فصلنامه (علمی – پژوهشی)

زیست شناسی تکوینی

سال سیزدهم، شماره ۱، زمستان ۱۳۹۹ ص. ۴۲-۲۹

مقاله پژوهشی

بررسی تغییرات بیان LncRNA RMRP و موتاسیون‌های ناحیه پروموتری ژن RMRP در بیماران مبتلا به سرطان سینه

زهره اکبری[۱]، ملیحه انتظاری[۲،۱]، مجید صادقی زاده[۳*]

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

[۲] مرکز تحقیقات علوم همگرای پزشکی فرهیختگان، بیمارستان فرهیختگان، دانشگاه آزاد اسلامی علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

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

*Email: sadeghma@modares.ac.ir

تاریخ دریافت: تیر ۱۳۹۸ تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۹

چکیده

تنظیم کننده‌های بیان ژن و جهش توموری، ازمارکرهای پیش آگهی دهنده وتشخیصی برای سرطان می‌باشند. RNAهای بلند غیرکد کننده (lncRNAs)، درفرآیندهای تنظیمی متعدد نقش دارند. RMRP یک lncRNA می‌باشد که نقش تنظیمی آن دربرخی ازسرطان‌ها مشخص شده است. با توجه به اهمیت RMRP، به بررسی تغییرات بیان آن که به دنبال موتاسیون‌های ناحیه پروموتردربیماران مبتلا به سرطان سینه ایجاد می‌شود، پرداخته شد. دراین پژوهش بیان LncRNA RMRP با استفاده از تکنیک نیمه کمی RT-PCR، برروی ۲۵ نمونه توموری و ۲۵ نمونه کنترل حاشیه تومور ارزیابی شد و توسط تکنیک Real time PCR برای تعدادی از نمونه‌ها تایید گردید. همچنین برای بررسی وجود جهش در ناحیه پروموتری ژنLncRNA RMRP ، استخراج DNA و تعیین سکانس صورت گرفت. بیان RMRP در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های کنترل، افزایش بیان معناداری نشان داد. RMRP در نمونه‌های HER2 مثبت نسبت به نمونه‌های HER2 منفی کاهش بیان و در نمونه‌های توموری متاستاز مثبت نسبت به نمونه‌های متاستاز منفی افزایش بیان معناداری را نشان داد. توالی پروموتری ژن RMRP نمونه توموری هیچ جهشی وجود نداشت. RMRP می‌تواند به عنوان تومور مارکر و متاستاز مارکری برای شناسایی گروه‌های مختلف سرطان سینه پیشنهاد گردد. اما همچنان به بررسی‌های بالینی و مولکولی بیشتری برای اثبات دقیق تر آن نیاز می باشد.

کلیدواژه‌ها: سرطان سینه بیان LncRNA RMRP، پروموتر ژن RMRP، جهش.

مقدمه

سرطان یک مشکل عمده سلامت عمومی در سراسر جهان است [۱۵]. بارجهانی سرطان به علت پیری ورشد جمعیت جهان همراه با افزایش رفتارهای ایجاد کننده سرطان، همچنان رو به افزایش است [۷]. سرطان سینه با بروز یک میلیون مورد جدید درسال درجهان، ازرایج ترین بدخیمی‌ها درزنان است. و ۱۸% ازکل سرطان های زنانه را تشکیل می‌دهد. به‌طور کلی میزان بروز سرطان سینه در کشورهای توسعه یافته بیشتراست. این در حالی است که بیشترین میزان مرگ و میرناشی از این سرطان، در کشورهای در حال توسعه وجود دارد [۱۰].

همانطورکه سرطان سینه یکی ازمهم‌ترین مشکلات بهداشت عمومی برای زنان در سراسر جهان می‌باشد، در ایران نیز هر ساله بیش از ۵۰۲۰۰۰ نفر از زنان به دلیل ابتلا به این سرطان، زندگی خود را از دست می‌دهند [۱۷].

تنظیم کننده‌های بیان ژن به‌عنوان بیومارکر و اهداف درمانی جدید برای بیماری‌های انسانی از جمله سرطان مطرح هستند. با توجه به اینکه مارکرهای فعلی سرطان سینه به‌میزان محدودی می‌توانند پیشرفت بیماری و پاسخ به درمان را پیش‌بینی کنند، توانایی ncRNAs تنظیم کننده را برای پیش‌بینی سرطان سینه مورد بررسی قرارمی‌دهند [۱۷].

RNA های بلند غیرکد کننده (Long non-coding RNAs ; LncRNAs، ncRNAs) هستند که طول آن‌ها بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید می‌باشد و در فرآیندهای تنظیمی متعدد از جمله تنظیم بیان ژن نقش دارند (۱۳). با این حال مکانیسم‌های بسیاری از LncRNA ها درسرطان‌ها تا حد زیادی ناشناخته است. استفاده از LncRNA ها به عنوان بیومارکرهای سرطان سینه هم هنوز به طور دقیق مشخص نشده است [۷،۱۳].

جهش توموری، یک مارکرپیش آگهی دهنده و تشخیصی برای بسیاری ازسرطان‌ها می‌باشد [۴]. تجزیه و تحلیل جهش‌های سرطانی موجود درسرتاسر ژنوم، چشم‌انداز گسترده‌ای از جهش‌های عملکردی را در داخل ژنوم نواحی غیرکد کننده نشان می‌دهد. که اثرات زیادی بربیان lncRNAs می‌گذارد. امروزه می‌دانیم که lncRNAs ازطریق میانکنش با سایرماکرومولکول‌های سلولی ازجمله DNA، پروتئین و RNA، نقش مهمی در ایجاد سرطان ایفا می‌کنند [۱].

RMRP (RNA component of Mitochondrial RNA Processing endoribonuclease) یک LncRNA می‌باشد که توسط DNAی هسته‌ای کد گذاری می‌شود و نقش مهمی در همانندسازی DNAی میتوکندریایی و پردازش RNA دارد [۶].

ژن RMRP برروی کروموزوم شماره‌ی ۹ قراردارد. طول آن ۲۶۸ نوکلئوتید و موقعیت ژنومی آن به صورت chr9:35,657,751-35,658,018 می‌باشد [۲]. از نظر سیتوژنتیکی در جایگاه 9p13.3 قراردارد [۳].

این LncRNA برای اولین بار در بیماری Cartilage-Hair Hypoplasia (CHH) کشف شد. جهش‌های RMRP که منجربه کاهش سطوح RMRP می‌گردد، دراین بیماری یافت می‌شود [۱۲].

ژن RMRP، جزء RNAی اندوریبونوکلئاز پردازش کننده ی RNAی میتوکندریایی را کد می‌کند، که RNAی میتوکندریایی را دریک محل اولیه ازهمانندسازی DNAی میتوکندریایی، جدا می‌کند. در هستک نیز در آخرین مرحله از پردازش 5.8S rRNA ، وارد عمل می‌شود. همچنین این RNA با زیر واحد کاتالیتیک telomerase reverse transcriptase برای ساختن یک کمپلکس ریبونوکلئو پروتئینی که فعالیت RNA پلی مرازی وابسته به RNA دارد و RNAهای دو رشته‌ای ایجاد می‌کند، درتعامل است. که می‌تواند به عنوان RNAی مداخله گرکوچکی عمل کند [۱۴،۵،۸].

در سال ۲۰۱۷ توسط Salvador و همکاران به بررسی نقش چندین LncRNA در بیماران مبتلا به سرطان پیشرفته سینه پرداخته شد. مشخص شد که بیان LncRNA GAS5 و LncRNA ZFAS1 رسرطان‌های پیشرفته لومینال، Her2 مثبت و سه گانه منفی، نسبت به افراد سالم، کاهش یافته است. در حالی که LncRNA RMRP در گروه های سرطان پیشرفته لومینال و Her2 مثبت افزایش بیان دارد [۱۳].

طبق مطالعاتی که درسال ۲۰۱۷ ، توسط Rheinbay و همکاران روی ۳۶۰ نمونه بالینی بیماران مبتلا به سرطان اولیه سینه انجام گرفت، پروموترهای جهش یافته ی قابل توجه و مهمی شناسایی شدند. درنتیجه‌ی این تحقیقات ، سیگنال های مشخصی در پروموترهای سه ژن FOXA1، RMRP، NEAT1 پیدا شد. آن‌ها مشاهده کردند RMRP و NEAT1 ، دو ژن ncRNA ، موتاسیون‌هایی را حمل می‌کنند که اتصال پروتئین به پروموترشان و تغییرات سطح بیان را تحت تاثیر قرار می‌دهد. در نتیجه مطالعات آن‌ها نشان داد که مناطق پروموتری، جایگاه موتاسیون‌های عود کننده با اثرات عملکردی درسرطان هستند. این جهش‌ها با فرکانس‌های مشابه نواحی کد گذار رخ می‌دهد [۱۱].

با توجه به اهمیت LncRNA RMRP، دراین مطالعه به بررسی تغییرات بیان آن، که به دنبال موتاسیون‌های ناحیه پروموتری ژن RMRP، دربیماران ایرانی مبتلا به سرطان سینه ایجاد می شود، پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۲۵ نمونه پارافینه جراحی پستان که گزارش جراحی آن‌ها سرطان پستان را تایید کرده بود، به عنوان جامعه مورد مطالعه و ۲۵ نمونه پارافینه از بافت نرمال مجاور انتخاب گردید. در نتیجه در این مطالعه در مجموع ۲۵ نمونه توموری و ۲۵ نمونه کنترل از بیماران مبتلا به سرطان پستان مراجعه کننده به بیمارستان امام خمینی که تحت شیمی درمانی قرار نگرفته بودند، مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات بالینی بیماران مبتلا که تحت عمل جراحی قرار گرفتند از پرونده بیماران ثبت گردید. نمونه‌های مورد مطالعه به تفکیک میانگین سن، سابقه خانوادگی، وضعیت PR، ER، Her2 و P53، مرحله بیماری و متاستاز طبقه‌بندی شدند.

به‌طورکلی در این مطالعه، به بررسی تغییرات بیان LncRNA RMRP در میان گروه‌های توموری وکنترل پرداخته شده است. به طوری‌که پس از انتخاب بیماران براساس معیار ورود افراد به مطالعه، استخراج RNA از نمونه‌های پارافینه صورت گرفت. و به منظور بررسی تغییرات بیان، سنتز cDNA و تکنیک نیمه کمی RT-PCR انجام شد. همچنین نتیجه‌ی آن توسط تکنیک Real time PCR برای تعدادی از نمونه‌ها تایید گردید.

در ادامه برای تعیین سکانس ناحیه پروموتری ژن، استخراج DNA از بافت پارافینه صورت گرفت. برای بررسی کیفیت، پس از انجام PCR روی ژل الکتروفورز برده شد. و سپس محتویات باندهای ایجاد شده روی ژل را برای انجام sequencing جدا کردیم و توالی‌یابی آن‌ها انجام شد.

استخراج RNA از بافت پارافینه با استفاده از روش فنل کلروفرم انجام شد. استخراج DNA از بافت پارافینه نیز با استفاده از روش فنل کلروفرم صورت گرفت.

برای بررسی کیفیت RNA و DNA استخراج شده، از ژل آگارز % ۱/۵ استفاده شد. در نمونه‌های یوکاریوتی، مشاهده‌ی باند برای RNA ریبوزومی s ۱۸ و s ۲۸، نشان دهنده‌ی کیفیت صحیح استخراج RNA است.

برای تعیین کمیت، غلظت و OD نمونه ها بوسیله ی دستگاه NanoDrop اندازه‌گیری و جذب نوری محلول RNA و DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد.

در نتیجه پیش از سنتز cDNA به روش RT-PCR ، میزان خالص بودن RNAهای استخراج شده بوسیله‌ی دستگاه NanoDrop اندازه‌گیری شد. در تمام واکنش‌ها غلظت‌های برابری از RNA نمونه‌های مختلف استفاده گردید و عمل RNA adjusting (normalizing) انجام شد.

سنتز cDNA از طریق PrimeScript First Strand cDNA Synthesis Kit شرکت takara انجام گرفت.

ابتدا در دمای $65^{\circ}C$ به مدت ۵ دقیقه RNA را انکوبه کرده و بعد ۳ دقیقه در یخ گذاشته شد. سپس برای هر ng ۵۰۰ از RNA به میزان $2\ \mu l$ از بافر، $0/5\ \mu l$ Random 6 mers primer و $0/5\ \mu l$ از آنزیم RT استفاده گردید. و با آب RNase Free به حجم $10\ \mu l$رسانده شد. و بعد در دستگاه ترموسایکلر قرارداده شد. برنامه دمایی آن روی $37^{\circ}C$ به مدت ۱۵ دقیقه و $85^{\circ}C$ به مدت ۵ ثانیه تنظیم گردید. در انتهای کار پس از پایان سنتز cDNA، میکروتیوب‌ها روی یخ قرار گرفت.

پرایمرهای مربوط به ژن RMRP و ژن مرجع GAPDH از طریق نرم‌افزارها و سایت‌های معتبر از جمله IDT Primer Quest Tool انتخاب و طراحی شده است. همچنین از لحاظ محل اتصال و ویژگی‌های بهینه توسط سایت IDT. Oligo Analyzer بررسی شد.

در انتهای کار از طریق NCBI Blast همسان بودن محل جفت شدن پرایمرها مورد بررسی قرار گرفت. طول قطعه تکثیر شده برای ژن RMRP ۱۳۹ bp و برای ژن GAPDH برابر با ۱۰۱ bp می‌باشد.

همچنین برای ناحیه پروموتری نیز طراحی و انتخاب پرایمر از طریق سایت‌های معتبر انجام شد. پس از تکثیر این ناحیه sequencing انجام گرفت و توالی نوکلئوتیدی آن در فرم‌های موتانت و وحشی مقایسه شد. طول قطعه تکثیر شده برای ناحیه پروموتری ژن RMRP برابر با ۲۲۰ می‌باشد.

برای انجام دادن فرآیند PCR به پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول نیاز است. به منظور آماده کردن پرایمرها براساس مقداری که شرکت بر روی تیوب پرایمر نوشته است به آن آب مقطر دیونیزه اضافه و پیپتاژ شد. سپس ۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرارگرفت. در انتها به میزان مورد نیاز از پرایمر اصلی با غلظت ۱۰۰ پیکومول پرایمر با غلظت ۱۰ پیکومول رقیق شد.

با استفاده از پرایمرهای طراحی شده و از طریق انجام واکنش PCR، ژن RMRP تکثیر شد. از آنجاییکه طول قطعه‌ی تکثیر شده برای ناحیه ژن و ناحیه پروموتر مقادیر نزدیک به هم بود، شرایط انجام RT-PCR برای تکثیر ژن هدف و شرایط انجام PCR برای تکثیر توالی پروموتری و همچنین شرایط الکتروفورز برای هر دو یکسان در نظر گرفته شد.

واکنش PCR از طریق تغییرات دمایی و فازهای مختلف آن در سه مرحله انجام شد و به منظور تکثیر هرچه بیشتر DNA هدف، این واکنش سه مرحله‌ای به دفعات تکرار گردید.

برای بررسی نتیجه PCR از ژل ۱/۵ درصد استفاده گردید. برای این منظور، یک ونیم گرم پودر آگارز در ۱۰۰ سی سی 1x TBE ریخته و با حرارت دادن به صورت محلول شفاف و یکنواختی در آورده شد. بعد از آنکه تا حدود ۶۰-۵۰ درجه سانتی‌گراد سرد شد، داخل قالب مخصوص ریخته شد. ۵ میکرولیتر محصول PCR با ۲ میکرولیتر بافر بارگذاری ترکیب شد و به آرامی درون چاهک‌ها در تانک الکتروفورز حاوی بافر TBE 1X ریخته شد. برای تعیین اندازه قطعات DNA الکتروفورز شده از Ladder 50 bp شرکت Fermentas استفاده گردید. بعد از انتقال همه محصولات به درون چاهک‌ها دستگاه به منبع برق وصل شد تا جریان الکتریکی برقرار شود. ولتاژ دستگاه روی ولتاژ ۱۰۰ تنظیم گردید و الکتروفورز در مدت ۴۰ دقیقه انجام شد. در انتهای کار، بوسیله دستگاهGel documentation عکس ژل تحت اثر نور فرابنفش گرفته شد.

پس از مشاهده‌ی باندهای ایجاد شده روی ژل، میزان بیان هر باند از طریق نرم‌افزار Gelquant با تبدیل intensity و sharpness و شدت نور هر باند به کمیت عددی استاندارد، آنالیز گردید. از این طریق مقدار بیان ژن در نمونه‌های توموری و کنترل مقایسه شد و افزایش و یا کاهش بیان مورد بررسی قرار گرفت.

جدول ۱: توالی پرایمرهای طراحی شده

RMRP	Forward	5′-CTACACACTGAGGACTCTGTTC-3′
	Reverse	5′-CAGCGGGATACGCTTCTT-3′
GAPDH	Forward	5′-ACAACTTTGGTATCGTGGAAGG-3′
	Reverse	5′-GCCATCACGCCACAGTTTC-3′

جدول ۲: توالی پرایمرهای ناحیه پروموتری

RMRP	Forward	5′- ACTCTCTGCCCGAGGTC-3′
	Reverse	5′ -TAGTCTTAGAAAGTTATGCCCGAAA- 3′

به منظور تعیین سکانس ناحیه پروموتر و مقایسه آن در نمونه‌های توموری و کنترل، ابتدا یک نمونه از گروه متاستاز مثبت انتخاب گردید و برای DNA استخراج شده‌ی آنها واکنش PCR صورت گرفت و محصولات بدست آمده، روی ژل بارگذاری شدند. پس از مشاهده و حرکت باندها روی ژل، ناحیه‌ای از ژل که باند روی آن قرار گرفته است جدا گردید و بعد از استخراج توالی پروموتری تکثیر شده، برای این توالی sequencing انجام شد، و احتمال حضور جهش در توالی پروموتری نمونه‌های توموری مورد بررسی قرار گرفت.

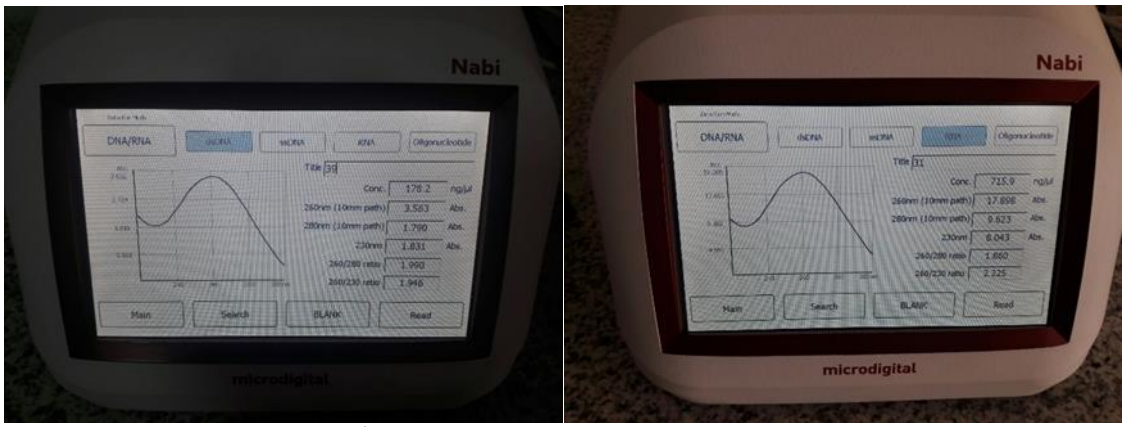
بیان LncRNA RMRP و mRNA GAPDH به عنوان کنترل، به کمک روش Real time PCR برای تعدادی از نمونه‌ها بررسی شدند تا از این طریق نتایج بدست آمده در مرحله RT-PCR تایید گردد. برای این کار، از دستگاه ABI Step One و روش SYBR green با استفاده از کیت Takara، SYBER Premix Ex TaqII استفاده شد.

بعد از آماده کردن نمونه‌ها با حجم ۲۰ μl، داخل دستگاه قرار داده شدند و شرایط دمایی مربوط به واکنش Real time PCR برای ژن RMRP و ژن GAPDH طی ۴۰ سیکل در نظر گرفته شد.

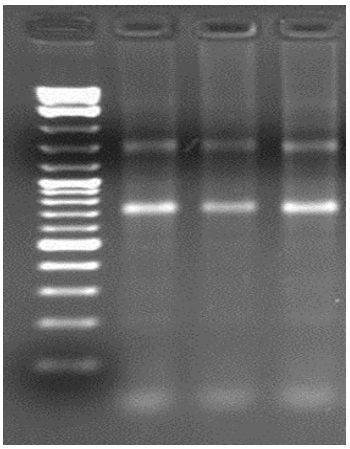
یافته‌ها

برای تعیین کمیت، غلظت و OD نمونه‌ها بوسیله‌ی دستگاه NanoDrop اندازه‌گیری و جذب نوری RNA و DNA استخراج شده در طول موج ۲۶۰ نانومتر خوانده شد.

کیفیت RNA استخراج شده از طریق بارگذاری ۵ میکرولیتر از نمونه‌های استخراجی بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفت. برای تعیین کیفیت DNA استخراج شده نیز به همین صورت عمل کردیم.



نمودار ۱: تعیین کمیت RNA و DNA استخراج شده توسط دستگاه NanoDrop



شکل ۱: تست Total RNA روی ژل

به منظور ارزیابی صحیح بودن فرایند استخراج RNA و سنتز cDNA ، واکنش PCR برای cDNA های سنتز شده انجام شد. نتایج بدست آمده صحت روند کار در همه مراحل سنتز cDNA را تایید کرد.

طی انجام فرآیند PCR، ژن مورد نظر بوسیله پرایمر اختصاصی خود تکثیر شد و بعد از تمام شدن واکنش، محصول را بر روی ژل آگارز ۱/۵ درصد بارگذاری کرده و قطعه ی ژن در سایز مربوط به خود روی ژل مشاهده شد.

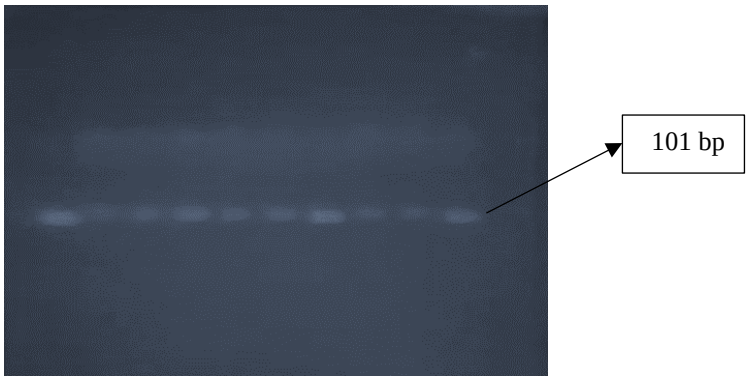
به منظور ارزیابی صحیح بودن فرایند استخراج DNA و تکثیر توالی پروموتری نیز همین واکنش انجام گردید و قطعه‌ی مورد نظر توسط پرایمر اختصاصی خود تکثیر شد و پس از اتمام واکنش PCR، محصول روی ژل برده شد. قطعه‌ی مورد نظر در سایز مربوط به خود روی ژل قرار گرفت. این ناحیه از ژل جدا گردید و برای این قطعه از پروموتر تعیین توالی صورت گرفت.

پس از انجام تکنیک RT-PCR و بارگذاری نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز، باندهای بدست آمده توسط نرم‌افزار Gelquant آنالیز و میزان تغییرات بیان RMRP میان گروه‌های توموری و کنترل سنجیده شد. نتایج از طریق آنالیز ANOVA یکطرفه بدست آمد و نمودارها توسط نرم‌افزار آنالیز آماری Graphpad رسم و با استفاده از نرم‌افزار SPSS تایید شد.

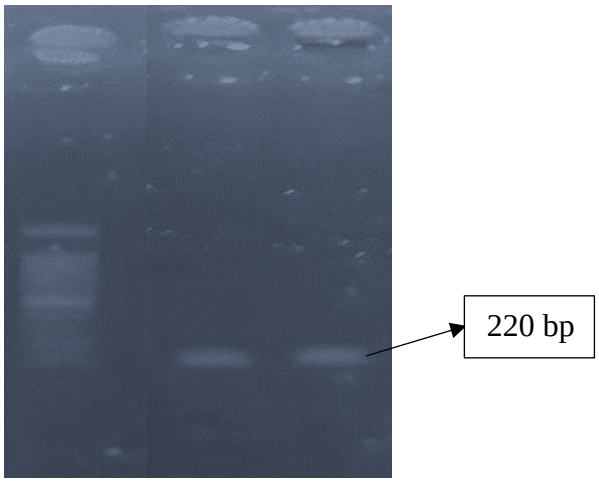
همچنین نتایج برای تعدادی از نمونه ها از طریق روش Real time PCR تایید گردید.

براساس نتایج بدست آمده بوسیله روش RT-PCR و بارگذاری نمونه‌ها روی ژل الکتروفورز و سپس آنالیز باندهای ایجاد شده، میانگین بیان RMRP در گروه های توموری و کنترل ارتباط آماری معناداری را نشان نداد.

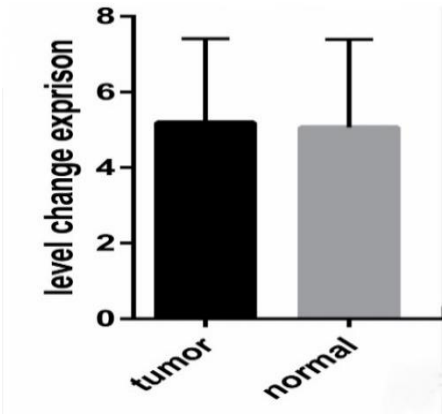
شکل ۲: تصویر ژل حاصل از RT-PCR ژن RMRP



شکل ۳: تصویر ژل مربوط به ژن مرجع GAPDH



شکل ۴: تصویر ژل حاصل از PCR ناحیه پروموتر

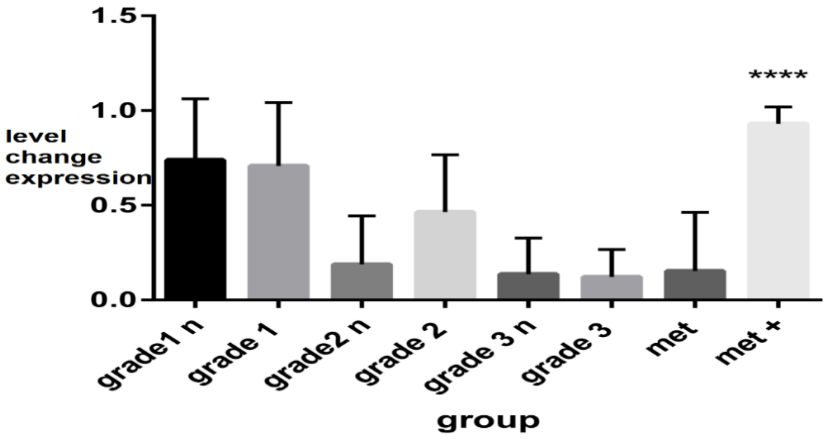


نمودار ۲: مقایسه تغییرات بیان RMRP در نمونه های توموری نسبت به نمونه های کنترل توسط تکنیک RT-PCR

این در حالی است که طبق آنالیز انجام شده، بین نمونه‌های توموری متاستاز مثبت و نمونه‌های متاستاز منفی، ارتباط معنادار و الگوی بیانی خاصی مشاهده شد. به گونه‌ای که ژن RMRP در نمونه‌های متاستاز مثبت نسبت به نمونه‌های متاستاز منفی افزایش بیان معناداری را با میزان P value< 0.05، نشان داد. در نمودار ۳ میزان تغییرات بیان ژن RMRP در بیماران با گریدهای مختلف در مقایسه با نمونه‌های کنترل منفی هر بیمار، نشان داده شده است.

طبق جدول ۳ تغییرات بیان RMRP در میان گروه های نرمال و بیماران مبتلا به stageهای مختلف بیماری، اختلاف آماری معناداری را نشان نداد. این در حالی است که بین نمونه‌های توموری متاستاز مثبت و نمونه‌های متاستاز منفی، ارتباط معنادار و الگوی بیانی خاصی مشاهده شد. در نتیجه RMRP می‌تواند به عنوان متاستازمارکری برای تفکیک گروه‌های توموری متاستاز مثبت و متاستاز منفی پیشنهاد گردد.

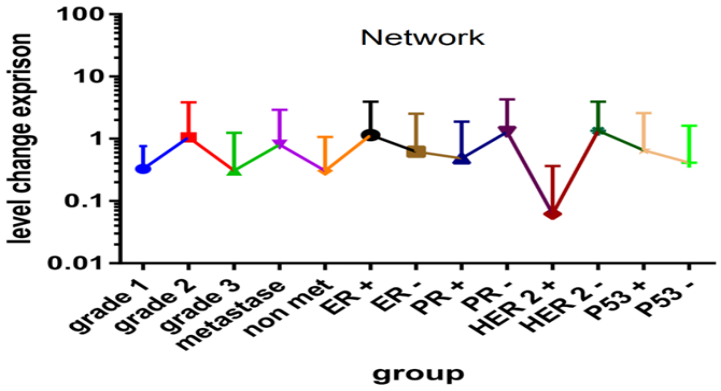
در نمودار ۴ تفاوت بیان ژن RMRP بین گروه‌های مختلف سرطان سینه براساس مارکرهای مختلف در جامعه آماری بررسی شده است. طبق نتایج بدست آمده از آنالیز ANOVA یکطرفه، بیان ژن RMRP در نمونه‌های HER2 مثبت نسبت به نمونه‌های HER2 منفی، کاهش بیان معناداری را نشان داده است. (P value = 0.011) در نتیجه RMRP در آینده می‌تواند به عنوان تومور مارکری برای تفکیک این دو گروه از سایر گروه‌ها، پیشنهاد گردد. همانطور که براساس آنچه در نمودار ۳ مشاهده شد، می‌تواند به عنوان متاستاز مارکری برای تفکیک گروه‌های متاستاز مثبت و متاستاز منفی پیشنهاد گردد.



نمودار ۳: مقایسه تغییرات بیان RMRP در بیماران با گریدهای مختلف در مقایسه با نمونه های کنترل منفی هر بیمار

جدول ۳: بررسی معناداری مقایسه بیان RMRP در گریدهای مختلف و نمونه های دارای متاستاز نسبت به نمونه های کنترل منفی بیماران

group	Mean Diff.	90% CI of diff.	Significant	Summary
grade1 n vs. grade 1	0.03131	-0.2721 to 0.3347	No	ns
grade2 n vs. grade 2	-0.2768	-0.6484 to 0.09475	No	ns
grade 3 n vs. grade 3	0.0146	-0.3751 to 0.4043	No	ns
met vs. met +	-0.7769	-1.148 to -0.4053	Yes	****



نمودار ۴: مقایسه تغییرات بیان RMRP در گروه های مختلف توموری در جامعه آماری کل

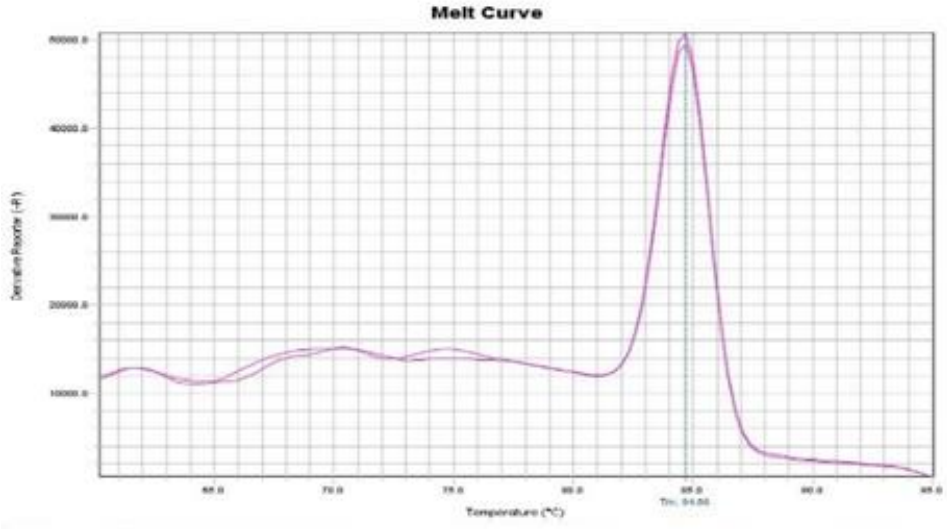
جدول ۴: بررسی معناداری مقایسه بیان RMRP در گروه های توموری نسبت به هم

group	Mean Diff.	90 %CI of diff.	Significant?	Summary
HER 2+ vs. HER 2-	-2.041	-4.037 to -0.04479	Yes	**

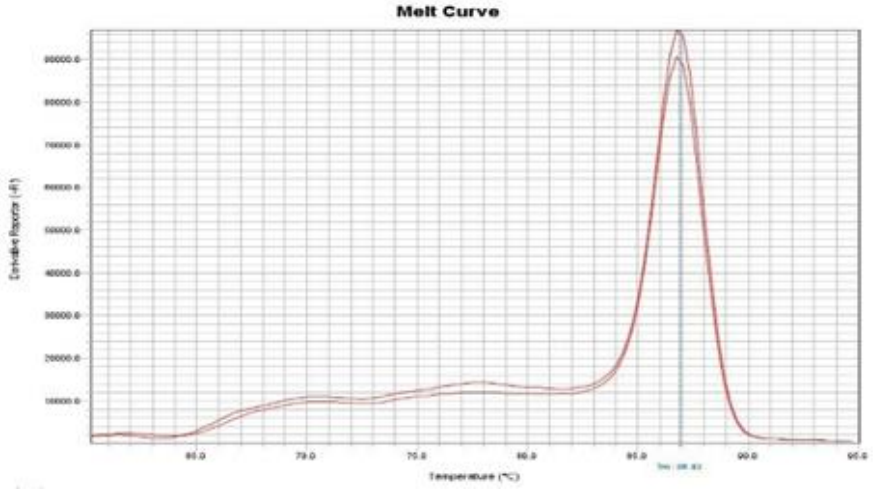
با توجه به نمودار ۴ و جدول ۴ در تمام گروه‌ها نسبت به هم سطح تغییرات بیان معنادار نبوده به غیر از گروه HER 2+ vs. HER 2- که بیان ژن RMRP در نمونه‌های HER2 مثبت نسبت به نمونه‌های HER2 منفی، کاهش بیان معناداری را نشان داده است.

پس از بدست آوردن نتایج واکنش Real time PCR، برای مطمئن شدن از نبود پیک های غیر اختصاصی و نبود آلودگی، منحنی ذوب بررسی گردید و سپس بیان ژن‌ها با استفاده از نرم افزار آنالیز شد.

در نمودارهای ۵ و ۶ یکی از منحنی‌های ذوب بیان ژن RMRP و ژن مرجع GAPDH آورده شده است.



نمودار ۵ : منحنی ذوب ژن RMRP



نمودار ۶ : منحنی ذوب ژن مرجع GAPDH

برای بدست آوردن مقیاس بیانی به منظور افزایش دقت آنالیز RT-PCR نیمه کمی، واکنش qPCR کمی انجام شد. نتایج بدست آمده از طریق روش Real time PCR برای تعدادی از نمونه‌ها در نمودار ۷ نشان داده شده و تغییرات بیان میان گروه‌های مختلف توموری و کنترل سنجیده شده است.

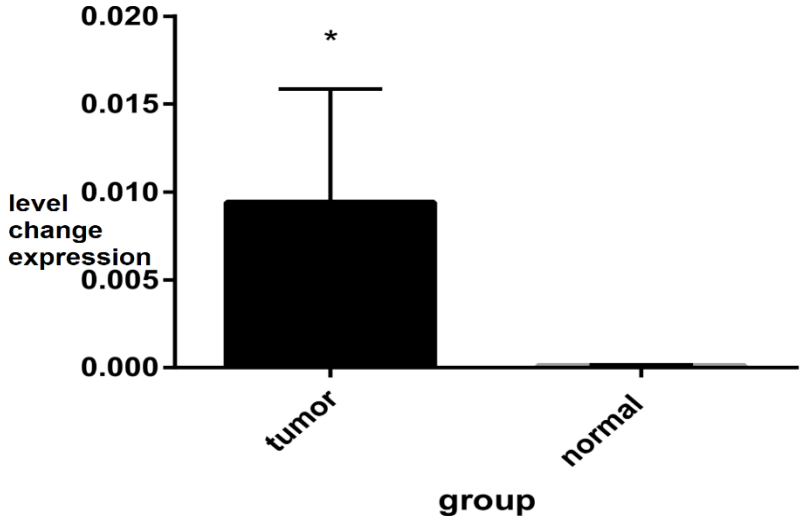
با توجه به نتایج بدست آمده از این تکنیک، بیان ژن RMRP در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های کنترل، افزایش بیان معناداری را با میزان P value = 0.014 نشان داد. این تکنیک تاییدی بود بر عملکرد صحیح پرایمرها و درستی تکثیر. در واقع با این روش در مقیاس خیلی کم هم نتایج قابل قبولی بدست آمد.

با توجه به نتایج نمودار ۷ و جدول ۵ بیان ژن RMRP در نمونه‌های توموری نسبت به نمونه‌های کنترل، افزایش بیان معناداری را نشان داد.

در ادامه‌ی کار به منظور بررسی تغییرات توالی ناحیه پروموتری ژن RMRP در نمونه‌ای از گروه متاستاز مثبت، تعیین سکانس برای این ناحیه انجام گردید. پس از بررسی نتایج حاصل از sequencing، گراف آن به صورت نمودار ۸ بدست آمد.

پس از دریافت نتیجه تعیین سکانس، به منظور بررسی وجود یا عدم وجود جهش، توالی بدست آمده با توالی مرجع blast شد تا تفاوت‌های آن نسبت به سکانس مرجع، در صورت وجود، شناسایی گردد. نتیجه بلاست سکانس ناحیه پروموتر در شکل ۵ آورده شده است. طبق نتایج بدست آمده، تمامی نوکلئوتیدها با هم match بودند و gap وجود نداشت. پس در نتیجه سکانس پروموتر این نمونه توموری با سکانس wild type هیچ تفاوتی نداشت و جهشی مشاهده نشد.

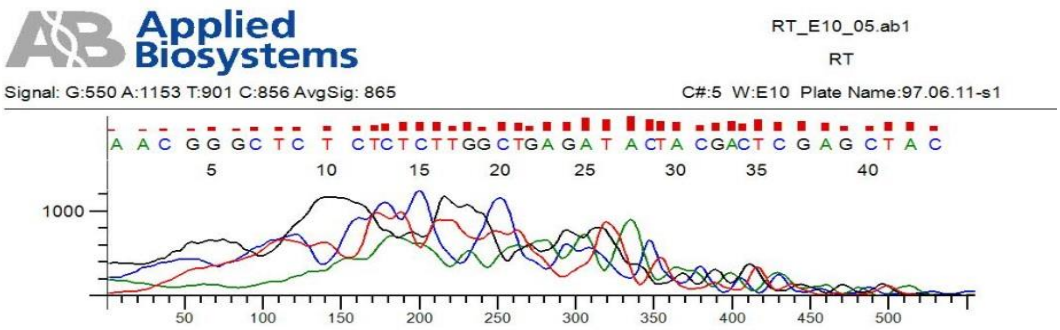
در نمودار ۹ گراف Dot Matrix نشان داده شده است. طبق این گراف، ماتریکس یک خط راست را نشان داده است و تمام نقاط ارزیابی شده در blast ، داخل یک خط پشت سرهم قرار گرفته اند. در حالیکه اگر یک یا چند جهش وجود داشت، اطراف خط راست چند نقطه ایجاد و یا خط منقطع می‌شد. نظر به اینکه خط ایجاد شده راست است در نتیجه هیچ جهشی وجود نداشته است.



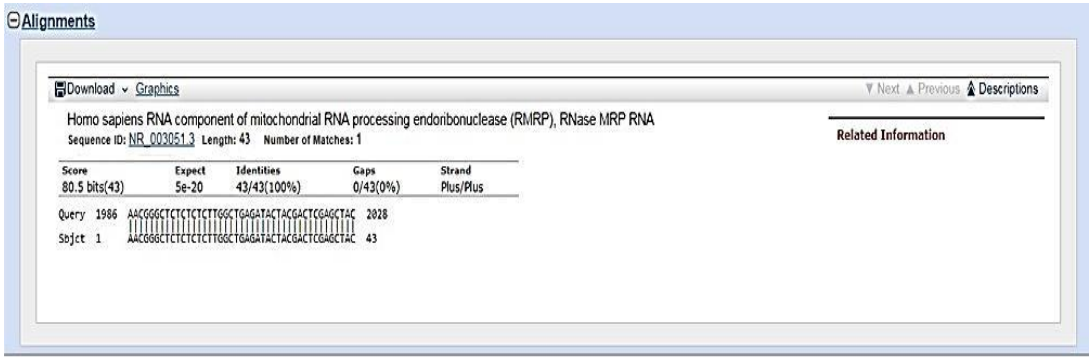
نمودار ۷: مقایسه تغییرات بیان RMRP در نمونه های توموری و نرمال توسط تکنیک qPCR

جدول ۵: مقایسه میزان معناداری بیان RMRP در نمونه های توموری و نرمال

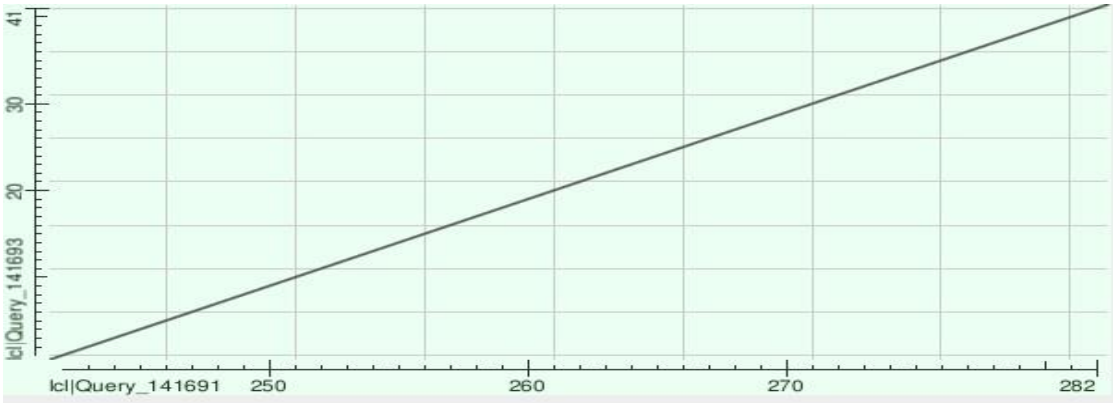
group	P value	Significant?	Summary
Normal vs. tumor	0.014	Yes	*



نمودار ۸: نتیجه تعیین سکانس ناحیه ای از پروموتر



شکل ۵: نتیجه بلاست سکانس ناحیه پروموتر



نمودار ۹: گراف Dot Matrix برای نتیجه تعیین سکانس

بحث وتفسیر

براساس آمار GLOBOCAN 2008، سرطان سینه عامل اصلی مرگ و میر ناشی از سرطان در میان زنان می‌باشد. سرطان سینه یک بیماری بسیار ناهمگن است که ناشی از تعامل بین عوامل ژنتیکی و محیطی می‌باشد. و می‌تواند به روش‌های مختلفی از جمله ویژگی‌های بالینی، بیان مارکرهای توموری و نوع بافت‌شناسی آن، طبقه‌بندی شود. تنظیم کننده‌های بیان ژن به عنوان بیومارکر و اهداف درمانی جدید برای بیماری‌های انسانی ازجمله سرطان مطرح هستند. تحقیقات نشان داده است که اختلال درتنظیم بیان LncRNAs، درپیشرفت سرطان نقش دارد. با این حال مکانیسم‌های بسیاری از LncRNA ها درسرطان‌ها تا حد زیادی ناشناخته است. استفاده از LncRNA ها به عنوان بیومارکرهای سرطان سینه هم هنوز به‌طور دقیق مشخص نشده است.

جهش توموری، یک مارکرپیش آگهی دهنده و تشخیصی برای بسیاری ازسرطان‌ها می‌باشد. تجزیه و تحلیل جهش‌های سرطانی موجود در سرتاسر ژنوم، چشم‌انداز گسترده‌ای از جهش های عملکردی را در داخل ژنوم نواحی غیرکد کننده نشان می دهد که اثرات زیادی بربیان lncRNAs می گذارد.

برای مثال وجود جهش‌هایی درتوالی ژن RMRP ، درایجاد بیماری cartilage-hair hypoplasia نقش دارد. مشخص شده است که وجود جهش‌هایی دراین ژن، افزایش خطر ابتلا به انواع مختلف تومورها را سبب می‌شود. همچنین وقوع جهش دراین ژن ، اتصال پروتئین تنظیمی به پروموترش را تحت تاثیرقرارمی‌دهد و سطوح بیانی نیز دستخوش تغییر می شود.

می‌توان از lncRNAs به‌عنوان بیومارکرهایی جدید برای تشخیص، پیش‌آگهی و پیش‌بینی پاسخ به درمان استفاده کرد. به‌نظر می‌رسد که افزایش و یا کاهش سطح بیان lncRNA در تومورها نسبت به بافت‌های طبیعی، یک ویژگی مشترک بین lncRNAs است.

طبق مطالعه انجام شده توسط Salvador و همکاران که در سال ۲۰۱۷ با هدف بررسی نقش چندین LncRNA در بیماران مبتلا به سرطان سینه صورت گرفت، افزایش معنادار

سطح بیان LncRNA RMRP در گروه‌های سرطان پیشرفته لومینال و Her2 مثبت نشان داده شد [۱۳].

همچنین در مطالعه دیگری که در سال ۲۰۱۷ توسط Rheinbay و همکاران انجام شد، تغییرات بیان LncRNA RMRP، بواسطه جهش‌های ناحیه پروموتر، در بافت سرطانی سینه، بررسی شد. تحقیقات آن‌ها نشان داد که مناطق پروموتری، جایگاه موتاسیون‌های عودکننده با اثرات عملکردی در سرطان هستند. در نتیجه مشخص شد که در گروه بیماران، ژن RMRP موتاسیون‌هایی را حمل می‌کند که اتصال پروتئین به پروموترش و تغییرات سطح بیان را تحت تاثیر قرار داده است. به گونه ای که به دنبال این تغییر توالی، بیان RMRP در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش معناداری را نشان داده است [۱۱].

با توجه به هدف این مطالعه، به بررسی سطح بیان LncRNA RMRP در گروه بیماران مبتلا به سرطان سینه نسبت به گروه کنترل پرداخته شد. میزان بیان RMRP در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل افزایش نشان داد.

همچنین به بررسی تغییرات بیان RMRP با توجه به عوامل بالینی مختلف از جمله مرحله بیماری و متاستاز پرداخته شد. تغییرات بیان RMRP در میان گروه‌های نرمال و بیماران مبتلا به stageهای مختلف بیماری، اختلاف آماری معناداری را نشان نداد. این در حالی است که بین نمونه های توموری متاستاز مثبت و نمونه‌های متاستاز منفی، ارتباط معنادار و الگوی بیانی خاصی مشاهده شد. به گونه‌ای که RMRP در نمونه‌های متاستاز مثبت نسبت به نمونه‌های متاستاز منفی افزایش بیان معناداری را با میزان P value< 0.05، نشان داد. در نتیجه RMRP می‌تواند به عنوان متاستاز مارکری برای تفکیک گروه های توموری متاستاز مثبت و متاستاز منفی بکار رود.

همچنین تفاوت بیان RMRP بین گروه‌های مختلف سرطان سینه براساس مارکرهای مختلف در جامعه آماری بررسی شد. طبق نتایج بدست آمده، بیان RMRP در نمونه‌های HER2 مثبت نسبت به نمونه‌های HER2 منفی، کاهش بیان معناداری را نشان داده است (P value= 0.011).

در نتیجه RMRP در آینده می تواند به عنوان تومورمارکری برای تفکیک این دو گروه از سایر گروه‌ها، پیشنهاد گردد.

با توجه به هدف دیگر این مطالعه، به بررسی و تعیین توالی ناحیه پروموتری ژن RMRP در گروه بیماران نسبت به گروه کنترل پرداخته شد. پس از دریافت نتیجه تعیین سکانس، به منظور بررسی وجود یا عدم وجود جهش، توالی بدست آمده با توالی مرجع blast شد تا تفاوت‌های آن نسبت به سکانس مرجع، در صورت وجود، شناسایی گردد. طبق نتایج بدست آمده، تمامی نوکلئوتیدها با هم match بودند و gap وجود نداشت. پس در نتیجه سکانس پروموتر این نمونه توموری با سکانس wild type هیچ تفاوتی نداشت و جهشی مشاهده نشد.

طبق گراف Dot Matrix ، ماتریکس یک خط راست را نشان داد و تمام نقاط ارزیابی شده در blast، داخل یک خط پشت سرهم قرار گرفتند. نظر به اینکه خط ایجاد شده راست است در نتیجه هیچ جهشی وجود نداشته است.

با توجه به نتایج بدست آمده برای تعیین سکانس، چندین فرضیه مطرح است. از آنجاییکه بعد از توالی یابی، سکانس مورد نظر هیچ تفاوتی نسبت به سکانس مرجع نداشت، در نتیجه شاید SNP یا جهشی که در سال ۲۰۱۷ توسط Rheinbay و همکاران شناسایی شد، در ژنوم ایرانی وجود نداشته باشد. و یا اینکه حداقل در آن ناحیه از ژنوم که مورد بررسی قرار گرفت وجود نداشته است. این امکان وجود دارد که در ژنوم ایرانی در ناحیه دیگری از توالی موتانت وجود داشته باشد.

نکته دیگر اینکه در این مطالعه تنها برای یکی از نمونه‌های توموری تعیین سکانس انجام شد. در نتیجه این امکان وجود دارد که در صورت سکانس کردن تعداد بیشتری از نمونه‌ها نتایج متفاوت تر و بیشتری مشاهده شود.

در نتیجه از آنجاییکه جهشی در سکانس ناحیه پروموتر ژن RMRP در نمونه توموری مشاهده نشد، به منظور یافتن ارتباطی میان افزایش بیان ژن LncRNA RMRP و وجود موتاسیون در ناحیه پروموتری این ژن دربیماران مبتلا به سرطان سینه همچنان به بررسی سکانس نمونه‌های بیشتری نیاز است. نتایج بدست آمده در این پژوهش، حاکی از آن

است که ژن RMRP می‌تواند به عنوان متاستاز مارکری برای شناسایی گروه‌های مختلف سرطان سینه پیشنهاد گردد. اما همچنان به بررسی‌های بالینی و مولکولی بیشتری برای اثبات دقیق تر آن نیاز می باشد.

همچنین پیشنهاد می گردد که تغییرات بیان LncRNA RMRP در رده‌های سلولی مرتبط با سرطان سینه و در تعداد بیشتری از بیماران مبتلا به این سرطان مورد بررسی قرار گیرد. و تغییرات توالی ناحیه پروموتر ژن RMRP در تعداد بیشتری از بیماران مبتلا به سرطان سینه و همچنین در نواحی دیگری از توالی پروموتر بررسی شود.

منابع

[1] Archer K, Broskova Z, Bayoumi AS, Teoh JP, Davila A, Tang Y, et al. 2015. Long non-coding RNAs as master regulators in cardiovascular diseases. International journal of molecular sciences. Oct 5; 16(10):23651-67.

[2] Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000009.12? Strand= 2&report =genbank&from=35657751&to=35658018. Accessed June 8, 2018.

[3] Available at: www.ensembl.org/Homo_sapiens/geneview?gene =ENSG00000269900. Accessed June 8, 2018.

[4] Chalmers ZR, Huang FW, Gay LM, Ali SM, Yelensky R, Chmielecki J, et al. 2016. Broad analysis of recurrent somatic mutations in cancer reveals a common novel non-coding mutation in the promoter of PMS2 associated with greatly increased tumor mutation load. AACR Publications. July

[5] Chang DD, Clayton DA. 1987. A novel endoribonuclease cleaves at a priming site of mouse mitochondrial DNA replication. The EMBO journal. Feb; 6(2):409.

[6] Hsieh CL, Donlon TA, Darras BT, Chang DD, Topper JN, Clayton DA, et al. 1990.The gene for the RNA component of the mitochondrial RNA- process- ing endoribonuclease is located on human chromosome 9p and on mouse chromosome 4. Genomics; 6:540-4.

[7] Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. 2011.Global cancer statistics. CA: a cancer journal for clinicians. Mar 1; 61(2):69-90.

[8] Maida Y, Yasukawa M, Furuuchi M, Lassmann T, Possemato R, Okamoto N, et al. 2009.An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. Nature. Sep 10; 461(7261):230-5.

[9] Milevskiy MJ, Al-Ejeh F, Saunus JM, Northwood KS, McCart-Reed AE, et al. Long-range regulation of HOTAIR identifies novel biomarkers of breast cancer outcome and suggests a role in genome instability.

[10] Parks RM, Derks MG, Bastiaannet E, Cheung KL. 2018. Breast Cancer Epidemiology. InBreast Cancer Management for Surgeons (pp. 19-29). Springer, Cham.

[11] Rheinbay E, Parasuraman P, Grimsby J, Tiao G, Engreitz JM, Kim J, et al. 2017.Recurrent and functional regulatory mutations in breast cancer. Nature. Jul 6; 547(7661):55-60.

[12] Rogler LE, Kosmyna B, Moskowitz D, Bebawee R, Rahimzadeh J, Kutchko K, et al. 2013.Small RNAs derived from lncRNA RNase MRP have gene-silencing activity relevant to human cartilage-hair hypoplasia. Human molecular genetics. Sep 5; 23(2):368-82.

[13] Salvador J, Pecero ML, Gil A, Rodriguez de la Borbolla M, Ruiz M, Montano A, et al. 2017.Circulating LncRNAs as predictive biomarkers by molecular subtypes in advanced breast tumors. Journal of Clinical Oncology 35, no. 15.35.15_suppl.e23041.

[14] Schmitt ME, Clayton DA. 1993. Nuclear RNase MRP is required for correct processing of pre-5.8 S rRNA in Saccharomyces cerevisiae. Molecular and cellular biology. Dec 1; 13(12):7935-41.

[15] Siegel RL, Miller KD, Jemal A. 2018.Cancer statistics, CA: a cancer journal for clinicians. 68(1):7-30.

[16] Shao Y, Ye M, Li Q, Sun W, Ye G, Zhang X, et al. LncRNA-RMRP promotes carcinogenesis by acting as a miR-206 sponge and is used as a novel biomarker for gastric cancer. Oncotarget. 2016 Jun 21; 7(25): 37812.

[17] Mousavi SM GM, Ramazani R, Davanlou M HN, Seddighi Z. (2009). Cancer incidence and mortality in Iran. Ann Oncol, 20: 556-63.

Study of LncRNA RMRP expression profile and RMRP gene promoter region mutations in breast cancer patients

Akbari Z.[1], Entezari M.[1,2], Sadeghizadeh M.[3*]

[1] Department of Genetics, Faculty of Advanced Science and Technology, Tehran Medical Sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[2] Farhikhtegan Medical Convergence science Research Center, Farhikhtegan Hospital Tehran Medical sciences, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
[3] Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University.Tehran, Iran.

*Email: sadeghma@modares.ac.ir

Received: July 2019 Accepted: January 2021

Abstract

Background: Gene expression regulators and mutations are a kind of biomarker and new therapeutic target for human diseases like cancer. LncRNAs are involved in Several regulatory processes. RNA components of mitochondrial RNA processing endoribonuclease is a lncRNA that its regulatory position has been identified in some cancers. Regarding the importance of the RMRP gene, we are investigating changes in the expression of this gene that are caused by promoter region mutations in breast cancer patients.

Methods: In this study, LncRNA RMRP gene expression was evaluated on 25 tumor samples and 25 control samples by semi-quantitative RT PCR technique, and confirmed by Real time PCR technique for a number of samples. Also, to detect the mutation in the promoter region of the LncRNA RMRP gene, DNA extraction and sequencing were performed.

Results: The expression of the RMRP gene in tumor samples showed a significant increase relative to control samples. Expression of RMRP gene was shown a significant decrease in positive HER2 samples compared to negative HER2 specimens and a significant increase in positive metastatic tumor samples compared to negative metastatic samples . Also, sequencing of the promoter region revealed differences in the region's sequence in tumor and normal samples.Based on sequencing results, there was no mutation in the RMRP promoter sequence of the tumor .

Conclusion: The RMRP gene can be suggested as a tumor and metastatic marker for the detection of breast cancer. But more clinical and molecular research is still needed to prove it more accurately.

Keywords: Breast cancer, LncRNA RMRP expression, RMRP gene Promoter, Mutation.