مقـاله پژوهشی
سلامت جامعه
دوره نهم، شماره ۱، بهار ۱۳۹۴

OCT4B1 و نقش آن در مهار بیان ژن‌های خانوادهTRAF در رده‌های سلول سرطانی (AGS، 5637 و U87MG)

محمدرضا میرزایی[1*]، مهدی محمودی[2]، محمدرضا حاجی‌زاده[3]، فهمیده بگرضایی[4]، رضا بهرام‌آبادی[5]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۴/۲۲ **تاریخ: پذیرش: ۱۳۹۴/۱۰/۱**

خلاصه

مقدمه: OCT4 یکی از ژن‌های مهم و تأثیرگذار بر مکانیسم خود بازآفرینی سلول (cell renewal) و هسته مرکزی مجموعه پروتئینی است که به‌عنوان عامل بنیادی بودن (Stemness) عمل می‌کنند. این ژن واریانت‌های متعددی از پروتئین OCT4 را کد می‌کند که مشهورترین آن‌هاOCT4B1 است. این واریانت به میزان بالایی در رده‌های سلول سرطانی و نیز بافت‌های سرطانی بیان می‌شود.. آپوپتوزیس توسط خانواده‌های مختلف ژنی کنترل و انجام می‌شود و یکی از این گروه‌های ژنی خانواده TRAF (TNF receptor-associated factor) است که شامل سه ژن (TRAF1، TRAF2 وTRAF3) می‌باشد. اطلاعاتی در مورد تأثیر واریانت OCT4B1 بر بیان ژن‌های خانواده TRAF، در دست نیست، بنابراین هدف این مطالعه بررسی تأثیر مهار واریانت OCT4B1 بر بیان سه ژن خانواده TRAF می‌باشد.

مواد و روش‌ها: رده‌های سلول سرطانی AGS (آدنوکارسینوم معده)،5637 (تومور مثانه) و U87MG (تومور مغز) در دو گروه تست و کنترل و با شرایط یکسان کشت و پس از رسیدن به تراکم سلولی موردنظر با استفاده از siRNA اختصاصی OCT4B1 (گروه تست) و scramble siRNA (گروه کنترل) مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. پس از ۴۸ ساعت RNA سلولی تخلیص و cDNA مربوطه سنتز گردید و با روش PCR Array، بیان ژن‌های موردنظر (خانوادهTRAF)، در هر رده سلولی و گروه‌های دوگانه تست و کنترل تعیین و بیان هر ژن با استفاده از نرم‌افزار اختصاصی شرکت RT SA Biosciences (RT) محاسبه گردید.

یافته‌ها: نتایج نشان داد تغییرات بیان ژنی در سه رده سلول سرطانی موردمطالعه تقریباً مشابه است و بیان هر سه ژن موردمطالعه، به دنبال مهار OCT4B1، کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد.

نتیجه‌گیری: طبق نتایج به دست‌آمده، مهار OCT4B1 باعث مهار بیان ژن‌های خانواده TRAF و القاء آپوپتوزیس در رده‌های سلول سرطانی می‌شود. بنابراین تأثیر مهار OCT4B1 بر فرایند آپوپتوزیس می‌تواند در مطالعات آتی شناخت مکانیسم ایجاد و درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: OCT4B1، خانواده ژنی TRAF، رده‌های سلول سرطانی

۱ - استادیار گروه آموزشی بیوفیزیک و ژنتیک پزشکی، مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان،رفسنجان،ایران.(نویسنده مسئول)
پست الکترونیک: mirzaeemr@gmail.com، تلفن ۰۳۴-۳۴۲۸۰۰۸۶
۲ - استاد گروه آموزشی بیوشیمی، مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۳ - استادیار گروه آموزشی بیوشیمی، مرکز تحقیقات پزشکی ملکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران
۴ - دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران،
۵ - کارشناس ارشد گروه میکروبیولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان، رفسنجان ، ایران،

مقدمه

تبدیل یک سلول نرمال به سلول سرطانی مستلزم تغییرات متعدد ژنتیکی و تغییر در بیان ژن‌های مختلفی است که بسیاری از این تغییرات و ژن‌های با اهمیت شناسایی‌شده و طبیعی است که ناشناخته‌ها هم بسیارند. اما حاصل این تغییرات منجر به اتفاقاتی می‌شود که سلول را یاغی نشان می‌دهد و یکی از علائم سلول یاغی عدم تبعیت از فرایندهای طبیعی سلول است که مرگ برنامه‌ریزی‌شده مهم‌ترین این فرایندهاست. اولین مرحله در ایجاد یک سلول سرطانی، تغییرات متعدد سلولی و مولکولی است که باعث فرار سلول از ورود به چرخه آپوپتوزیس می‌شوند[۱].

مکانیسم آپوپتوزیس بسیار پیچیده و شامل اتفاقات متعدد آبشاری است که با مصرف انرژی باعث فعال شدن پروتئین‌های متعددی می‌شوند و نهایتاً مرگ سلول را در پی خواهند داشت. دو مسیر عمده آپوپتوزیس شامل: مسیر خارج سلولی (Extrinsic) یا مسیر رسپتورهای مرگ سلولی و مسیر داخل سلولی (Intrinsic) یا مسیر وابسته به میتوکندری، شناسایی و توصیف شده‌اند و شواهدی وجود دارد که این دو مسیر به هم پیوسته‌اند و مولکول تأثیرگذار یک مسیر می‌تواند بر مسیر دوم هم مؤثر باشد[۲].

در خصوص منشأ سرطان دو نظریه مهم عنوان شده است و هرکدام شواهد خود را دارند اما جدیدترین و پرطرفدارترین این نظریه‌ها، نظریه سلول بنیادی سرطان (Cancer stem cell) است که بر اساس این نظریه سلول بنیادی بافتی (Adult stem cell) موجود در تقریباً تمامی بافت‌های بدن، یا سلول سوماتیک تغییریافته (Reprogrammed somatic cell) که خصوصیاتی مشابه سلول بنیادی را کسب کرده است، منشأ پیدایش و توسعه سرطان است[۵-۳]. بر اساس این نظریه فعال شدن ژن‌های خاصی که کنترل‌کننده تقسیم نامحدود (self-renewal) هستند، و یا تغییر در بیان ژن‌های اختصاصی سلول بنیادی، عامل تبدیل سلول نرمال به سلول یاغی است که منشأ ایجاد سرطان خواهد بود.

یکی از مهم‌ترین خصوصیات سلول‌های بنیادی نامیرا بودن (Immortalization) آن‌هاست. بدین معنی که این سلول‌ها به‌دفعات می‌توانند تقسیم شده (self-renewal) و خصوصیات خود را حفظ کنند. لازمه این فرایند بیان ژن‌هایی است که باعث مهار آپوپتوزیس شوند[۶]. ژن‌های متعددی در فرایند نامیرایی یا بنیادی بودن (Stemness) سلول دخیل‌اند که مهم‌ترین آن‌ها شامل OCT4، NANOG، SOX2، KLF4 و Nucleostemi می‌باشند که عمدتاً در سلول‌های بنیادی (جنینی، بافتی و سرطانی) فعال هستند[۷].

OCT4 (octamr-binding transcription factor 4)، متعلق به خانواده فاکتورهای نسخه‌برداری واجد دامین اتصالی به DNA (POU) است که در سلول‌های بنیادی بیان شده و با فرایند نسخه‌برداری چندگانه (alternative transcription)، حداقل سه واریانت مختلف (A، B و B1) را کد می‌کند[۹-۸]. بیان این ژن باعث حفظ حالت بنیادی بودن سلول و کاهش یا توقف بیان آن عامل تمایز سلولی و پایان بنیادی بودن سلول است[۱۰].

مطالعات پیرامون رده‌های سلول سرطانی و بافت‌های سرطانی منجر به شناخت و معرفی واریانت جدیدی از OCT4 بنام OCT4B1 شد که برخلاف دو واریته دیگر به میزان بیشتری در رده‌های سلول سرطانی و نیز بافت‌های سرطانی بیان می‌شود[۱۲-۱۱]. جالب اینکه مطالعات تکمیلی نشان داد این واریانت قدرت سرکوبگری آپوپتوزیس (Anti-apoptosis) دارد[۱۲].

به‌طورکلی، ژن‌های مؤثر در مسیر آپوپتوزیس در دو گروه عمده پیش آپوپتوز (القاءکننده آپوپتوزیس) و ضد آپوپتوز (مهار کننده آپوپتوزیس) تقسیم‌بندی می‌شوند و دوازده خانواده ژنی شامل: TNF ligand family، TNF receptor family، Bcl-2 family، Caspase family، IAP family، TRAF family، CARD family، Death family، Domain family، Death effector family، CIDE family، P53 and DNA damage response domain family و Anti-apoptosis gene family را شامل می‌شوند[۱۵-۱۳].

خانواده TRAF یکی از خانواده‌های ژنی مهم آنتی آپوپتوتیک است. ازآنجاکه اطلاعات کمی در خصوص چگونگی تأثیر واریانت OCT4B1 بر بیان ژن‌های مسیر مرگ برنامه‌ریزی‌شده وجود دارد، در این مطالعه اثر مهار این واریانت بر بیان سه ژن خانواده TRAF مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلول و تعیین الگوی بیانی واریانت های OCT4

سه رده سلول سرطانی شامل: AGS (آدنوکارسینوم معده)،5637 (تومور مثانه) و U87MG (تومور مغز) از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در محیط کشت RPMI1640 حاوی ۱۰ درصد سرم گاو (FBS)، ال-گلوتامین (۲ میلی مولار) و آنتی بیوتیک‌های پنی‌سیلین (۱۰۰u/ml) و استرپتومایسین(۱۰۰µgr/ml) در انکوباتور CO2 با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، رطوبت ۹۰ درصد و غلظت ۵ درصد دی اکسید کربن کشت شدند.

قبل از انجام ترانسفکشن، بیان واریانت‌های OCT4 در رده‌های سلولی موردمطالعه، ارزیابی شد تا از بیان واریانت OCT4B1 اطمینان حاصل شود. بدین منظور بدنبال کشت سلولی و رسیدن سلول‌ها به تراکم حدود ۷۰ درصد، سلول‌ها از محیط کشت جداشده 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 (نسبت ۲۶۰ به ۲۸۰ نانومتر) 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 سانتی‌گراد منتقل شدند.

بیان واریانت‌های OCT4 با استفاده از پرایمرهای اختصاصی هر واریانت (جدول شماره 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 در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر تهیه و در شرایط دمایی: یک چرخه ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه و ۴۵ چرخه با ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه (برای OCT4B1، ۶۱ درجه به مدت ۲۰ ثانیه) و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، واکنش انجام شد. واکنش سه بار تکرار گردید و از بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. میزان بیان هر واریانت به کمک فرمول $2^{-\Delta\Delta ct}$ محاسبه گردید. (جدول ۱)

جدول ۱- توالی پرایمرهای استفاده شده برای تکثیر واریانت‌های OCT4 و بتا اکتین (کنترل) و همچنین توالی siRNAهای استفاده شده برای مهار بیان OCT4B1

نام	نوع توالی	سکانس توالی
Version I OCT4B1:siRNA	Target	AAGGAGTATCCCTGAACCTAG
	Sense	(GGAGUAUCCCUGAACCUAG)dTdT
	Anti-sense	(CUAGGUUCAGGGAUACUCC)dTdT
Version II OCT4B1:siRNA	Target	AAGAGGTGGTAAGCTTGGATC
	Sense	(CAGUGGUAAGCUUGGAUC)dTdT
	Anti-sense	(AAUCCAAGCUUACCACCUC)dTdT
Scramble:siRNA	Sense	GCGGAGAGGCUUAGGUGUAdTdT
	Anti-sense	UACACCUAAGCCUCUCCGCdTdT
OCT4A primer	F	CGCAAGCCCTCATTTCAC
	R	CATCACCTCCACCACCTG
OCT4B primer	F	CAGGGAATGGGTGAATGAC
	R	AGGCAGAAGACTTGTAAGAAC
OCT4B1 primer	F	GGTTCTATTTGGTGGGTTCC
	R	TTCTCCCTCTCCCTACTCCTC
ß-actin primer	F	CACACCTTCTACAATGAGC
	R	ATAGCACAGCCTGGATAG

طراحی siRNA OCT4B1 و انجام لیپوفکشن جهت مهار واریانت OCT4B1، دو siRNA اختصاصی علیه سکانس اختصاصی واریانت OCT4B1 (اگزون 2b) طراحی شد. به عنوان کنترل، یک siRNA غیراختصاصی (scramble siRNA) که هیچ ترادف مشابهی در ژنوم انسان ندارد نیز طراحی گردید (جدول شماره ۱). جهت طراحی siRNA ها از برنامه طراحی siRNA موجود در سایت htt://jura.wi.mit.edu/ استفاده شد و SIRNA ها توسط شرکت MWG (آلمان) ساخته شد.

برای انجام لیپوفکشن، رده‌های سلولی مورد نظر در دو گروه تست و کنترل و در شرایط یکسان با تراکم یک صد هزار سلول بر میلی‌لیتر در فلاسک‌های کشت ۲۵ میلی‌لیتری کشت شده و پس از رسیدن به تراکم ۵۰-۳۰ درصدی مورد ترانسفکشن قرار گرفتند. به‌طور 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 غلظت نهایی ۲/۵ میلی‌لیتر 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 ارزیابی شدند.

بررسی میزان رخداد آپوپتوزیس در سلول‌های ترانسفرم شده

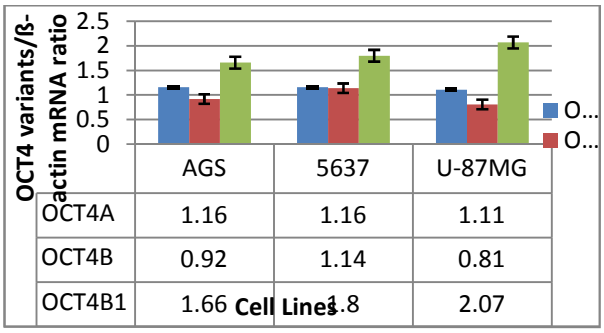
میزان رخداد آپوپتوزیس در رده‌های سلولی مورد مطالعه با استفاده از کیت Annexin-v-FLOUS بررسی شد. به‌طور خلاصه ۴۸ ساعت پس از انجام ترانسفکشن، ۲۰۰ میکرولیتر از محیط کشت واجد سلول‌های مورد نظر (گروه تست و کنترل)، به تیوب اپندرف منتقل و پس از سانتریفوژ رسوب سلولی در Binding Buffer حل گردید. پس از ۵ دقیقه یک میکرولیتر رنگ annexin و یک میکرولیتر رنگ پروپیدیوم ایودید (PI) به هر تیوب اضافه شده و به مدت ۵ دقیقه در تاریکی نگهداری شد و نهایتاً میزان سلول‌های در حال آپوپتوزیس با دستگاه فلوسیتومتری (Beakman-Counter) مورد آنالیز قرار گرفت. درصد سلول‌های FITC/PI مثبت، به‌عنوان سلول‌های آپوپتوتیک محاسبه گردید.

تعیین بیان ژن‌های خانواده TRAF

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 استفاده از دستگاه Real-Time PCR و روش PCR Array، بیان ژن‌های مورد مطالعه در گروه‌های ذکرشده تعیین گردید. آنالیزهای بیان ژنی با کمک نرم‌افزار (RT^2 Profiler PCR array data analysis version 3.5 software) انجام شد.

یافته‌ها

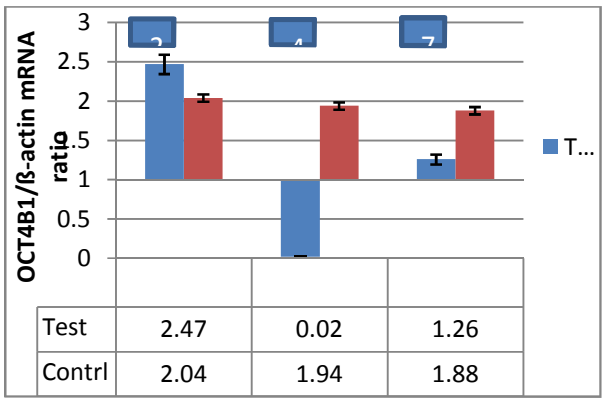
نتایج داده‌های دستگاه Real-time PCR، نشان داد هر سه واریانت OCT4 (A، B، B1) در رده‌های سلولی مورد مطالعه بیان شدند (نمودار ۱).



	AGS	5637	U-87MG
OCT4A	1.16	1.16	1.11
OCT4B	0.92	1.14	0.81
OCT4B1	1.66	1.8	2.07

نمودار ۱ - میزان بیان واریانت‌های OCT4 در رده‌های سلول سرطانی مورد مطالعه. محور افقی: سه رده سلول سرطانی شامل AGS(آدنوکارسینوم معده)،5637 (تومور مثانه) و U87MG (تومور بدخیم مغز). محور عمودی: میزان بیان هر واریانت (A: OCT4A، B: OCT4B و B1: OCT4B1) نسبت به ژن بتا اکتین (ژن خانگی به عنوان کنترل داخلی)

بیان واریانت OCT4B1 پس از ترانسفکشن siRNA و در فواصل زمانی ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت تعیین و مشخص گردید که بیشترین کاهش بیان این واریانت در مقایسه با گروه کنترل، مربوط به زمان ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن می‌باشد (نمودار ۲).



Test	2.47	0.02	1.26
Contrl	2.04	1.94	1.88

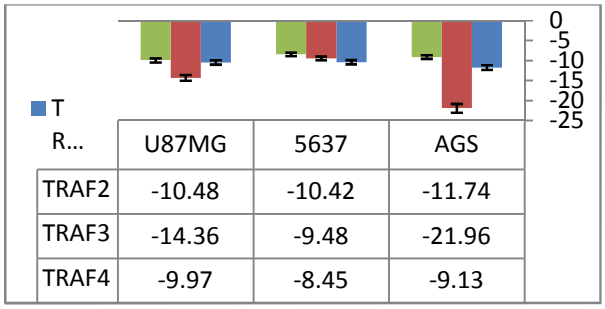
نمودار ۲ - میزان بیان واریانت OCT4B1 در رده سلولی AGS، ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت پس از ترانسفکشن siRNA. محور افقی: دو گروه تست (ترانسفکت شده با OCT4B1 siRNA) و گروه کنترل (ترانسفکت شده با scramble siRNA) رده سلولی AGS (آدنوکارسینوم معده). محور عمودی: میزان بیان واریانت OCT4B1 در مقایسه با بتا اکتین (ژن خانگی به عنوان کنترل داخلی) پس از گذشت ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت از ترانسفکشن سلولی

بررسی وضعیت آپوپتوزیس در رده‌های سلولی مورد مطالعه

نتایج آنالیز فلوسایتومتری که ۴۸ ساعت پس از ترانسفکشن siRNA انجام شد، نشان داد بیش از ۲۹ درصد از سلول‌های گروه تست (ترانسفکت شده با OCT4B1 siRNA) وارد آپوپتوزیس شده‌اند.

نتایج بیان ژنی خانواده TRAF

بیان سه ژن خانواده TRAFدر رده‌های سلولی مورد مطالعه به دنبال ترانسفکشن با OCT4B1 siRNA در مقایسه با گروه کنترل هر رده سلولی (ترانسفکت شده با scramble siRNA)، نشان داد بیان هر سه ژن موردمطالعه (TRAF1، TRAF2 و TRAF3)، به شکل معنی‌داری کاهش می‌یابد (نمودار ۳).



	U87MG	5637	AGS
TRAF2	-10.48	-10.42	-11.74
TRAF3	-14.36	-9.48	-21.96
TRAF4	-9.97	-8.45	-9.13

نمودار ۳- نمودار تغییرات بیان ژنی خانواده TRAF، در سه رده سلولیAGS، 5637 و U87MG، پس از مهار واریانت OCT4B1

بحث

هدف از این مطالعه بررسی اثر مهار واریانت OCT4B1 بر پروفایل بیانی ژن‌های خانواده TRAF، یکی از ۱۲ خانواده ژنی کنترل‌کننده مسیر آپوپتوزیس هست. آپوپتوزیس یک فرایند فعال و طبیعی سلول است که هنگام نیاز سلول و با فعال شدن ژن‌های خاص آغاز می‌شود. فشرده شدن سلول، متراکم شدن کروماتین و خرد شدن DNA از علائم انجام آپوپتوزیس است[۱۳, ۱۶]. آپوپتوزیس یک مسیر مهم سلولی است که مانع رشد و تکثیر سلول‌های یاغی و خصوصاً سلول‌های سرطانی می‌شود. مطالعات متعدد نشان می‌دهند یکی از دلایل شروع و پیشرفت سرطان در بافت‌های بدن، عدم انجام آپوپتوزیس است[۱۵].

بر اساس تئوری جدید سرطان "سلول بنیادی سرطان" منشأ سرطان در بافت‌های انسان، سلول‌های بنیادی بافتی است که تقریباً در تمامی بافت‌ها وجود دارند[۴]. بر این اساس، تغییرات ژنتیکی و فعال شدن یا غیر فعال شدن ژن‌های خاصی در این سلول‌ها باعث سوق دادن سلول به سمت سرطانی شدن می‌شود. مطالعات اخیر نشان داده است یکی از ژن‌های مهم در این سلول‌ها ژن OCT4 است که با فرایند پیرایش چندگانه (alternative splicing) واریانت‌های متعدد از این ژن تولید می‌شود[۱۱]. یکی از این واریانت‌ها که اخیراً شناسایی و گزارش شده است،OCT4B1 می‌باشد[۱۱, ۱۷]. این واریانت علاوه بر سلول‌های بنیادی طبیعی در سلول‌های بنیادی سرطان و بافت‌های سرطانی نیز بیان شده و مطالعات تکمیلی نشان از قدرت آنتی آپوپتوتیکی این واریانت دارد[۱۲].

بنابراین، این نظریه شکل گرفت که بیان این واریانت و قدرت سرکوبگری آپوپتوزیسی که دارد ممکن است اولین مرحله شکل‌گیری سلول سرطانی یا تبدیل سلول بنیادی بافتی به سلول پایه سرطانی باشد. واریانت OCT4A عمدتاً در سلول‌های بنیادی جنینی (ESCs) بیان شده و کاهش و توقف بیان آن نشانه تمایز سلولی است[۱۸] و OCT4B ظاهراً در

بنیادی بودن سلول (stemness) نقشی ندارد زیرا بیان این واریانت در سلول‌های سوماتیک هم مشاهده می‌شود اگرچه ارتباطی بین افزایش بیان این واریانت و استرس سلولی گزارش شده است[۱۹].

مسیر آپوپتوزیس مسیر پیچیده‌ای است و ژن‌های متعددی گاها با رفتارهای دوگانه (Pro/Anti-apoptosis) در آن نقش دارند که این ژن‌ها در ۱۲ خانواده ژنی طبقه‌بندی شده و بنا به رفتارشان، گاهی یک ژن در دو یا چند خانواده حضور دارد.

در مطالعه حاضر، تغییرات بیانی (پروفایل بیانی) سه ژن متعلق به خانواده ژنی TRAF در سه رده سلول سرطانی شامل AGS (آدنوکارسینومای معده)، 5637 (تومورمثانه) و U87MG (تومور بدخیم مغز)، پس از مهار واریانت OCT4B1 با استفاده از تکنولوژی siRNA و روش لیپوفکشن، مورد بررسی قرار گرفت.

همان‌گونه که در نمودار ۳ آمده است نتایج تغییرات بیان ژنی در سه رده سلولی موردمطالعه تقریباً مشابه است و هر سه ژن، پس از مهار OCT4B1 کاهش بیان قابل توجه‌ای را نشان می‌دهند.

این ژن‌ها عمدتاً آنتی آپوپتوزیس بوده بیان یا افزایش بیان آن‌ها عامل مهار آپوپتوزیس است[۲۰-۲۳].

نتیجه‌گیری: الگوی بیانی ژن‌های فوق مؤید آن است که OCT4B1 یک عامل مهم آنتی‌آپوپتوتیک است. به‌عبارت‌دیگر، مهار این واریانت باعث کاهش بیان ژن‌های خانواده TRAF می‌شود که مهارگر آپوپتوزیس می‌باشند. لذا در رده‌های سلول سرطانی و سلول‌های بافت‌های سرطانی که مطالعات متعدد بیان بالای OCT4B1 را در این بافت‌ها و رده‌های سلولی نشان داده‌اند (نسبت به دیگر واریانت‌های OCT4)، به نظر می‌رسد بیان ژن‌های سرکوبگر تومور و از جمله ژن‌های خانواده TRAF، افزایش داشته و این امر یکی از دلایل مهار آپوپتوزیس است. به هر حال، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که واریانت OCT4B1 یک عامل مهم در کمک به سلول در جهت فرار از مرگ برنامه‌ریزی یا آپوپتوزیس نقش دارد، لذا این نکته می‌تواند در مطالعات آینده و در حیطه سرطان مورد توجه قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این تحقیق قسمتی از پایان‌نامه دانشجویی است که با حمایت مالی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان انجام شده است. از همکاری صمیمانه کارشناسان مرکز تحقیقات پزشکی مولکولی دانشگاه علوم پزشکی رفسنجان که در انجام این تحقیق ما را یاری کردند تشکر می‌شود.

References

1. Johnstone RW, Ruefli AA, Lowe SW. Apoptosis: a link between cancer genetics and chemotherapy. Cell 2002;108(2):153-64.
2. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. Nature Reviews Cancer 2002;2(4):277-88.
3. Clarke MF, Becker MW. Stem cells: the real culprits in cancer? Scientific American 2006;295(1):52-9.
4. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. Cell 2006;124(6):1111-5.
5. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. nature 2001;414(6859):105-11.
6. Hyun JS, Tran MC, Wong VW, Chung MT, Lo DD, Montoro DT, et al. Enhancing stem cell survival in vivo for tissue repair. Biotechnology advances 2013;31(5):736-43.
7. Jean C, Aubel P, Soleihavoup C, Bouhallier F, Voisin S, Lavial F, et al. Pluripotent genes in avian stem cells. Development, growth & differentiation 2013;55(1):41-51.
8. Schöler HR, Ruppert S, Suzuki N, Chowdhury K, Gruss P. New type of POU domain in germ line-specific protein Oct-4. Nature 1990;344(6265):435-9.
9. Takeda J, Seino S, Bell GI. Human Oct3 gene family: cDNA sequences, alternative splicing, gene organization, chromosomal location, and expression at low levels in adult tissues. Nucleic acids research 1992;20(17):4613-20.

10. Lee J, Kim HK, Rho J-Y, Han Y-M, Kim J. The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. Journal of Biological Chemistry 2006;281(44):33554-65.
11. 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.
12. 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. International Journal of Cancer 2011;128(11):2645-52.
13. Barr PJ, Tomei LD. Apoptosis and its role in human disease. Nature Biotechnology 1994;12(5):487-93.
14. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73(8):2013-26.
15. Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. Nature Reviews Cancer 2009;9(7):501-7.
16. Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. Journal of internal medicine 2005;258(6):479-517.
17. Atlasi Y, Mowla SJ, Ziaee SA, Bahrami AR. OCT-4, an embryonic stem cell marker, is highly expressed in bladder cancer. International Journal of Cancer 2007;120(7):1598-602.
18. Seo K-W, Lee S-R, Bhandari DR, Roh K-H, Park S-B, So A-Y, et al. OCT4A contributes to the stemness and multi-potency of human umbilical cord blood-derived multipotent stem cells (hUCB–MSCs). Biochemical and biophysical research communications 2009;384(1):120-5.
19. Gao Y, Wei J, Han J, Wang X, Su G, Zhao Y, et al. The Novel Function of OCT4B Isoform-265 in Genotoxic Stress. Stem Cells 2012;30(4):665-72.
20. Clapp C, Portt L, Khoury C, Sheibani S, Eid R, Greenwood M, et al. Untangling the roles of anti-apoptosis in regulating programmed cell death using humanized yeast cells. Frontiers in oncology 2012;2:59.
21. Schteingart DE, Benitez R, Bradford C, Narayan A, Wang S. Expression of anti-apoptosis genes determines the response of adrenal cancer to apoptosis-inducing chemotherapy. Anticancer research 2010;30(12):4805-9.
22. Yefu W, Yipeng Q, Ying Z, Zhida L, Yiran Y. Functional study on baculovirus anti-apoptosis genes. Molecular and cellular biochemistry 2003;252(1-2):103-8.
23. Heeney MM, Ormsbee SM, Moody MA, Howard TA, DeCastro CM, Ware RE. Increased expression of anti-apoptosis genes in peripheral blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Molecular genetics and metabolism 2003;78(4):291-4.
24. Bernier P, Parent A. The anti-apoptosis bcl-2 proto-oncogene is preferentially expressed in limbic structures of the primate brain. Neuroscience 1997;82(3):635-40.
25. Beverly LJ. Regulation of anti-apoptotic BCL2-proteins by non-canonical interactions: The next step forward or two steps back? Journal of cellular biochemistry 2012;113(1):3-12.
26. Vogler M. BCL2A1: the underdog in the BCL2 family. Cell Death & Differentiation 2012;19(1):67-74.
27. Rosati A, Basile A, Falco A, d'Avenia M, Festa M, Graziano V, et al. Role of BAG3 protein in leukemia cell survival and response to therapy. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer 2012;1826(2):365-9.
28. Chua CC, Gao J, Ho Y-S, Xu X, Kuo I-C, Chua K-Y, et al. Over-expression of a modified bifunctional apoptosis regulator protects against cardiac injury and doxorubicin-induced cardiotoxicity in transgenic mice. Cardiovascular research 2009;81(1):20-7.
29. Rong J, Chen L, Toth JI, Tcherpakov M, Petroski MD, Reed JC. Bifunctional apoptosis regulator (BAR), an endoplasmic reticulum (ER)-associated E3 ubiquitin ligase, modulates BI-1 protein stability and function in ER Stress. Journal of Biological Chemistry 2011;286(2):1453-63.

30. Oberoi-Khanuja TK, Karreman C, Larisch S, Rapp UR, Rajalingam K. Role of melanoma inhibitor of apoptosis (ML-IAP) protein, a member of the baculoviral IAP repeat (BIR) domain family, in the regulation of C-RAF kinase and cell migration. Journal of Biological Chemistry 2012;287(34):28445-55.
31. Katagiri N, Shobuike T, Chang B, Kukita A, Miyamoto H. The human apoptosis inhibitor NAIP induces pyroptosis in macrophages infected with Legionella pneumophila. Microbes and Infection 2012;14(13):1123-32.
32. AMH Z-H, BA Z. NAIP-deletion analysis in Malaysian patients with spinal muscular atrophy. Kobe J Med Sci 2007;53(4):171-5.
33. Maier JK, Balabanian S, Coffill CR, Stewart A, Pelletier L, Franks DJ, et al. Distribution of neuronal apoptosis inhibitory protein in human tissues. Journal of Histochemistry & Cytochemistry 2007;55(9):911-23.
34. Qin W, Hu J, Guo M, Xu J, Li J, Yao G, et al. BNIPL-2, a novel homologue of BNIP-2, interacts with Bcl-2 and Cdc42GAP in apoptosis. Biochemical and biophysical research communications 2003;308(2):379-85.
35. Zhang H, Cheung P, Yanagawa B, McManus B, Yang D. BNips: a group of pro-apoptotic proteins in the Bcl-2 family. Apoptosis 2003;8(3):229-36.

OCT4B1 and its Role in Suppression of TRAF Family Gene Expression in Cancer Cell lines

Mirzaei MR[1]*, Mahmoodi M[2], Hajizadeh MR[3], Bagrezaei F[4], Bahramabadi R[5]

1-Assistant Prof, Dept. of Clinical Biochemistry, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran (Corresponding author). E-mail: mirzaeemr@gmail.com, Tel: 034-34280086, Fax: 034-34280097
2-Professor. Dept. of Clinical Biochemistry, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
3-Assistant Prof, Dept. of Clinical Biochemistry, Molecular Medicine Research Center, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
4- Msc student. Dept. of Clinical Biochemistry, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran
5-Msc student. Dept. of Microbiology, Rafsanjan University of Medical Sciences, Rafsanjan, Iran

Received: 13 July 2015 Accepted: 22 December 2015

Introduction: OCT4 is one of the major genes for controlling cell renewal and is the core of the proteins that is known as stemness state.OCT4 encodes several variants, the most famous is OCT4B1.This variant has expressed in cancer cell lines and cancer tissues and has anti-apoptotic potency. Apoptosis has an important role in the pathogenesis of various diseases including cancer and autoimmune disorders. Apoptosis is regulated by different gene families; TRAF (TNF receptor-associated factor) is one of these families which consist of three genes (TRAF1, TRAF2 and TRAF3).There is little Information about the effect of OCT4B1 on gene expression of TRAF family; so, the aim of this study was to evaluate the effect of OCT4B1suppression on expression of TRAF family.

Material and Methods: cancer cell lines AGS (gastric adenocarcinoma), 5637 (bladder cancer) and U87MG (brain tumor) were cultured in the test and control groups with the same conditions and were transected after reaching the desired cell density, using specific siRNA OCT4B1 (test group) and scramble siRNA (control). Cellular RNA was extracted and cDNA were synthesized 48 hours after transfection. Gene expressions of interest (TRAF family) were estimated by PCR Array method and the results were analyzed by RT software.

Results: A gene expression alteration in studied in the three cancer cell lines were similar.

Conclusion: According to the results, OCT4B1 suppression inhibits the expression of TRAF family and this induces apoptosis in the cancer cell lines. Therefore, OCT4B1 can be considered in the recognition of mechanism of cancer and also cancer therapy.

Key words: OCT4B1, TRAF family, Cancer cell line

Please cite this article as follows:

Mirzaei MR, Mahmoodi M, Hajizadeh MR, Bagrezaei F, Bahramabadi R.OCT4B1 and its Role in Suppression of TRAF Family Gene Expression in Cancer Cell lines. Community Health journal 2015; 9(1): 28-36.

Funding: the research was founded by Rafsanjan University of Medical Sciences

Ethical approval: the ethics committee of the Rafsanjan University of Medical Sciences (IR.RUMS.REC.1394.70)

Personal interest: Cancer genetics, Molecular genetics, Gene expression profiling