

Haghighi N, Doosti A, Kiani J. Therapeutic Efficacy Analysis of lncRNA NEAT1 Gene Knockout and Apoptosis Induction in Prostate Cancer Cell Line Using CRISPR/Cas9. *Avicenna J Clin Med.* 2021; 28(1): 49-58. DOI: 10.29252/ajcm.28.1.49

## Abstract

**Background and Objective:** Long non-coding ribonucleic acid (lncRNA) has been identified as an important gene regulator and prognostic marker in various cancers. The present study aimed to investigate the effects of Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript1 (NEAT1) gene knockout using Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-associated Protein 9 (CRISPR/Cas9) in PC-3 cell line.

**Materials and Methods:** In this experimental study, recombinant plasmids carrying single guide RNA in the CRISPR system were designed and constructed. The prostate cancer PC3 cell lines were transfected by recombinant vectors, and apoptotic gene expression was evaluated using the quantitative polymerase chain reaction technique. Furthermore, annexin, MTT, and wound healing assays were applied for apoptosis, cell proliferation, and cell migration activities respectively.

**Results:** Knockout of NEAT1 gene using CRISPR/Cas9 technique caused significant changes in the expression of apoptosis-related genes in a way that the expression of P21, BCL2, and BIRC5 genes decreased, while the expression of P53 and BAX increased. In addition, in the treatment group, the rate of cell proliferation and migration was reduced compared to those in the control group. Moreover, an increase was observed in the apoptosis rate in genetically modified cells compared to the control group.

**Conclusion:** As an oncogene, NEAT1 plays an important role in tumorigenesis and its knockout reduces cell survival and migration and increases the apoptosis of cancer cells.

**Keywords:** CRISPR-Associated Protein 9, NEAT1 Long Non-coding RNA, Prostatic Neoplasms, PC-3 Cells

## بررسی اثرات درمانی حذف lncRNA NEAT1 و القای آپوپتوز در رده سلولی سرطان پروستات با استفاده از CRISPR/Cas9

نسترن حقیقی<sup>۱</sup>، عباس دوستی<sup>۲\*</sup>، جعفر کیانی<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی، گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

<sup>۲</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

<sup>۳</sup> استادیار، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

\* نویسنده مسئول: عباس دوستی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران.

ایمیل: abbasdoosti@yahoo.com

### چکیده

**سابقه و هدف:** lncRNA (Long non-coding ribonucleic acid) به عنوان کنترل‌کننده اساسی ژن‌ها و مارکرهای پیش‌آگهی در سرطان‌های مختلف شناسایی شده است. در این مطالعه، اثر تخریب NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) lncRNA با استفاده از سیستم CRISPR/Cas9 (Clustered regularly interspaced short palindromic repeats/ CRISPR associated protein 9) در رده سلولی PC-3 مورد بررسی قرار گرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی، پلاسمیدهای نوترکیب حامل sgRNA (Single guide RNA) در سیستم CRISPR طراحی و ساخته شدند. سلول‌های رده سرطان پروستات PC-3 با وکتورهای نوترکیب، ترانسفکت شده و میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز با استفاده از روش q-PCR (Quantitative polymerase chain reaction) سنجیده شد. از آزمون‌های انکسین، MTT و خراش سلولی به ترتیب برای بررسی فعالیت‌های آپوپتوزی، زیستایی و تکثیر سلولی و مهاجرت سلولی استفاده گردید.

**یافته‌ها:** تخریب ژن NEAT1 با روش CRISPR/Cas9 سبب تغییرات محسوس در بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز گردید؛ به طوری که بیان ژن‌های P21، BCL2 و BIRC5 کاهش یافت و بیان P53 و BAX افزایش پیدا کرد. علاوه بر این در سلول‌های گروه تیمار، میزان تکثیر و مهاجرت سلولی نسبت به گروه کنترل کاسته شد. افزایش آپوپتوز در سلول‌های ویرایش ژن شده نسبت به گروه کنترل مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** NEAT1 به عنوان یک انکوژن، نقش مهمی در تومورزایی دارد و تخریب آن سبب کاهش بقا و مهاجرت سلولی و نیز افزایش آپوپتوز سلول‌های سرطانی می‌شود.

**واژگان کلیدی:** ژن NEAT1، سرطان پروستات، سلول‌های PC-3، کریسپر Cas9

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۹/۱۰/۰۲

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۰/۰۱/۲۴

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی همدان محفوظ است.

### مقدمه

سرطان‌ها دارد؛ اما بر خلاف سایر سرطان‌ها، توانایی تعیین و شناسایی ژن‌های مربوط به آن محدود است [۱]. تقریباً تمام سرطان‌های پروستات، آدنوکارسینوم هستند؛ به این معنا که این سرطان‌ها از سلول‌های غده‌ای پروستات نشأت می‌گیرند [۲].

RNA بلند غیر کدکننده (lncRNAs)، عناصر ژنومی با طول بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید هستند که به دلیل نداشتن چهارچوب خوانش کامل (ORF: Open Reading Frame) قادر به تولید پروتئین نمی‌باشند. این عناصر با تغییر ساختار یا اتصال به پروتئین‌های خاص همچون پروتئین‌های متصل شونده به

سرطان پروستات (Prostate Cancer) شایع‌ترین سرطان در بین مردان جهان است. این سرطان دومین سرطان شایع پس از سرطان ریه و سومین عامل مرگ و میر ناشی از سرطان در کشورهای پیشرفته می‌باشد [۱]. افزایش سن و نوع نژاد، عوامل اصلی خطر بروز سرطان پروستات محسوب می‌شوند. بررسی‌ها نشان داده‌اند که تشخیص زودهنگام سرطان پروستات سبب کاهش خطر مرگ می‌گردد. شروع زودهنگام درمان نیز باعث افزایش طول عمر و بهبود کیفیت زندگی بیماران می‌شود [۲]. طبق گزارشات ارائه شده، سرطان پروستات بالاترین وراثت‌پذیری را در بین انواع

توقف چرخه سلولی و کاهش تکثیر سلول‌های سرطان پروستات) می‌شود [۱۲].

با توجه به نقش انکوژنی NEAT1 در اکثر سرطان‌ها به نظر می‌رسد که با سرکوب این عامل، بسیاری از ویژگی‌های مربوط به سلول‌های سرطانی از بین برود و روش درمانی جدیدی معرفی گردد. سرکوب lncRNA انکوژن با روش‌های مولکولی با استفاده از RNA مداخله‌گر، RNA سنجاق سری کوتاه، میکرو RNA، دی‌کویل‌ها و آپتامرها در مطالعات پیشین انجام شده و نتایج محسوسی در زمینه جلوگیری از پیشرفت سلول‌های سرطانی حاصل شده است [۱۳]. در دهه اخیر، تکنولوژی جدیدی با عنوان کریسپر (CRISPR) معرفی شده است که انقلابی را در زمینه تحقیقات زیست پزشکی ایجاد کرده است؛ زیرا با استفاده از این تکنولوژی نوین، ایجاد انواع مدل‌های سلولی، مدل‌های حیوانی و همچنین بررسی سیستماتیک ژنوم فراهم گردیده است. کریسپر شامل تکرارهای پالیندرومی فاصله‌دار منظم خوشه‌ای همراه با ژن کدکننده پروتئین Cas (CRISPR associated protein) می‌باشد که قابلیت جستجو، برش زدن و سرانجام ویرایش DNA را دارد. معروف‌ترین سیستم کریسپر، نوع CRISPR/Cas9 است که قادر به برش DNA دو رشته‌ای در محل‌های دقیق تعیین شده می‌باشد. سیستم CRISPR/Cas9 نسبت به سایر روش‌های مولکولی مورد استفاده در ویرایش ژنوم، مزایای زیادی مانند دقت و سرعت زیاد، سادگی روش و مقرون به صرفه بودن دارد [۱۴]. رده سلولی PC-3 به عنوان یکی از معروف‌ترین رده‌های سلولی سرطان پروستات در مطالعات مختلف در زمینه این سرطان در سراسر دنیا کاربرد فراوان دارد. سلول PC-3 اولین بار از تومور سلول‌های اپیتلیال از نوع آدنوکارسینوم پروستات انسان که به بافت استخوان متاستاز داده بود، به دست آمد [۱۵].

در مطالعه حاضر بقای سلولی، آپوپتوز، مهاجرت و تهاجم سلولی، قبل و بعد از تخریب RNA بلند غیر کدکننده NEAT1 در رده سلولی سرطان پروستات PC-3 بررسی شد. همچنین، میزان بیان ژن‌های مرتبط با سرطان و آپوپتوز در سلول‌های PC-3 دستکاری شده نسبت به سلول‌های نرمال به روش real time PCR ارزیابی گردید.

## مواد و روش‌ها

### مواد، باکتری، سلول و کیت‌ها

در این مطالعه از وکتور کریسپری 2A--(PX459)V2.0 (Addgene, USA) pSpcas9(BB)Puor برای کلون‌سازی قطعات DNA بیان‌کننده RNA راهنما (sgRNA) استفاده شد. همچنین از باکتری E. coli سویه TOP10 برای تکثیر پلاسمیدهای نوترکیب بهره گرفته شد. شاپان ذکر است که کیت استخراج پلاسمید (یکتا تجهیز آزما، ایران) برای تخلیص وکتورهای نوترکیب از باکتری E. coli به کار برده شد. سلول رده سرطان پروستات به نام PC-3 (بانک سلولی ایران) برای انجام

RNA، در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها در مرحله رونویسی و پس از آن نقش دارند و به تبع آن انواع مختلف عملکردهای سلولی مانند تکثیر، تمایز، تهاجم و آپوپتوز را کنترل می‌کنند [۴]. مطالعات پیشین نشان داده‌اند که اختلال در میزان بیان lncRNA با تومورزایی بسیاری از سرطان‌ها مانند سرطان پروستات، معده، سرویکس، ریه، کبد و غیره در ارتباط هستند. این عامل حاکی از نقش مهم RNA بلند غیر کدکننده در تومورزایی و پیشرفت سرطان به عنوان انکوژن یا سرکوب‌کننده تومور می‌باشد [۵]. یک lncRNA تازه شناسایی شده، NEAT1 است که روی کروموزوم ۱۱ انسان در موقعیت 11q13.1 واقع شده است. ژن NEAT1 دو رونوشت NEAT1-1 به اندازه ۳/۷ کیلوباز و NEAT1-2 به اندازه ۲۳ کیلوباز را ایجاد می‌کند. این lncRNA به عنوان بخش مهمی در ساختار دامین هسته‌ای که پاراسپکل (Paraspeckle) نامیده می‌شود، شرکت نموده و در تنظیم بیان ژن‌ها به ویژه با نگه داشتن پروتئین‌ها و RNA در هسته مشارکت می‌کند [۶]. به طور کلی، مطالعات پیشین اختلال بیان و ارزش تشخیصی NEAT1 را در انواع مختلف تومورها نشان داده‌اند و نقش این lncRNA را به عنوان انکوژن که سبب پیشرفت تومور می‌شود، تأیید نموده‌اند [۷]. افزایش بیان این انکوژن در طیف مختلفی از سرطان‌ها از جمله سرطان پروستات، گلیوما، ریه، پستان، معده، کلورکتال، کبد و کلیه گزارش شده است [۸]. با در نظر گرفتن این موضوع که گزارشات متعدد، ارتباط گسترده وسیعی از انواع سرطان‌ها را وابسته به اختلال بیان NEAT1 می‌دانند؛ اما مکانیسم دقیق این عامل در تومورزایی تا حدودی ناشناخته مانده است. به نظر می‌رسد که این عامل وابسته به ژن‌های فرادست تنظیم‌کننده NEAT1 همچون Runx1 و ER  $\alpha$ ، HIF-2  $\alpha$ ، Oct4، p53، miR-548ar و miR-124 موجب تنظیم منفی این lncRNA می‌شوند [۹]. با بیان NEAT1، گروهی از miRNA همچون miR-124، ۱۲۹، ۱۸۱d، ۲۰۴، ۲۱۱، ۲۱۴، ۳۳۵، ۳۷۷، ۴۴۹b، ۵۰۶، ۶۱۳، ۱۰۷، ۱۰۱، ۹۸، miR-34 و Let-7 سرکوب می‌شوند که این امر با تکثیر سلولی، آپوپتوزیس، تهاجم، مهاجرت، متاستازیس، انتقال اپیتلیال به مزانشیم، نفوذپذیری سد خونی-توموری و حساسیت به مواد شیمیایی در ارتباط است [۱۰].

در سرطان پروستات، NEAT1 بیشترین بیان را نسبت به سایر lncRNA دارد که این امر با پیشرفت سرطان، اختلالات متابولیکی، افزایش سرعت متاستاز، مقاومت به آنتاگونیست رسپتور آندروژن و کمبود آندروژن در ارتباط می‌باشد [۱۱]. سرکوب بیان ژن NEAT1 به ترتیب با کاهش بیان فاکتور رونویسی CDC5L (Cell Division Cycle 5 Like) و تنظیم ژن ARGN موجب بروز ویژگی‌های فنوتیپی قوی در سلول (از جمله افزایش تخریب DNA (Deoxyribonucleic acid)،

اسپکتروفتومتری توسط دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) بررسی گردید.

### کشت سلول و دست‌ورزی سلول‌ها

رده سلولی سرطان پروستات PC-3 از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران با کد سلولی C427 خریداری شد. این سلول در محیط کشت RPMI-1640 حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS: Fetal Bovine Serum) و آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین و استرپتومایسین (۱۰۰ یکای بین‌المللی بر میلی‌لیتر پنی‌سیلین و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر استرپتومایسین) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و با فشار ۵ درصد گاز CO<sub>2</sub> (Carbon dioxide) کشت داده شد. به منظور انجام ترانسفکشن (انتقال وکتورها به سلول)، سلول‌های PC-3 در سه خانه از یک پلیت شش خانه‌ای مخصوص کشت سلول به تعداد ۳۰۰ هزار سلول به ازای هر خانه انتقال داده شدند. پس از رسیدن سلول‌ها به تراکم ۸۰ درصد، وکتورهای نوترکیب به صورت زیر و با استفاده از روش لیپوفکشن (لیپوفکتامین ۲۰۰۰، شرکت ترموفیشر، آمریکا) به هریک از خانه‌ها منتقل گردیدند. در خانه اول، دو وکتور PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به صورت توأم به سلول‌های PC-3 منتقل شدند (گروه تیمار) و در خانه دوم، پلاسمید کنترل PX459-GFP اضافه گردید (گروه کنترل). خانه سوم نیز شامل سلول‌هایی بود که هیچ‌گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند. پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت روی سلول‌ها با محیط تازه حاوی پورومایسین (۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) تعویض شد. نشانگر انتخابی وکتور کریسپری PX459، مقاومت نسبت به آنتی‌بیوتیک پورومایسین است. در واقع سلول‌های دریافت‌کننده وکتور، زنده می‌مانند و سلول‌هایی که ترانسفکشن نشده باشند، در حضور پورومایسین از بین می‌روند. برای اطمینان از صحت ترانسفکشن سلول‌ها با وکتور PX459، سلول‌های حاوی وکتور PX459-GFP که بیان‌کننده پروتئین سبز فلورسنت هستند، با میکروسکوپ فلورسنت مشاهده شدند. وجود رنگ سبز فلورسنت در این سلول‌ها نشان‌دهنده موفقیت عملکرد لیپوفکتامین در انتقال وکتورها به سلول‌های PC-3 می‌باشد.

برای بررسی انجام حذف ژنی (ویرایش ژنی) در خصوص ژن NEAT1 در سلول‌های تحت تیمار با دو وکتور PX459-sgRNA1 و sgRNA2، واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی ژن NEAT1 انجام شد. طول کامل ژن NEAT1 در سلول به اندازه ۲۲۷۴۳ جفت باز است. ساختار و عملکرد sgRNA ۱ و ۲ که توالی آن‌ها در بالا نشان داده شد، به گونه‌ای می‌باشد که موجب حذف یک قطعه ۸۳۶۳ جفت بازی از ابتدای ژن NEAT1 می‌گردد. برای تأیید حذف این قطعه در سلول‌های دستکاری شده، به ترتیب پرایمرهای NEAT1-F/NEAT1-R1 و NEAT1-F/NEAT1-R2 در واکنش‌های PCR جداگانه به

تجربیات ویرایش ژنوم مورد استفاده قرار گرفت. از کیت استخراج DNA (سینا کلون، ایران) نیز برای جداسازی DNA real سلول‌های سرطانی استفاده گردید و برای انجام PCR و time PCR از مواد و واکنش‌گرهای ساخت شرکت یکتا تجهیز آزما بهره گرفته شد. جزئیات استفاده از این سلول‌ها و مواد در بخش‌های زیر به تفصیل آمده است.

### طراحی، تکثیر و استخراج وکتور نوترکیب

در این مطالعه تجربی، سیستم ویرایش ژنی با استفاده از روش کریسپر به گونه‌ای طراحی گردید که بتوان به کمک آن بخشی از ژن NEAT1 را در ژنوم رده سلولی سرطان پروستات PC-3 حذف کرد. برای این منظور، دو توالی RNA راهنمای تک‌رشته‌ای (sgRNA) به ترتیب sgRNA1 با توالی CCTACATAGCCACTAACATC و sgRNA2 با توالی GAAGTGTCTGTGCTGAGCCT با استفاده از نرم‌افزار Chop-Chop طراحی شدند. SgRNA به گونه‌ای طراحی گردید که در صورت عملکرد صحیح سیستم کریسپری، بخش بزرگی از اگزون ژن مورد نظر حذف گردد و ژنوم سلول قادر به تولید محصول صحیح ژن NEAT1 نباشد.

دو توالی sgRNA طراحی شده به صورت مجزا به دو پلاسمید pSpcas9(BB)2A-Puor-(PX459)V2.0 (Addgene, USA) وارد شده و بدین ترتیب وکتورهای پلاسمیدی نوترکیب اختصاصی به نام‌های PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 ایجاد گردیدند. در این راستا و به منظور تأیید صحت وکتورهای نوترکیب به دست آمده، از واکنش PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی بهره گرفته شد. پرایمر فوروارد از روی توالی پروموتور hU6 موجود در وکتور PX459 انتخاب شد و با عنوان Hu6-F نام‌گذاری گردید. همچنین از روی بخشی از توالی هریک از sgRNA ۱ و ۲ کلون شده به همراه قسمتی از توالی مجاور در محل کلون‌سازی آن‌ها در وکتور، پرایمر ریورس اختصاصی برای هر sgRNA طراحی گردید و با عنوان P-NEAT1-sg1 و P-NEAT1-sg1 نامیده شد (جدول ۱). با انجام PCR با هریک از جفت پرایمرهای P-NEAT1-sg1/Hu6-F و P-NEAT1-sg2/Hu6-F، محصولات PCR به اندازه ۲۷۶ جفت باز ایجاد می‌شود که این مهم نشان‌دهنده حضور هر sgRNA در وکتور مربوطه است. به منظور کنترل آزمایشات در تمامی مراحل، از یک وکتور کریسپری دیگر حامل ژن GFP (PX459-GFP) که فاقد هرگونه sgRNA بود، استفاده گردید.

به منظور تکثیر وکتورهای مذکور از باکتری E. coli سویه TOP10 استفاده شد. برای انتقال وکتورها به این باکتری، روش شیمیایی (CaCl<sub>2</sub>) و شوک حرارتی مورد استفاده قرار گرفت. پس از تکثیر باکتری‌های حامل وکتورها، استخراج پلاسمید با استفاده از کیت شرکت یکتا تجهیز آزما براساس دستورالعمل آن انجام شد. کیفیت و غلظت پلاسمیدهای تخلیص شده به روش

در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انجام شد و تکثیر نهایی در یک سیکل در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ دقیقه صورت گرفت. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شدند و پس از رنگ‌آمیزی با اتیدیوم بروماید، با استفاده از دستگاه UVI tech (انگلستان) تصویربرداری از ژل انجام شد.

### استخراج RNA و سنتز DNA مکمل

RNA سلول‌ها در هر دو گروه کنترل و تیمار با استفاده از محلول RNX-Plus (سینا کلون، ایران) طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج گردید و DNA مکمل با استفاده از کیت سنتز cDNA (یکتا تجهیز آزما، ایران) و پرایمرهای رندوم هگزامر سنتز شد.

### بررسی میزان بیان ژن‌ها به روش q-RT-PCR (Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction)

با توجه به اینکه RNA بلند غیر کدکننده نظیر NEAT1 نقش مهمی را در ایجاد سرطان ایفا می‌کند و این نقش را در ارتباط با کاهش یا افزایش بیان ژن‌های مرتبط با سرطان و آپوپتوز انجام می‌دهد، در این مطالعه بیان تعدادی از مهم‌ترین ژن‌های مرتبط با سرطان و آپوپتوز نظیر BAX، P53، BIRC5، BCL2 و P21 در دو گروه سلول تیمار و کنترل بررسی گردید. دو ژن پروآپوپتوتیک (BAX و P53) در کنار ژن‌های آنتی‌آپوپتوتیک P21، BCL2 و BIRC5 به صورت زیر مورد ارزیابی قرار گرفتند. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی این ژن‌ها (جدول ۱)، واکنش real time RT-PCR برای بررسی بیان ژن صورت گرفت. از ژن خانه‌داری (Hose kipping) به نام GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) برای

کار برده شدند. محصول PCR حاصل از فعالیت دو پرایمر F و R1، یک قطعه ۸۹۵۳ جفت بازی خواهد بود و در صورتی که حذف ژنی اتفاق افتاده باشد، قطعه‌ای به طول ۸۳۶۳ از درون قطعه ۸۹۵۳ خارج می‌گردد؛ از این رو محصولی به اندازه تقریبی ۵۹۰ جفت باز تشکیل خواهد شد که نشان‌دهنده موفقیت‌آمیز بودن ویرایش و تخریب ژن NEAT1 می‌باشد. لازم به توضیح است از آنجایی که با انجام PCR معمولی و مرسوم، تکثیر قطعه‌ای به بزرگی ۸۹۵۳ جفت باز مشکل و تقریباً ناممکن می‌باشد، پرایمر R2 درون قطعه حذف شونده و در نزدیکی پرایمر F طراحی و سنتز گردید که محصولی معادل ۱۰۰۱ جفت باز را تشکیل داد. در مجموع، انجام PCR با پرایمرهای F/R1 و تشکیل باند حدود ۵۹۰ جفت بازی نشان‌دهنده حذف قطعه هدف است؛ اما در صورت انجام PCR با پرایمرهای F/R2 و تشکیل باند ۱۰۰۱ جفت بازی مشخص می‌گردد که حذف ژن صورت نگرفته است؛ بدین معنا که جایگاه اتصال پرایمر R2 هنوز در ژنوم موجود بوده و ویرایش ژنی به درستی صورت نپذیرفته است.

برای انجام واکنش‌های PCR ذکر شده، ابتدا از سلول‌های PC-3 هر گروه با استفاده از کیت استخراج DNA (سینا کلون، ایران)، DNA ژنومی سلول‌ها تخلیص گردید. سپس هر واکنش PCR با استفاده از ۱۰ میکرولیتر مستر میکس PCR با غلظت 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۵ میکرولیتر (۰/۰۳ نانومول) از هر کدام از پرایمرها، ۱۰۰ نانوگرم از DNA الگو و افزودن آب مقطر تا رسیدن به حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. برنامه دمایی در دستگاه ترمال سایکلر (اپندرف، آلمان) طبق برنامه دمایی دنا توره شدن اولیه در یک مرحله در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه و در ادامه در ۳۰ مرحله پیاپی شامل: دنا توره شدن در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در دماهای مخصوص هر پرایمر (جدول ۱) به مدت ۱ دقیقه و تکثیر

جدول ۱: توالی پرایمرهای اختصاصی استفاده شده برای تکثیر قطعات مورد نظر در واکنش‌های PCR و q-RT-PCR

ژن	نام پرایمر	توالی پرایمرها 5'-----3'	دمای اتصال (درجه سانتی‌گراد)
hU6	Hu6-F	GAGGGCCTATTTCCCATGATT	۶۲
PX549-sgRNA1	P-NEAT1-sg1	AAGACCGATGTTAGTGGCTATG	۶۲
PX549-sgRNA2	P-NEAT1-sg2	AAGACCAGGCTCAGCACAGAC	۶۲
NEAT1	NEAT1-R1 NEAT1-F NEAT1-R2	ACCTCGAACTCCTAGCCTCCTC CTTTCATCTGCTTGTTCGTGCTC CTTGTGCACTCTTGGTGAGAAC	۶۲
P53	P53-F P53-R	GTTCGAGAGCTGAATGAGG ACTTCAGGTGGCTGGAGTGA	۶۴
P21	P21-F P21-R	GCTTCATGCCAGCTACTTCC CCCTCAAAGTGCCATCTGT	۶۲
BCL-2	BCL-2-F BCL-2-R	GACGACTTCTCCCGCCGCTAC CGGTTCCAGGTAAGTCAATCCAC	۵۹
BIRC5	BIRC5-F BIRC5-R	TGCTGGCAGCCCTTTC CCTCCAAGAAGGGCCAGTTC	۶۲
BAX	BAX-F BAX-R	ACTTCAGGTGGCTGGAGTGA AGGTCTTTTCCGAGTGGCAGC	۶۱
GAPDH	GAPDH-F GAPDH-R	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC	۶۴

### سنجش مهاجرت سلولی

مهاجرت رده سلولی با استفاده از آزمون خراش (Scratch-wound assay) در سلول‌های ترانسفکت شده و شاهد انجام شد. پس از کشت و تیمار رده سلولی و رسیدن سلول‌ها به تراکم مناسب، سلول‌ها در پلیت‌های شش خانه‌ای پخش گردیدند و به آن‌ها اجازه داده شد تا کف پلیت را پر کنند. در مرحله بعد با استفاده از سرسمپلر زرد استریل، خط عمودی در راستای پلیت شش خانه‌ای ایجاد شد و کف پلیت برای حذف سلول‌های جدا شده با استفاده از محیط کشت بدون FBS و آنتی‌بیوتیک شستشو داده شد و در ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت بعد، عکس برداری از پلیت صورت گرفت. نسبت مهاجرت سلولی از طریق محاسبه تعداد سلول‌های موجود در ناحیه خراش ارزیابی گردید [۱۸].

### آنالیزهای آماری

تمامی آزمون‌های انجام شده به صورت سه بار تکرار بودند و نتایج آزمون آماری توصیفی به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شدند. به منظور آنالیز آماری تغییرات بین رده سلولی ترانسفورم شده و گروه شاهد، از نرم‌افزار REST 2009 استفاده گردید. سپس نتایج به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار SPSS 22 تجزیه و تحلیل شدند. برای بررسی وجود یا عدم وجود ارتباط معنادار و میزان آن از آزمون‌های (Least Significant Difference) LSD و Independent t-test استفاده گردید. نمودارهای مورد نیاز پس از بررسی آماری به کمک نرم‌افزار GraphPad Prism ترسیم گشت. تمامی داده‌ها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار ارائه شده و سطح معناداری کمتر از  $P < 0.05$  در نظر گرفته شد.

### یافته‌ها

#### تأیید فرایند کلونینگ و ساخت وکتور نوترکیب

پس از کلون‌سازی sgrRNA در وکتورهای کریسپری، دو وکتور نوترکیب PX459-sgrRNA1 و PX459-sgrRNA2 ایجاد شدند. انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی هر یک از sgrRNA شامل: P-NEAT1-sg1 و P-NEAT1-sg2 به همراه پرایمر فوروارد Hu6-F روی وکتور نوترکیب مربوطه سبب تشکیل باند ۲۷۶ جفت بازی گردید. با توجه به اینکه اندازه هر یک از دو sgrRNA کلون شده مساوی است، در نهایت باند ۲۷۶ جفت بازی در نتیجه انجام PCR روی هر کدام از وکتورها حاصل شد که نشان‌دهنده صحت درج sgrRNA در وکتورهای کریسپری می‌باشد.

#### تأیید صحت لیپوفکشن

در شرایط یکسان، سلول‌های PC-3 به دو گروه تقسیم شدند. گروه اول هر دو وکتور کریسپری حاوی sgrRNA را به صورت

نرمال‌سازی داده‌های real time PCR بهره گرفته شد. در هر واکنش با مقدار ۷/۵ میکرولیتر Super SYBR Green 2x (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۳ نانومول از پرایمرهای فوروارد و ریورس (جدول ۱)، ۲ میکرولیتر cDNA با افزودن آب مقطر در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر انجام شد. مخلوط واکنش‌گرها در دستگاه real time PCR (کیژن، آلمان) با برنامه دمایی یک مرحله ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ دقیقه و به دنبال آن ۴۵ مرحله شامل ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، سپس دمای اتصال هر پرایمر (جدول ۱) به مدت ۲۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه انجام شد. شایان ذکر است که آنالیز منحنی ذوب در دمای بین ۶۵ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با رنج افزایش دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر ثانیه تنظیم شد. در نهایت، داده‌های به دست آمده با استفاده از نرم‌افزار Rotor Gene 6000 در دستگاه real time PCR روش  $2^{-\Delta\Delta CT}$  آنالیز گردیدند.

### آزمون انکسین و بررسی آپوپتوز

با استفاده از کیت Annexin-V-FITC/Propidium iodide (ترموفیشر، آمریکا) و طبق پروتکل مربوطه، میزان آپوپتوز و نکروز در هر دو گروه سلول ویرایش شده به کمک سیستم کریسپری و گروه کنترل بررسی گردید. به این صورت که تعداد  $10^6$  سلول از هر کدام از گروه‌های سلولی با ۱ میلی‌لیتر بافر اتصال انکسین IX (Annexin-V binding buffer) مخلوط گردید. سپس مقدار ۵ میکرولیتر انکسین V و ۲ میکرولیتر PI (Propidium Iodide) به ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط سلولی اضافه شد و پس از سپری شدن ۲۰ دقیقه، در شرایط دور از نور و در دمای اتاق، مخلوط سلولی جهت خوانش نهایی به داخل دستگاه فلوسایتومتری (ترموفیشر، آمریکا) منتقل گردید و با طول موج ۷۰۰ نانومتر بررسی شد [۱۶].

### بررسی اثر سایتوتوکسیک

به منظور بررسی تأثیر سایتوتوکسیک تخریب ژن NEAT1 بر رده سلولی سرطانی PC-3 و سلول کنترل، روش MTT یا نمک زرد تترازولیوم (سیگما، آلمان) مورد استفاده قرار گرفت. به طور خلاصه، به سلول‌های تیمار شده موجود در چاهک‌ها پس از انکوباسیون در شرایط دمایی و فشاری مذکور، حدود ۱۰ میکرولیتر MTT (۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر در PBS) اضافه گردید و به مدت چهار ساعت انکوبه شد تا کریستال‌های فورمازین در طول دوره انکوباسیون تشکیل شوند. سپس با اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر از مخلوط DMSO (Dimethyl sulfoxide)، مخلوط کردن کامل و انکوبه کردن به مدت ۵ دقیقه، جذب نوری (OD: Optical density) هر یک از چاهک‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر و طول موج رفرنس ۵۶۰ نانومتر با استفاده از دستگاه ELISA reader (PalmCity, FL, USA) (Awareness Technology) گزارش شد [۱۷].

## تغییر بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز

میزان بیان ژن‌های P21, BCL2, BIRC5, P53 و BAX در دو گروه سلول تیمار و کنترل به روش real time RT-PCR نتایج زیر را به دست داد. در سلول‌های ترانسفکت شده با دو وکتور PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 (گروه تیمار)، میزان بیان ژن‌های P21, BCL2 و BIRC5 کاهش محسوسی را نسبت به سلول‌های گروه کنترل نشان داد ( $P < 0.05$ ). از سوی دیگر، بیان دو ژن P53 و BAX به عنوان ژن‌های پروآپوپتوزی در سلول‌های دست‌ورزی شده نسبت به سلول‌های شاهد، به شکل معناداری نشان از افزایش بیان داشت ( $P < 0.05$ ). این نتایج مؤید آن هستند که با تخریب NEAT1 به عنوان ژن پیش‌برنده سرطان، بیان سایر ژن‌های مرتبط با سرطان در راستای کاهش بقای سلول سرطانی و افزایش آپوپتوز پیش می‌روند.

## نتایج بررسی آپوپتوز

پس از القای آپوپتوز در رده سلولی PC-3 تحت تیمار (دریافت‌کننده sgRNA) نسبت به سلول‌های کنترل (دریافت‌کننده وکتور فاقد sgRNA) و سلول‌های بدون دستکاری (بدون وکتور)، درصد سلول‌ها در مراحل مختلف آپوپتوز و نکروز به روش فلوسیتومتری محاسبه گردید. درصد آپوپتوز در هر یک از سلول‌های تیمار، کنترل و فاقد پلاسمید به ترتیب ۴۳/۳۸، ۲۰/۳ و ۰/۴۱ درصد بود. همان‌طور که ملاحظه می‌شود، سلول‌هایی که در آن‌ها ژن NEAT1 تخریب شده است، میزان آپوپتوز بالاتری را نسبت به گروه‌های دیگر نشان می‌دهند (شکل ۱)؛ در صورتی که درصد سلول‌های زنده در گروه‌های کنترل و گروه سلول‌های بدون دستکاری نسبت به گروه ویرایش ژن شده، بسیار بیشتر است.

## نتایج MTT

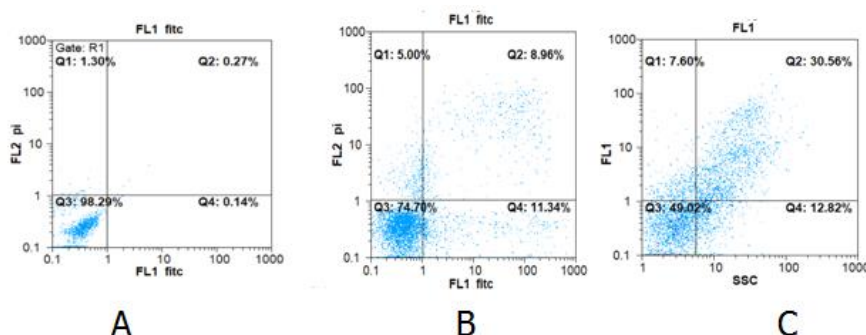
نتایج آزمون MTT نشان‌دهنده کندی تکثیر سلول‌های

همزمان دریافت کرد و گروه دوم وکتور فاقد sgRNA و حاوی پروتئین سبز فلورسنت (GFP: Green fluorescent protein) را دریافت نمود. پس از گذشت ۲۴ ساعت، سلول‌های گروه GFP در زیر میکروسکوپ فلورسنت، رنگ سبز از خود ساطع کردند که نشان‌دهنده صحت انجام لیپوفکشن می‌باشد. از سوی دیگر، مقاومت و زنده ماندن سلول‌های ترانسفکت شده با وکتورهای نو ترکیب در برابر آنتی‌بیوتیک پورومایسین، حضور وکتورها در سلول‌های مقاوم شده را تأیید می‌کند. این در صورتی است که دسته‌ای از سلول‌ها که هیچ‌گونه پلاسمیدی را دریافت نکرده بودند، پس از افزودن آنتی‌بیوتیک نوومایسین به محیط کشت آن‌ها از بین رفتند.

## نتایج ویرایش ژنوم سلولی

پس از انتقال وکتورهای کریسپری به سلول‌های PC-3 (گروه تیمار)، انجام PCR با پرایمرهای NEAT1-F/R1 سبب تشکیل باند DNA به اندازه حدود ۵۹۰ جفت باز شد. از سوی دیگر، اجرای واکنش PCR با پرایمرهای NEAT1-F/R2 در ارتباط با سلول‌های گروه تیمار، هیچ‌گونه باندهایی را در بر نداشت که تأییدی بر حذف توالی هدف می‌باشد؛ زیرا محل اتصال پرایمر R2 در این‌گونه سلول‌ها که دچار حذف ژن شده‌اند، دیگر وجود نخواهد داشت.

در خصوص سلول‌های گروه کنترل (دریافت‌کننده وکتور GFP دار) که انتظار می‌رود هیچ‌گونه فعالیت حذف ژن در آن‌ها صورت نگرفته باشد، انجام PCR با پرایمرهای NEAT1-F/R1 حاصلی در بر نداشت؛ زیرا در سلول‌های ویرایش نشده، طول قطعه حاصل از این واکنش PCR به اندازه ۸۹۵۳ جفت باز خواهد بود که با PCR معمولی قابل انجام نمی‌باشد؛ از این رو به منظور تأیید این‌گونه سلول‌ها، واکنش PCR با دو پرایمر NEAT1-F/R2 انجام شد. حاصل این PCR، تشکیل یک باند ۱۰۰۱ جفت بازی بود که صحیح است.



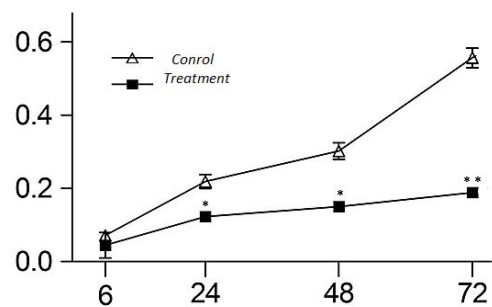
شکل ۱: نتایج آپوپتوز سلولی حاصل از آنالیز فلوسیتومتری در سلول‌های PC-3

A: سلول‌های بدون دستکاری ژنتیکی (بدون پلاسمید) که درصد آپوپتوز در آن‌ها ۰/۴۱ و درصد سلول‌های زنده ۹۸/۲۹ درصد است؛ B: سلول‌های دریافت‌کننده وکتور PX459-GFP در آن‌ها برابر با ۲۰/۳ درصد و میزان سلول‌های زنده برابر با ۷۴/۷۰ درصد است؛ C: سلول‌هایی که ژن NEAT1 در آن‌ها حذف شده است (دریافت‌کننده دو وکتور کریسپری) و در آن میزان آپوپتوز بسیار بالا و برابر با ۴۳/۳۸ درصد و سلول‌های زنده برابر با ۴۹/۰۲ درصد است.

Q1=درصد سلول‌های نکروز؛ Q2=درصد سلول‌ها در آپوپتوز ثانویه؛ Q3=درصد سلول‌های زنده؛ Q4=درصد سلول‌ها در آپوپتوز اولیه

## بحث

در این مطالعه که در ارتباط با رده سلولی سرطان پروستات PC-3 انجام شد، با استفاده از روش نوین ویرایش ژنی CRISPR/Cas9 نسبت به حذف بخش بزرگی از RNA غیر کدکننده بلند به نام NEAT1 که در بروز و پیشرفت سرطان نقش دارد، اقدام شد. با استفاده از روش PCR، تخریب ژن NEAT1 در سلول‌های PC-3 مورد تأیید قرار گرفت. نتایج این تغییر در ژنوم سلول نشان‌دهنده تغییر در بیان تعدادی از ژن‌های مرتبط با آپوپتوز، تغییر در تکثیر سلولی و کاهش بقای سلول‌های سرطانی است؛ به طوری که ژن‌های پروآپوپتوتیک P53 و BAX در سلول‌هایی که ژن NEAT1 آن‌ها تخریب شده بود، نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داد. از سوی دیگر بیان سه ژن آنتی‌آپوپتوتیک P21، BCL2 و BIRC5، نشان‌دهنده کاهش بیان مشخصی در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل بود. آزمون مهاجرت و تکمیل‌کنندگی نیز در سلول‌های گروه تیمار نسبت به گروه کنترل حاکی از کاهش مهاجرت و عدم رشد مناسب در سلول‌های ویرایش شده بود. تمام این شواهد مؤید نقش NEAT1 در رشد و تکثیر سلول‌های سرطانی و نیز بازدارندگی رشد سلول‌های توموری به دلیل تخریب آن می‌باشند. مشخصه اصلی RNA غیر کدکننده، عدم رمزگذاری پروتئین مشخص و تنظیم عملکرد سایر ژن‌ها در سطح RNA است [17]. NEAT1 به عنوان یک lncRNA مهم و تازه کشف شده برای طیفی از ژن‌های پایین‌دست خود، در اکثر سلول‌های سرطانی افزایش بیان را در پی داشت که مؤید نقش آنکوژنی این عامل در پیشرفت سرطان می‌باشد. علاوه بر این، اثر مهاری افزایش بیان این lncRNA بر آپوپتوزیس و سلول‌های سرطانی مشخص شده است [13، 14، 19، 20]. در رده سلول سرطان پروستات نیز نتایج مشابهی به دست آمده است؛ به طوری که افزایش بیان NEAT1 در این سلول‌ها با رشد تومور، متاستازیس و کاهش عمر بیماران تا پنج سال همراه بوده و سرکوب آن با siRNA با مهار تکثیر، مهاجرت، تهاجم و تحریک آپوپتوزیس ارتباط دارد [4، 11]. همسو با مطالعات پیشین، نتایج مطالعه حاضر نیز حاکی از افزایش بیان معنادار NEAT1 در رده سلول سرطانی پروستات نسبت به سلول‌های نرمال بودند که نشان‌دهنده نقش آنکوژنی این عامل در سلول مذکور می‌باشد. در این مطالعه پس از ترانسفکت وکتورهای کریسپری، میزان NEAT1 به شکل چشمگیری کاهش پیدا کرد که این امر نشان از نقش مؤثر و موفق سیستم CRISPR/Cas9 در تخریب و مهار عملکرد این lncRNA دارد. در تأیید مطالعات پیشین، در مطالعه حاضر نیز با تخریب NEAT1، میزان بقای سلولی به میزان قابل توجهی کاهش یافت. همچنین درصد آپوپتوزیس در سلول‌های ترانسفکت شده نسبت به کنترل بیشتر شد؛ به صورتی که در فاز G0/G1، اثر مهاری در این

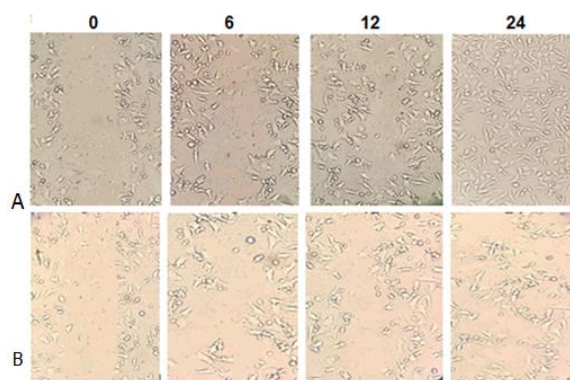


شکل ۲: نتایج آزمون MTT در سلول‌های PC-3

ویرایش ژن شده (فاقد ژن NEAT1) نسبت به گروه کنترل می‌باشند. نتایج بررسی این دو گروه سلول طی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت بعد نشان می‌دهند که با گذشت زمان، میزان تکثیر سلولی در سلول‌های رده سلول سرطانی PC-3 فاقد ژن NEAT1 نسبت به گروه کنترل کاهش یافته است (شکل ۲). با گذشت زمان (محور افقی) در سلول‌های گروه تیمار (حذف ژن NEAT1) نسبت به گروه کنترل (NEAT1 سالم)، تکثیر سلولی کاهش یافته است.

## نتایج آزمون مهاجرت سلولی

نتایج آزمون مهاجرت در دو گروه سلول تحت تیمار و گروه کنترل پس از اعمال خراش در زمان صفر و سپری شدن ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت نشان داد که با گذشت زمان، سلول‌هایی که در آن‌ها ژن NEAT1 تخریب شده است (گروه تیمار)، نسبت به گروه کنترل میزان مهاجرت کمتری را از خود نشان داده‌اند. هرچند در ساعات اولیه مانند ۶ و ۱۲ این کاهش سرعت مهاجرت محسوس نمی‌باشد؛ اما پس از ۲۴ ساعت، میزان مهاجرت سلول‌های ویرایش ژن شده نسبت به گروه کنترل بسیار کندتر شده است. این نتایج در شکل ۳ قابل مشاهده می‌باشد.



شکل ۳: رده سلولی PC-3 پس از آزمون خراش و مهاجرت سلولی ردیف A: سلول‌های گروه کنترل (فاقد sgRNA)؛ گروه B: سلول‌های تیمار شده با دو وکتور کریسپری PX459-sgRNA2 و PX459-sgRNA1 که ژن NEAT1 در آن‌ها تخریب شده است. ۲۴ ساعت پس از ایجاد خراش، سلول‌های کنترل، مهاجرت کامل داشته و خراش را پوشانده‌اند؛ اما سلول‌های گروه تیمار، رشد و مهاجرت کافی نداشته‌اند.



را اعمال کنند. کاهش بیان سه ژن P21، BCL2 و BIRC5 و افزایش بیان P53 و BAX در پاسخ به تخریب NEAT1 نشان دهنده نقش اساسی این پروتئین‌ها در رده سلول سرطانی به ترتیب به عنوان انکوژن و سرکوب کننده تومور است و نشان می‌دهد که NEAT1 در تنظیم ژن‌های اساسی در فرایند تومورزایی نقش دارد.

### نتیجه‌گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان دادند که IncRNA NEAT1 به عنوان انکوژن در رده سلول سرطانی پروستات دخیل بوده و در کنترل بیان ژن‌های درگیر در تومورزایی نقش دارد؛ زیرا تخریب این IncRNA با وکتور کریسپری، بقا و مهاجرت سلول‌های سرطانی را به طور معناداری کاهش داده و در مقابل، آپوپتوزیس سلولی را افزایش بخشیده است؛ بنابراین هدف قرار دادن NEAT1 با تکنولوژی نوین کریسپر که روشی ساده با اختصاصیت بالا و مقرون به صرفه است می‌تواند در درمان سرطان‌ها به ویژه سرطان پروستات، رویکرد جدیدی در درمان سرطان باشد؛ البته کاربرد این روش در شرایط فیزیولوژیک، نیازمند مطالعات گسترده با به‌کارگیری مدل‌های حیوانی مختلف و همچنین مد نظر قرار دادن انتقال هدفمند وکتورهای کریسپری به سلول‌های سرطانی در افراد مبتلا می‌باشد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله برگرفته از رساله دکتری تخصصی ژنتیک مولکولی مصوب دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شماره ۱۶۲۳۹۰۷۸۸ می‌باشد. بدین‌وسیله از همکاران محترم مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد که پژوهشگران را در به ثمر رساندن این مطالعه یاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

### تضاد منافع

نتایج این مطالعه با منافع نویسندگان تعارض ندارد.

### ملاحظات اخلاقی

این پروژه در کمیته اخلاق دانشگاه آزاد شهرکرد با شناسه IR.IAU.SHK.REC.1399.018 تصویب گردیده و تمامی مراحل مطالعه در مورد رده‌های سلولی سرطانی انجام شده است.

### سهم نویسندگان

نویسنده اول (پژوهشگر اصلی): تدوین پروپوزال، انجام آزمون‌های آزمایشگاهی، انجام تحلیل‌های آماری و مشارکت در نگارش مقاله (۵۰ درصد)؛ نویسنده دوم (پژوهشگر اصلی): مسئول مکاتبات، طراحی پروژه، نظارت بر آن و نگارش مقاله (۴۰ درصد)؛ نویسنده سوم (پژوهشگر همکار): مشاور علمی و طراحی

رده سلولی سبب فعال کردن مسیر آپوپتوزی گردید. علاوه‌براین، تخریب NEAT1 نشان‌دهنده میزان مهاجرت سلول‌های سرطانی مذکور به میزان دو برابر پس از گذشت شش ساعت بود. این نتایج علاوه بر تأیید یافته‌های به دست آمده از مطالعات پیشین، پیشنهادکننده نقش حیاتی IncRNA NET1 در تنظیم ژن‌های وابسته به بقا، آپوپتوزیس و مهاجرت سلولی می‌باشد؛ در مطالعه حاضر برخی از ژن‌های وابسته به فرایندهای فوق مورد بررسی قرار گرفت.

در مطالعه حاضر، تخریب NET1 با سیستم کریسپر Cas9 سبب کاهش بیان ژن‌های P21، BCL2 و BIRC5 شد؛ در صورتی که بیان ژن‌های P53 و BAX به میزان چشمگیری افزایش یافت. پروتئین P21 به عنوان مهارکننده چرخه سلولی و تکثیر آن در سلول‌های نرمال فعالیت کرده و با تحریک مهم‌ترین سرکوب‌کننده تومور (P53) در پاسخ به استرس سلولی، افزایش بیان را در پی دارد و در فرایندهای وابسته و غیر وابسته به P53 ایفای نقش می‌کند. در سلول‌های سرطانی، این پروتئین دو نقش متمایز انکوژنی و سرکوب‌کننده تومور را به ترتیب بر حسب موقعیت داخل سیتوپلاسمی یا هسته‌ای بازی می‌کند. در پاسخ به فاکتور رونویسی P53 سبب سرکوب تومور از طریق مهار کمپلکس سیکلین کیناز، آنتی‌ژن هسته‌ای و فاکتورهای رونویسی می‌شود؛ در صورتی که این پروتئین می‌تواند با کاهش تخریب DNA باعث تکثیر سرطان و تومورزایی شود [۲۱، ۲۲]. دومین ژن با کاهش بیان، ژن BCL2 است که مانند P21 عملکرد متناقضی در آغاز و سرکوب فرایند آپوپتوزیس دارد. در بیشتر انواع سرطان، افزایش بیان برخی از اعضای خانواده BCL2 گزارش شده است که موجب بقای سلول‌های سرطانی می‌شود. در مقابل، کاهش بیان تعدادی دیگر از BCL2 درگیر در آغاز فرایند آپوپتوزیس همراه با دیگر پروتئین‌های دیگر در این فرایند همچون BAX در تومورهای بسیاری به اثبات رسیده است [۲۳، ۲۴]. در مطالعه حاضر با توجه به کاهش بیان این ژن در پاسخ به تخریب IncRNA مورد مطالعه به نظر می‌رسد که این پروتئین نقش مهمی در بقای رده سلول سرطانی پروستات دارد. سومین ژن با کاهش بیان در مواجهه با ترانسفکشن سلول‌های سرطانی با وکتورهای کریسپری، ژن کدکننده Survivin (BIRC5) است که پروتئین مربوط به تنظیم چک پوینت دوک میتوزی بوده و در فرایند مهار آپوپتوزیس نقش دارد [۲۵، ۲۶]. افزایش بیان این ژن در مراحل مختلف رشد توموری در سرطان‌های مختلف گزارش شده است و طبق انتظار ما، به عنوان عامل تومورزا با تخریب NET1 دچار کاهش بیان معناداری گردید. همان‌طور که اشاره شد، دو پروتئین مهم P53 و BAX که به ترتیب به عنوان سرکوب‌کننده تومور و تحریک‌کننده فرایند آپوپتوزیس در سلول‌ها نقش دارند، طبق انتظار با تخریب NEAT1 دچار افزایش بیان معناداری شدند تا از این طریق، اثر ضد سرطانی

مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی دانشگاه آزاد اسلامی شهرکرد در اختیار پژوهشگران قرار گرفت. هزینه مواد مصرفی، کیت‌ها و تجهیزات مصرفی نیز توسط پژوهشگر اول فراهم گردید.

سازواره‌های ژنی (۱۰ درصد)

## حمایت مالی

به منظور انجام این طرح، امکانات و تجهیزات دستگاهی از

## REFERENCES

- Obertova Z, Brown C, Holmes M, Lawrenson R. Prostate cancer incidence and mortality in rural men—a systematic review of the literature. *Rural Remote Health*. 2012; **12**(2):2039-51. PMID: 22616627
- Rebbeck TR. Prostate cancer genetics: variation by race, ethnicity, and geography. *Semin Radiat Oncol*. 2017; **27**(1):3-10. PMID: 27986209 DOI: 10.1016/j.semradonc.2016.08.002
- Dunn MW. Prostate cancer screening. *Semin Oncol Nurs*. 2017; **33**(2):156-64. PMID: 28343840 DOI: 10.1016/j.soncn.2017.02.003
- Xing Y, Yao R, Zhang Y, Guo C, Jiang S, Xu G, et al. SLERT regulates DDX21 rings associated with Pol I transcription. *Cell*. 2017; **169**(4):664-78. PMID: 28475895 DOI: 10.1016/j.cell.2017.04.011
- Ning L, Li Z, Wei D, Chen H, Yang C. LncRNA, NEAT1 is a prognosis biomarker and regulates cancer progression via epithelial-mesenchymal transition in clear cell renal cell carcinoma. *Cancer Biomark*. 2017; **19**(1):75-83. PMID: 28269753 DOI: 10.3233/CBM-160376
- Li P, Huang R, Huang T, Cheng S, Chen Y, Wang Z. Long non-coding RNA NEAT1 promotes proliferation, migration and invasion of human osteosarcoma cells. *Int J Med Sci*. 2018; **15**(11):1227-34. PMID: 30123061 DOI: 10.7150/ijms.25662
- Fang J, Qiao F, Tu J, Xu J, Ding F, Liu Y, et al. High expression of long non-coding RNA NEAT1 indicates poor prognosis of human cancer. *Oncotarget*. 2017; **8**(28):45918-27. PMID: 28507281 DOI: 10.18632/oncotarget.17439
- Fu JW, Kong Y, Sun X. Long noncoding RNA NEAT1 is an unfavorable prognostic factor and regulates migration and invasion in gastric cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016; **142**(7):1571-9. PMID: 27095450 DOI: 10.1007/s00432-016-2152-1
- Wang Z, Zou Q, Song M, Chen J. NEAT1 promotes cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by negative regulating miR-613 expression. *Biomed Pharmacother*. 2017; **94**:612-18. PMID: 28783584 DOI: 10.1016/j.biopha.2017.07.111
- Xia TF, Chen J, Wu K, Zhang J, Yan Q. Long noncoding RNA NEAT1 promotes the growth of gastric cancer cells by regulating miR-497-5p/PIK3R1 axis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2019; **23**(16):6914-26. PMID: 31486491 DOI: 10.26355/eurrev\_201908\_18731
- Wei C, Wang F, Liu W, Zhao W, Yang Y, Li K, et al. CRISPR/Cas9 targeting of the androgen receptor suppresses the growth of LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Med Rep*. 2018; **17**(2):2901-6. PMID: 29257308 DOI: 10.3892/mmr.2017.8257
- Li X, Wang X, Song W, Xu H, Huang R, Wang Y, et al. Oncogenic properties of NEAT1 in prostate cancer cells depend on the CDC5L-AGRN transcriptional regulation circuit. *Cancer Res*. 2018; **78**(15):4138-49. PMID: 29871935 DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-18-0688
- Chen B, Deng S, Ge T, Ye M, Yu J, Lin S, et al. Live cell imaging and proteomic profiling of endogenous NEAT1 lncRNA by CRISPR/Cas9-mediated knock-in. *Protein Cell*. 2020; **11**(9):641-60. PMID: 32458346 DOI: 10.1007/s13238-020-00706-w
- Esposito R, Bosch N, Lanzós A, Polidori T, Pulido-Quetglas C, Johnson R. Hacking the cancer genome: profiling therapeutically actionable long non-coding RNAs using CRISPR-Cas9 screening. *Cancer Cell*. 2019; **35**(4):545-57. PMID: 30827888 DOI: 10.1016/j.ccell.2019.01.019
- Tai Sh, Sun Y, Squires J, Zhang H, Oh W, Liang C, et al. PC3 is a cell line characteristic of prostatic small cell carcinoma. *Prostate*. 2011; **71**(15):1668-79. PMID: 21432867 DOI: 10.1002/pros.21383
- Ghasemi-Dehkordi P, Doosti A, Jami MS. The functions of azurin of *Pseudomonas aeruginosa* and human mammaglobin-A on proapoptotic and cell cycle regulatory genes expression in the MCF-7 breast cancer cell line. *Saudi J Biol Sci*. 2020; **27**(9):2308-17. PMID: 32884412 DOI: 10.1016/j.sjbs.2020.04.007
- Abedi S, Doosti A, Jami MS. Evaluation of the preventive and therapeutic effects of a recombinant vector co-expressing prostate-specific stem cell antigen (PSCA) and *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) on prostate cancer in rats. *Biotechnol Prog*. 2020; **36**(2):e2906. PMID: 31513734 DOI: 10.1002/btpr.2906
- Wang X, Decker CC, Zechner L, Krstin S, Wink M. In vitro wound healing of tumor cells: inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC Pharmacol Toxicol*. 2019; **20**(1):4-12. PMID: 30626448 DOI: 10.1186/s40360-018-0284-4
- Ma Y, Liu L, Yan F, Wei W, Deng J, Sun J. Enhanced expression of long non-coding RNA NEAT1 is associated with the progression of gastric adenocarcinomas. *World J Surg Oncol*. 2016; **14**(1):41-6. PMID: 26911892 DOI: 10.1186/s12957-016-0799-3
- Yu DJ, Guo CX, Qian J, Li J, Zhu C, Jin X, et al. The long non-coding RNA NEAT1 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion by regulating miR-103a/STAMBPL1 axis. *Technol Cancer Res Treat*. 2020; **19**:1-8. PMID: 33111649 DOI: 10.1177/15333033820964081
- Shamloo B, Usluer S. p21 in cancer research. *Cancers (Basel)*. 2019; **11**(8):1178-97. PMID: 31416295 DOI: 10.3390/cancers11081178
- Wu D, Li H, Wang J, Li H, Xiao Q, Zhao X, et al. LncRNA NEAT1 promotes gastric cancer progression via miR-1294/AKT1 axis. *Open Med*. 2020; **15**(1):1028-38. PMID: 33336058 DOI: 10.1515/med-2020-0218
- Campbell KJ, Tait SW. Targeting BCL-2 regulated apoptosis in cancer. *Open Biol*. 2018; **8**(5):180002. PMID: 29769323 DOI: 10.1098/rsob.180002
- Li Y, Pan J, Gou M. The anti-proliferation, cycle arrest and apoptotic inducing activity of peperomin E on prostate cancer PC-3 cell line. *Molecules*. 2019; **24**(8):1472. PMID: 30991627 DOI: 10.3390/molecules24081472
- Li F, Aljahdali I, Ling X. Cancer therapeutics using survivin BIRC5 as a target: what can we do after over two decades of history? *J Exp Clin Cancer Res*. 2019; **38**(1):368. PMID: 31439015 DOI: 10.1186/s13046-019-1362-1
- Shang X, Liu G, Zhang Y, Tang P, Zhang H, Jiang H, et al. Downregulation of BIRC5 inhibits the migration and invasion of esophageal cancer cells by interacting with the PI3K/Akt signaling pathway. *Oncol Lett*. 2018; **16**(3):3373-9. PMID: 30127937 DOI: 10.3892/ol.2018.8986