

ارتباط ژن OCT4B1 و آپوتوزیس در رده های سلول سرطانی

محمد رضا میرزایی (PhD)*، غلامحسین حسن شاهی (PhD)^۱، محمد رضا حاجی زاده (PhD)^۱، مهدی محمودی (PhD)^۱،
محمود نظری (BSc)^۲، مهدی چهاردولی (BSc)^۲

۱-مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

۲-گروه بیوشیمی، بیوفیزیک و ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان

دریافت: ۹۲/۱۲/۱۷، اصلاح: ۹۳/۵/۱۵، پذیرش: ۹۳/۷/۲

خلاصه

سابقه و هدف: OCT4B1 یکی از واریانت های ژن OCT4 است که به میزان بالایی در رده های سلول سرطانی و نیز بافت های سرطانی بیان می شود. مطالعات اخیر نشان داده اند که این واریانت قدرت آنتی آپوتوتیکی دارد. هدف از این مطالعه بررسی تاثیر مهار این واریانت بر الگوی بیانی ژنهای خانواده آنتی آپوتوزیس در سه رده سلول سرطانی انسان می باشد.

مواد و روشها: در این مطالعه آزمایشگاهی سه رده سلول سرطانی، AGS، ۵۶۳۷ و U87MG از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و پس از کشت در دو گروه تست و کنترل با استفاده از تکنولوژی siRNA و روش لیپوفکشن به منظور مهار واریانت OCT4B1، مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. پس از تایید مهار ژنی، تخلیص RNA و سنتز cDNA انجام شد و نهایتاً بیان ژنهای مورد نظر با استفاده از پرایمرهای اختصاصی و روش Real-Time PCR، تعیین و میزان بیان هر ژن (با مقایسه گروههای تست و کنترل) تعیین گردید.

یافته ها: نتایج نشان داد الگوی تغییرات بیان ژنی در سه رده سلول سرطانی مورد مطالعه تقریباً مشابه است و ژنهای BCL2، BRAF و BFR به ترتیب با ۲۰/۸۷، ۱۸/۳۳ و ۱۵/۱۱ برابر بیشترین کاهش بیان را داشته اند. در کل بیان ۲۰ ژن از ۲۶ مورد بررسی کاهش و چهار ژن CASP2، IGF1R، TNF و MCL1 افزایش بیان جزئی یا بیان بدون تغییر داشته اند. بیان ژن CFLAR در رده سلول سرطانی U87MG، افزایش بیان اما در دو رده سلول سرطانی دیگر کاهش بیان جزئی را نشان داد.

نتیجه گیری: طبق نتایج بدست آمده احتمالاً مهار OCT4B1 با ممانعت از بیان ژنهای خانواده آنتی آپوتوزیس موجب کمک به القاء مرگ برنامه ریزی شده در رده های سلول سرطانی می شود.

واژه های کلیدی: ژن OCT4B1، خانواده ژنی آنتی آپوتوزیس، رده های سلول سرطانی.

مقدمه

که عمدتاً در سلولهای بنیادی (جنینی، بافتی و سرطانی) فعال هستند (۲). OCT4 (Octamer-binding transcription factor 4)، ژنی است متعلق به خانواده POU (فاکتورهای نسخه برداری واجد دامین اتصال به DNA) که در سلولهای بنیادی بیان شده و با فرآیند پردازش افتراقی (Alternative splicing)، حداقل سه واریانت OCT4A، OCT4B و OCT4B1 را کد می کند (۳). بیان این ژن در سلول باعث حفظ حالت نامیرایی و کاهش یا توقف بیان آن عامل تمایز سلولی (Differentiation) است (۴). در مطالعات رده های سلول سرطانی و بافتهای سرطانی واریانت جدیدی از OCT4 بنام OCT4B1 شناسایی گردید (۵). این واریانت برخلاف دو واریانت دیگر به میزان بیشتری در رده های سلول سرطانی و نیز بافت های سرطانی بیان می شود و مطالعات تکمیلی نشان دادند این واریانت قدرت سرکوبگری آپوتوزیس

در خصوص منشاء سرطان نظریه های مختلفی وجود دارد اما جدیدترین و پرطرفدارترین این نظریه ها، نظریه سلول بنیادی سرطان (Cancer stem cell) است که بر اساس آن سلول بنیادی بافتی (Adult stem cell) که تقریباً در تمامی بافتهای بدن (به نسبت یک به یکصد هزار سلول) موجود است، یا سلول سوماتیکی که به علت موتاسیونهای ژنی تبدیل به سلول تغییر یافته (Reprogrammed somatic cell) شده است، منشاء پیدایش و توسعه سرطان است (۱). بر اساس این نظریه تغییر در الگوی بیانی ژنها، عامل تبدیل آن به سلول سرطانی است. با عنایت به شباهت سلولهای بنیادی و سلولهای سرطانی، ژنهای مهم و کنترل کننده فرآیند نامیرایی (Immortalization) یا بنیادی بودن (Stemness) سلول مورد توجه قرار گرفتند. مهمترین این ژنها شامل OCT4، NANOG، SOX2، KLF4 و Nucleostemin می باشند

این مقاله طرح تحقیقاتی به شماره ۳۱/۹/۲۰۶۶ دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان می باشد.

* مسئول مقاله: دکتر محمدرضا میرزایی

آدرس: رفسنجان، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی. تلفن: ۰۳۴-۳۴۲۵۴۰۰۳

E-mail: mirzaeemr@gmail.com

کشت سلول و تعیین الگوی بیانی واریانت های OCT4:

مورد نظر از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI۱۶۴۰ حاوی ۱۰ درصد سرم گاو (FBS)، ال-گلوتامین (۲ میلی مولار) و آنتی بیوتیکهای پنی سیلین (۱۰۰u/ml) و استرپتومایسین (۱۰۰μgr/ml) در انکوباتور CO2 با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت ۵ درصد دی اکسید کربن کشت شدند. قبل از انجام ترانسفکشن، بیان واریانت های OCT4 در رده های سلولی مورد مطالعه مورد ارزیابی قرار گرفت. بدین ترتیب که بدنبال کشت سلولی و رسیدن سلولها به تراکم حدود ۷۰ درصد، سلولها از محیط کشت جدا شده و پس از شستشو با بافر فسفات (PBS)، RNA تام سلولی با استفاده از روش تخریب سلولی با تریزول و رسوب RNA با الکل (طبق بروشور کیت)، جدا گردید.

جهت حذف DNA از TURBO DNases استفاده شد و صحت RNA تخلیص شده با روشهای جذب نوری با اسپکتروفتومتر و الکتروفورز در آگارز یک درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. بلافاصله پس از استخراج RNA، با استفاده از کیت سنتز cDNA (Invitrogen)، تمامی ملکولهای mRNA به cDNA تبدیل و به فریزر -۲۰ درجه سانتی گراد منتقل شدند. بیان واریانت های OCT4 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر واریانت (جدول ۱) و روش Real-Time PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. به اختصار ۲۰۰ نانوگرم cDNA، ۲ پیکوگرم بر میکرولیتر از هر پرایمر در محلول واکنش (Master mix) سایبرگرین از شرکت پارس طوس در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه و در شرایط دمایی: یک چرخه، ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه (برای OCT4B1، ۶۱ درجه به مدت ۲۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه، واکنش انجام شد. واکنش سه بار تکرار و از بتا اکتین بعنوان کنترل داخلی استفاده شد. میزان بیان هر واریانت با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

طراحی siRNA OCT4B1 و انجام ترانسفکشن: جهت مهار واریانت

OCT4B1، دو siRNA اختصاصی علیه واریانت OCT4B1 (اگزون 2b) طراحی شد. همچنین به عنوان کنترل یک siRNA غیراختصاصی (scramble siRNA) که هیچ ترادف مشابهی در ژنوم انسان ندارد نیز طراحی گردید (جدول ۲). جهت طراحی siRNAها از برنامه طراحی siRNA موجود در سایت <http://jura.wi.mit.edu/> استفاده و توالیهای مورد نظر توسط شرکت تکاپوزیست (نماینده MWG آلمان) ساخته شد(۶).

(Anti-apoptosis) دارد (۶و۷). مراحل تبدیل یک سلول نرمال به سلول سرطانی که توانایی ایجاد یک بافت سرطانی را داشته باشد نیازمند تغییرات متعدد سلولی و ملکولی است که فرار از رخداد آپوپتوزیس حاصل این تغییرات است، لذا سرکوب فرآیند آپوپتوزیس پدیده ایست که در اکثر سرطانها مشاهده می شود (۸). مکانیسم آپوپتوزیس بسیار پیچیده و گیج کننده است که شامل فرآیندهای آبشاری با مصرف انرژی است که نهایتا با فعال شدن پروتئینهای کاسپاز و شکل گیری مجموعه آپوپتوزوم، مقدمه مرگ برنامه ریزی شده سلول فراهم می شود. امروزه محققین دو مسیر عمده آپوپتوزیس را تشریح کرده اند: مسیر خارج سلولی (Extrinsic) یا مسیر رسپورهای مرگ سلولی و مسیر داخل سلولی (Intrinsic) که به مسیر وابسته به میتوکندری نیز مشهور است. به هر حال، شواهدی وجود دارد که این دو مسیر به هم پیوسته اند و ملکول تاثیرگذار یک مسیر میتواند بر مسیر دوم هم موثر باشد (۹).

ژنهای موثر در مسیر آپوپتوزیس در دوازده خانواده ژنی شامل: NF Bcl-2، TNF receptor family، ligand family، TRAF family، IAP family، Caspase family، family Death effector، family Domain Death، CARD family، P53 and DNA damage، CIDE domain family، family response family و Anti-apoptosis gene family گروه بندی می شوند (۹-۱۴) و خانواده ژنی آنتی آپوپتوزیس شاید مهمترین این خانواده های ژنی باشد. با توجه به اینکه مطالعات متعدد نشان داده اند OCT4B1 در رده های سلول سرطانی و بافت های سرطانی نسبت به دیگر واریانت های OCT4 بیشتر بیان می شود و این سلولها به عللی که ناشناخته است قدرت نامیرایی پیدا کرده و از ورود به آپوپتوزیس فرار می کنند، هدف از این مطالعه، بررسی نقش واریانت OCT4B1 بر الگوی بیانی ژنهای مهم خانواده آنتی آپوپتوزیس می باشد. بدین منظور ابتدا با کمک تکنولوژی siRNA بیان این واریانت در سه رده سلولی سرطانی (AGS، U87MG و ۵۶۳۷) مهار گردید و سپس اثر مهار این واریانت بر بیان ۲۶ ژن خانواده آنتی آپوپتوزیس مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این مطالعه آزمایشگاهی سه رده سلول سرطانی شامل AGS (آدنوکارسینوم معده)، ۵۶۳۷ (تومور مثانه) و U87MG (تومور مغز) به عنوان نماینده رده های سلول سرطانی مورد بررسی قرار گرفتند.

جدول ۱. توالی پرایمرهای واریانت های ژن OCT4 و ژن بتا اکتین

Gene Symbol	Gene bank number	Designed Oligo	Relative Sequence	Fragment length
OCT4A	NM-002701	F	CGCAAGCCCTCATTTAC	111
		R	CATCACCTCCACCACCTG	
OCT4B	NM-203289	F	CAGGGAATGGGTGAATGAC	177
		R	AGGCAGAAGACTTGTAAGAAC	
OCT4B1	EU518650	F	GGTTCTATTTGGTGGGTTC	128
		R	TTCTCCCTCTCCCTACTCCTC	
β-actin	NM-001101	F	AGGCACCAGGCGTGAT	184
		R	GCCCACATAGGAATCCTTCTGAC	

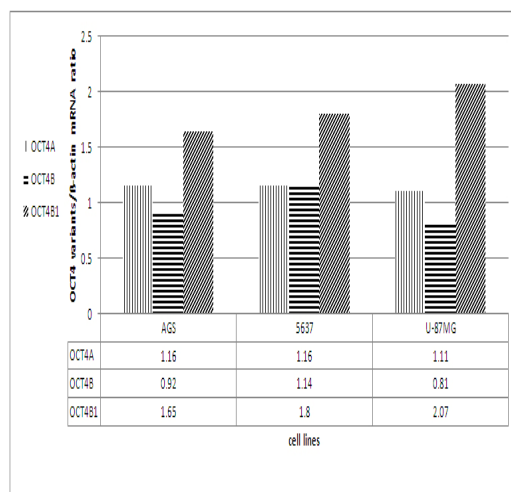
جدول ۲. توانایی و مشخصات siRNAهای استفاده شده جهت مهار واریانت OCT4B1 و siRNA استفاده شده در گروه کنترل (scramble siRNA)

siRNA name	Target	Sequences
Version I	Target	AAGGAGTATCCCTGAACCTAG
	Sense	(GGAGUAUCCUGAACCUGA)dTdT
	Anti-sense	(CUAGGUUCAGGGAUACUCC)dTdT
Version II	Target	AAGAGGTGGTAAGCTTGGATC
	Sense	(CAGUGGUAAGCUUGGAUC)dTdT
	Anti-sense	(AAUCCAAGCUUACCACCUC)dTdT
Scramble	Sense	GCGGAGAGGCUUAGGUGUAdTdT
	Anti-sense	UACACCUAAGCCUCUCCGCdTdT

SPSS18 و همچنین آزمون واریانس اندازه گیریهای مکرر دوطرفه (-tow way repeated measures ANOVA) و تست دانکن انجام شد و $p \leq 0.05$ معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

نتایج نشان داد قبل از انجام ترانسفکشن سلولی، هر سه واریانت OCT4 (OCT4A, OCT4B, OCT4B1) در رده های سلولی مورد مطالعه بیان می شوند و تقریباً در هر سه رده سلولی بیان OCT4B1 بیشتر از بیان دو واریانت دیگر بود (نمودار ۱). به منظور مهار بیان OCT4B1 از دو نوع siRNA که بر اساس سکانس اختصاصی این واریانت (اگزون 2b) طراحی و سنتز شده بود استفاده شد و نتایج نشان داد هر دو siRNA طراحی شده باعث مهار بیان این واریانت می شوند اما میزان کارایی Version II کمی بیشتر از Version I بود لذا در ادامه این پروژه جهت مهار OCT4B1 از Version II siRNA استفاده گردید. بیشترین کاهش بیان این واریانت مربوط به زمان ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن می باشد (نمودار ۲).



نمودار ۱. میزان بیان سه واریانت OCT4 در سه رده سلولی مورد مطالعه

برای انجام ترانسفکشن، رده های سلولی مورد نظر در دو گروه تست و کنترل و در شرایط یکسان با تراکم 10^5 سلول بر میلی لیتر در فلاسک های کشت ۲۵ میلی لیتری کشت شده و پس از رسیدن به تراکم ۵۰-۳۰ درصد، مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. بطور خلاصه ۵ میکرولیتر siRNA (۲۵ میکرومولار) و ۴/۵ میکرولیتر محلول RNAi-MAX در ۲۵۰ میکرولیتر محیط کشت Opti-MEM رقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. سپس ترکیب تهیه شده به فلاسکهای کشت سلول با حجم نهایی ۲/۵ میلی لیتر اضافه شده و فلاسکها به مدت ۷۲ ساعت در انکوباتور قرار گرفتند.

به منظور تعیین مهار ژنی در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت سلولهای دو گروه مورد ارزیابی قرار گرفتند به گونه ای که RNA کلی سلولها جدا و cDNA مربوطه سنتز گردید. سپس با انجام Real-Time PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی، میزان بیان OCT4B1 در دو گروه تست و کنترل مورد ارزیابی قرار گرفت.

بررسی میزان رخداد آپوپتوزیس در سلولهای ترانسفرم شده: میزان رخداد آپوپتوزیس در رده های سلولی مورد مطالعه با استفاده از کیت Annexin-v-FLOUS بررسی شد. بطور خلاصه ۴۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت واجد سلولهای مورد نظر (گروه تست و کنترل)، به تیوب اپندرف منتقل و پس از سانتریفوژ، رسوب سلولی در Binding Buffer حل گردید. پس از ۵ دقیقه یک میکرولیتر رنگ annexin و یک میکرولیتر رنگ پروپیدیم آیویدید (PI) به هر تیوب اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و نهایتاً میزان سلولهای در حال آپوپتوزیس با دستگاه فلوئوسیتومتری (Beckman-Coulter) مورد آنالیز قرار گرفت. درصد سلولهای FITC/PI مثبت، بعنوان سلولهای آپوپتوتیک محاسبه گردیدند.

تعیین بیان ژنهای خانواده ضد آپوپتوزی: ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن، RNA کلی سلولهای گروههای تست و کنترل مربوط به سه رده سلولی مورد مطالعه، تخلیص و cDNA مربوطه سنتز گردید. با دستگاه Real-Time PCR و استفاده از پرایمرهای اختصاصی (جدول ۱)، بیان ژنهای مورد مطالعه در گروههای ذکر شده تعیین گردیدند.

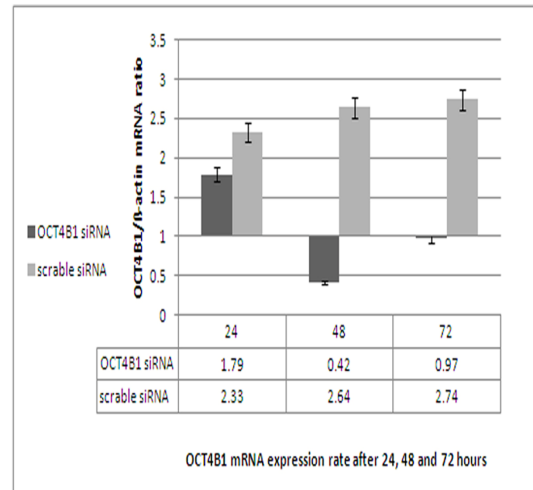
آنالیزهای بیان ژنی با کمک نرم افزار دستگاه Real-Time PCR (CFX96 manager software Bio-Rad, USA)، Excel

بررسی وضعیت آپوپتوزیس در رده های سلولی مورد مطالعه: نتایج آنالیز

فلوسایتومتری رده های سلولی مورد مطالعه نشان داد، ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن سلولی تقریباً ۳۰ درصد سلولهای گروه تست (ترانسفکشن شده با OCT4B1 siRNA) در مقایسه با گروه کنترل (ترانسفکشن شده با scramble siRNA)، وارد آپوپتوزیس شده اند.

نتایج بیان ژنی خانواده آنتی آپوپتوزیس: الگوی تغییرات بیان ژنی هر سه

رده سلولی مورد مطالعه تقریباً یکسان بود به گونه ای که در هر سه رده سلولی، ۲۰ ژن کاهش و ۴ ژن افزایش بیان بیش از دو برابر را نشان دادند و تنها دو ژن BIRC4 (XIAP) و CFLAR تغییر بیان معنی داری نداشتند. تنها ژنی که الگوی متفاوت بیانی با توجه به رده های سلولی از خود نشان داد ژن CFLAR بود که در رده سلولی U87MG افزایش بیان جزئی (۱/۰۷ برابر) و در دو رده سلولی دیگر (AGS و ۵۶۳۷) کاهش بیان جزئی (به ترتیب ۱/۲۳ و ۱/۲ برابر) از خود نشان داد. از بین ژنهایی که کاهش بیان داشتند هفت ژن BCL2، BFAR، BIRC2، BIRC6، BIRC8، BNIP2 و BRAF کاهش بیان بیش از ۵ تا حداکثر ۲۰/۸۷ برابر در هر سه رده سلولی داشتند (جدول ۳).



نمودار ۲. تغییر در بیان واریانت OCT4B1، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از انجام ترانسفکشن سلولی در رده سلولی AGS

جدول ۳. مشخصات و میزان بیان ژنهای خانواده آنتی آپوپتوزیس (Anti-Apoptosis) به دنبال

مهار واریانت OCT4B1 در سه رده سلولی مورد مطالعه

Symbols	Description of genes	Cell Line/ Fold changes		
		AGS	5637	U87MG
AKT1	V-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1	-3.16	-1.35	-1.42
BAG1	BCL2-associated athanogene	-4.26	-3.89	-3.27
BAG3	BCL2-associated athanogene 3	-4.96	-3.89	-8.16
BCL2	B-cell CLL/lymphoma 2	-20.87	-13.01	-20.26
BCL2A1	BCL2-related protein A1	-4.43	-2.54	-5.01
BCL2L1	BCL2-like 1	-4.78	-3.17	-1.84
BCL2L10	BCL2-like 10 (apoptosis facilitator)	-2.32	-2.22	-3.46
BCL2L2	BCL2-like 2	-4.91	-3.95	-4.17
BFAR	Bifunctional apoptosis regulator	-15.11	-10.02	-12.86
NAIP	NLR family, apoptosis inhibitory protein	-5.58	-2.81	-3.55
BIRC2	Baculoviral IAP repeat containing 2	-8.88	-5.13	-6.22
BIRC3	Baculoviral IAP repeat containing 3	-5.8	-9.81	-3.42
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis	1.37	1.62	1.65
BIRC6	Baculoviral IAP repeat containing 6	-7.04	-5.87	-8.35
BIRC8	Baculoviral IAP repeat containing 8	-6.76	-5.3	-7.91
BNIP1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	-5.86	-8.28	-3.55
BNIP2	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 2	-5.52	-10.35	-8
BNIP3	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3	-6.39	-4.3	-4.24
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1	-18.33	-10.73	-12.23
CASP2	Caspase 2, apoptosis-related cysteine peptidase	5.28	3.3	3.51
CFLAR	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	-1.23	-1.2	1.07
FAS	Fas (TNF receptor superfamily, member 6)	-2.61	-2.19	-1.29
IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor	3.14	1.88	7.3
MCL1	Myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	1.47	2.77	5.55
TNF	Tumor necrosis factor	6.03	8.37	3.38
CD27	CD27 molecule	-11.74	-3.63	-4.29

بحث و نتیجه گیری

نتایج این تحقیق نشان داد مهار واریانت OCT4B1 در رده های سلولی مورد مطالعه باعث کاهش معنی دار بیان ژنهای اصلی خانواده آنتی آپوپتوزیس می شود. نتایج تغییرات بیان ژنی در سه رده سلولی مورد مطالعه تقریباً مشابه است، ۲۰ ژن از ۲۶ ژن مورد مطالعه کاهش بیان نشان می دهند که از این تعداد ۱۴ ژن، شامل: BAG3, BCL2, BCL2A1, BFAR, NAIP, BIRC2, BIRC3, BIRC6, BIRC8, BNIP1, BNIP2, BNIP3, BRAF, CD27 و حداقل در یکی از سه رده سلولی مورد مطالعه، کاهش بیان بیش از ۵ برابر داشته اند. این ژنها به عنوان کنترل کننده منفی مسیر آپوپتوزیس شناخته میشوند و افزایش بیان آنها عامل مهار آپوپتوزیس است (۱۷-۱۵ و ۷).

خانواده پروتئینی BCL2 یکی از مهمترین دستجات ژنی است که در آپوپتوزیس نقش دارند. این پروتئینها که تاکنون بیش از ۲۰ نوع مختلف آن شناسایی و معرفی شده است، یک وجه اشتراک دارند و آن داشتن دامین BH (BCL2 homology domain) است (۱۵). ژن BCL2، عامل اصلی در فعال سازی مسیر داخلی (Intrinsic) آپوپتوزیس است که این عمل را با القاء رهاسازی سیتوکروم C از غشاء خارجی میتوکندری انجام می دهد. مطالعات متعدد نشان داده اند در رده های سلول سرطانی و بافت های سرطانی میزان بیان پروتئینهای خانواده BCL2 افزایش می یابد و شاید به همین دلیل است که سلول وارد مسیر آپوپتوزیس نمی شود.

اما همانگونه که نتایج این تحقیق نشان می دهد، میزان بیان ژنهای مرتبط به BCL2 شامل: BCL2, BCL2A1, BCL2L1, BCL2L10 و BCL2L2 بین ۱/۸۴ (BCL2L1) تا ۲۰/۸۷ (BCL2) برابر کاهش بیان را نشان دادند و این نشان دهنده قدرت آنتی آپوپتوتیکی این واریانت است. عبارتی یکی از ژنهای هدف و تاثیرگذار بر بیان ژنهای خانواده BCL2، واریانت OCT4B1 است که در سلولهای سرطانی به میزان بیشتری بیان شده پیامد آن افزایش بیان ژنهای خانواده BCL2 و کاهش احتمال آپوپتوزیس است. پروتئینهای خانواده BAG (BAG3, BCL2-associated), بعنوان پروتئینهای Co-chaperon شناخته می شوند که تشابه زیادی به پروتئینهای شوک حرارتی ۷۰ (HSP۷۰) دارند (۱۸). Wang و همکاران نشان دادند این پروتئینها در انواعی از رده های سلول سرطانی و نیز بافتهای سرطانی بیان می - شوند و قدرت آنتی آپوپتوتیکی دارند (۱۹).

در این مطالعه بیان دو ژن متعلق به این گروه (BAG1 و BAG3) در رده های سلولی مورد مطالعه بررسی و مشخص گردید بیان هر دوی این ژنها در هر سه رده سلول سرطانی بررسی شده، کاهش بیان قابل توجه را نشان می دهد. Chua و همکاران نشان دادند افزایش بیان BFAR (bifunctional apoptosis regulator)، قدرت آنتی آپوپتوتیکی دارد. این پروتئین جزو پروتئینهای شبکه اندوپلاسمی است که در هر دو مسیر داخلی (intrinsic) و خارجی (extrinsic) آپوپتوزیس نقش دارد (۲۰). در مطالعه حاضر بیان این ژن بدنبال مهار واریانت OCT4B1 کاهش بیان بیش از ۱۰ برابری را در هر سه رده سلولهای سرطانی مورد مطالعه نشان داد. BIRCs (baculoviral IAP repeat contining) گروهی مهم از پروتئینهای مهارکننده آپوپتوزیس (IAP) می باشند که وجه اشتراک آنها داشتن دامین حفاظت شده با کولوویروسی است (apoptosis repeate baculoviral inhibitor of) و از طریق

این دامین به پروتئینهای هدف (کاسپازها) متصل و با مهار آنها در واقع آپوپتوزیس را مهار می کنند (۲۱). NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein) پروتئینی است از همین گروه که بنام BIRC1 نیز نامیده می شود، این پروتئین با مهار کاسپازهای ۳، ۷ و ۹ مانع انجام آپوپتوزیس می شود (۲۲). Wathiyati و همکاران نشان دادند حذف این ژن همراهی معنی داری با بیماری آتروفی مغزی عضلانی (spinal muscular atrophy) دارد. این بیماری یک اختلال توارثی اتوایمیون با نقص در انجام صحیح آپوپتوزیس است (۲۳). NAIP بیشتر در سلولهای عصبی بیان می شود اما اخیراً مشخص شده است این پروتئین در بافتهای دیگر بدن، رده های سلول سرطانی و بافتهای سرطانی نیز بیان می شود (۲۴).

ژنهای BIRC مطالعه شده در این تحقیق شامل BIRC1 (NAIP)، BIRC2, BIRC3, BIRC4, BIRC6 و BIRC8 بوده اند که بجز BIRC4 (X-linked inhibitor of apoptosis)، که بیانی تقریباً مشابه گروه کنترل داشته است، دیگر ژنهای این گروه کاهش بیان (down-regulation) تا ۱۰ برابر را نشان دادند. سه ژن مطالعه شده از گروه BNIPs شامل BNIP1, BNIP2 و BNIP3 که گروه جدیدی از پروتئینهای مشابه BCL2 هستند، BRAF (V-raf murine sarcoma viral oncogene homologue) و CD۲۷ نیز به دنبال مهار OCT4B1، کاهش بیان نشان دادند. همان گونه که ذکر شد، چهار ژن از ۲۶ ژن مورد مطالعه (TNF, MCL1, IGF1R, CASP2)، برخلاف انتظار، افزایش بیان (up-regulation) نشان دادند. این می تواند بعلاوه روابط پیچیده و اکثراً ناشناخته این ژنها بر یکدیگر و بر مسیر سلولی آپوپتوزیس باشد یا می تواند به تفاوت عملکرد این ژنها در سلولهای مختلف مربوط باشد که نیازمند انجام تحقیقات تکمیلی روی رده های مختلف سلول های سرطانی و بافت های سرطانی و نیز آنالیز بیان ژنی دیگر خانواده های ژنی درگیر در این مسیر سلولی است. الگوی بیانی ژنهای فوق موبد آن است که OCT4B1 یک عامل مهم آنتی آپوپتوتیک است. به عبارتی مهار این واریانت باعث کاهش بیان ژنهای آنتی آپوپتوزیس می شود که اکثراً مهارگر آپوپتوزیس می باشند. لذا در رده های سلول سرطانی و سلولهای بافت های سرطانی که OCT4B1 با میزان بالایی نسبت به دیگر واریانت های OCT4 بیان می شود، بیان ژنهای مورد اشاره (ژنهای خانواده آنتی آپوپتوزیس)، افزایش می یابد و این افزایش بیان، باعث مهار آپوپتوزیس می شود. به هر حال چنین می توان نتیجه گیری کرد که واریانت OCT4B1 می تواند بعنوان یک عامل مهم در کمک به سلول در جهت فرار از مرگ برنامه ریزی شده به حساب آید و لذا این نکته می تواند در مطالعات آینده پیرامون شناخت مکانیسم ایجاد و توسعه سرطان و حتی طراحی متدهای ملکولی درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله از مدیریت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان که حمایت مالی این پروژه را بعهده داشت و کلیه همکاران مرکز تحقیقاتی پزشکی ملکولی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان تقدیر و تشکر می گردد.

The Correlation between OCT4B1 and Apoptosis in Human Cancer Cell Lines

M.R. Mirzaei (PhD)^{*1}, G.H. Hasanshahi (PhD)¹, M.R. Hajizadeh (PhD)¹, M. Mahmoodi (PhD)¹,
M. Nazari (BSc)², M. Chahardoli (BSc)²

1. Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R.Iran

2. Department of Biochemistry, Biophysics, and Genetics, Faculty of Medicine, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R.Iran.

J Babol Univ Med Sci; 17(1); Jan 2015; PP:37-44

Received: Mar 8th 2014, Revised: Aug 6th 2014, Accepted: Sep 24th 2014.

ABSTRACT

BACKGROUND AND OBJECTIVE: OCT4B1, as one of the variants of OCT4 gene, is expressed at higher levels in cancer tissues and cancer cell lines, compared to other OCT4 variants. Recent studies have revealed the anti-apoptotic role of OCT4B1. The aim of this study was to evaluate the effect of OCT4B1 suppression on the expression profile of anti-apoptotic genes in three human tumor cell lines.

METHODS: In this in-vitro study, three human tumor cell lines including AGS (stomach adenocarcinoma), 5637 (bladder cancer), and U87MG (brain tumor) were purchased from the National Cell Bank of Iran (Pasteur Institute) and cultured in test and control groups. In order to suppress OCT4B1 expression, the cultures were transfected, using siRNA technology and lipofection method. After confirming the suppression process, total RNA was extracted and cDNA was synthesized. Finally, the expression rates of anti-apoptotic genes were determined, using specific primers and real-time PCR technique.

FINDINGS: Our data revealed an almost similar pattern of alteration in the expression profile of anti-apoptotic genes in all three cell lines. Also, BCL2, BRAF, and BCL6 genes exhibited the most significant down-regulation by 20.87, 18.33, and 15.11 folds, respectively. The expression of at least 20 genes (out of 26 genes) decreased, while the expression rates of CASP2, IGF1R, TNF, and MCL1 were up-regulated or remained unchanged. Also, the expression of CFLAR gene was up-regulated in U87MG and down-regulated in other cell lines (5637 and AGS).

CONCLUSION: Based on our findings, OCT4B1 suppression by blocking the expression of anti-apoptotic genes may result in the induction of apoptosis in cancer cell lines.

KEY WORDS: Anti-apoptotic Gene Family, Cancer Cell Lines, OCT4B1.

Please cite this article as follows:

Mirzaei MR, Hasanshahi GH, Hajizadeh MR, Mahmoodi M, Nazari M, Chahardoli M. The Correlation between OCT4B1 and Apoptosis in Human Cancer Cell Lines. J Babol Univ Med Sci. 2015;17(1):37-44.

* Corresponding Author; M.R. Mirzaei (PhD)

Address: Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, I.R.Iran.

Tel: +98 23 915234003-5

E-mail: mirzaeemr@gmail.com

References

1. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006;66(4):1883-90.
2. Sotomayor P, Godoy A, Smith GJ, Huss WJ. Oct4A is expressed by a subpopulation of prostate neuroendocrine cells. *Prostate.* 2009;69(4):401-10.
3. Tai MH, Chang CC, Kiupel M, Webster JD, Olson LK, Trosko JE. Oct4 expression in adult human stem cells: evidence in support of the stem cell theory of carcinogenesis. *Carcinogenesis.* 2005;26(2):495-502.
4. Papamichos SI, Kotoula V, Tarlatzis BC, Agorastos T, Papazisis K, Lambropoulos AF. OCT4B1 isoform: the novel OCT4 alternative spliced variant as a putative marker of stemness. *Mol Hum Reprod.* 2009;15(5):269-70.
5. 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.
6. Asadi MH, Mowla SJ, Fathi F, Aleyasin A, Asadzadeh J, Atlasi Y. OCT4B1, a novel spliced variant of OCT4, is highly expressed in gastric cancer and acts as an antiapoptotic factor. *Int J Cancer.* 2011;128(11):2645-52.
7. Asadzadeh J, Asadi MH, Shakhssalim N, Rafiee MR, Kalhor HR, Tavallaei M, et al. A plausible anti-apoptotic role of up-regulated OCT4B1 in bladder tumors. *Urol J.* 2012;9(3):574-80.
8. Gao Y, Wang X, Han J, Xiao Z, Chen B, Su G, et al. The novel OCT4 spliced variant OCT4B1 can generate three protein isoforms by alternative splicing into OCT4B. *J Genet Genomics.* 2010;37(7):461-5.
9. Brown JM, Attardi LD. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. *Nat Rev Cancer.* 2005;5(3):231-7.
10. Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. *Biotechnology(NY).* 1994;12(5):487-93.
11. Crnkovic-Mertens I, Hoppe-Seyler F, Butz K. Induction of apoptosis in tumor cells by siRNA-mediated silencing of the livin/ML-IAP/KIAP gene. *Oncogene.* 2003;22(51):8330-6.
12. Fairbairn LJ, Cowling GJ, Reipert BM, Dexter TM. Suppression of apoptosis allows differentiation and development of a multipotent hemopoietic cell line in the absence of added growth factors. *Cell.* 1993;74(5):823-32.
13. Fridman JS, Lowe SW. Control of apoptosis by p53. *Oncogene.* 2003;22(56):9030-40.
14. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer.* 2002;2(4):277-88.
15. Thomadaki H, Scorilas A. BCL2 family of apoptosis-related genes: functions and clinical implications in cancer. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2006;43(1):1-67.
16. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science.* 1998;281(5381):1322-6.
17. Cai J, Weiss ML, Rao MS. In search of "stemness". *Exp Hematol.* 2004;32(7):585-98.
18. Chen Y, Yang LN, Cheng L, Tu S, Guo SJ, Le HY, et al. Bcl2-associated athanogene 3 interactome analysis reveals a new role in modulating proteasome activity. *Mol Cell Proteomics.* 2013;12(10):2804-19.
19. Wang HG, Takayama S, Rapp UR, Reed JC. Bcl-2 interacting protein, BAG-1, binds to and activates the kinase Raf-1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(14):7063-8.
20. Chua CC, Gao J, Ho YS, Xu X, Kuo IC, Chua KY, et al. Over-expression of a modified bifunctional apoptosis regulator protects against cardiac injury and doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. *Cardiovascular Res.* 2009;81(1):20-7.
21. Glodkowska-Mrowka E, Solarska I, Mrowka P, Bajorek K, Niesiobedzka-Krezel J, Seferynska I, et al. Differential expression of BIRC family genes in chronic myeloid leukaemia--BIRC3 and BIRC8 as potential new candidates to identify disease progression. *Br J Haematol.* 2014;164(5):740-2.
22. Mazrouei S, Ziaei A, Tanhaee AP, Keyhanian K, Esmaeili M, Baradaran A, et al. Apoptosis inhibition or inflammation: the role of NAIP protein expression in Hodgkin and non-Hodgkin lymphomas compared to non-neoplastic lymph node. *J Inflamm(Lond).* 2012;9(1):4.

23. Watihayati MS, Fatemeh H, Marini M, Atif AB, Zahiruddin WM, Sasongko TH, et al. Combination of SMN2 copy number and NAIP deletion predicts disease severity in spinal muscular atrophy. *Brain Dev.* 2009;31(1):42-5.
24. McEleny KR, Watson RW, Coffey RN, O'Neill AJ, Fitzpatrick JM. Inhibitors of apoptosis proteins in prostate cancer cell lines. *Prostate.* 2002;51(2):133-40.