

Evaluation of MALAT-1 and HOTAIR LncRNAs Expression Levels in Incidence of Hemophilia

Elnaz Agi¹,
Ali Namvar²,
Azam Bolhassani³

¹ BSc in Laboratory Sciences, Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, Iran

² PhD in Molecular Genetics, Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, Iran

³ PhD in Clinical Biochemistry, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

(Received September 18, 2022 ; Accepted January 11, 2023)

Abstract

Background and purpose: LncRNAs are a group of non-coding RNAs with more than 200 nucleotides involved in transcriptional and post-transcriptional regulation of gene expression, that have a potential role in diagnosis, prevention and treatment of some disorders such as cancers. There is paucity of information about their involvement in hemophilia disease. This study aimed at discovering the relationship between expression levels of two common LncRNAs (MALAT-1 and HOTAIR) and incidence of hemophilia A in Iranian male patients.

Materials and methods: In this case-control study two common LncRNAs (HOTAIR and MALAT-1) were selected for gene expression analysis using quantitative Real-time PCR based on their features. At first, 5 ml of whole blood in EDTA anti-coagulant tube was collected from 50 severe hemophilia A male patients and 50 healthy male donors. Then, total RNA was extracted from peripheral blood and the cDNA was synthesized by reverse transcription method. After that, the expression of the selected LncRNAs was analyzed using qRT-PCR. Finally, the gene expression ratios for the LncRNAs were analyzed using REST-2009.

Results: A comparison between the hemophilia and non-hemophilia (healthy) groups demonstrated that the mean expression levels of two selected LncRNAs (MALAT-1 and HOTAIR) were significantly lower in hemophilia A samples compared with normal samples ($P < 0.05$).

Conclusion: The low expression levels of HOTAIR and MALAT-1 LncRNAs may be associated with incidence of disease in hemophilia A male patients.

Keywords: Long Non Coding RNA, MALAT-1, HOTAIR, hemophilia, factor VIII

J Mazandaran Univ Med Sci 2023; 32 (218): 1-12 (Persian).

Corresponding Author: Azam Bolhassani - Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran. (E-mail: A_bolhasani@pasteur.ac.ir)
Ali Namvar- Iranian Comprehensive Hemophilia Care Center, Tehran, Iran. (E-mail: alinamvar@outlook.com)

ارزیابی بیان RNAs غیر کدکننده طویل MALAT-1 و HOTAIR در بروز بیماری هموفیلی

الناز آگی¹علی نامور²اعظم بوالحسنی³

چکیده

سابقه و هدف: RNAهای غیر کدکننده طویل (LncRNAs) حاوی بیش از 200 نوکلئوتید هستند که در تنظیم رونویسی و پس از رونویسی بیان ژن نقش دارند و در تشخیص، پیشگیری و درمان اختلالاتی نظیر سرطان‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرند. به هر حال، ارزیابی آن‌ها در بیماری هموفیلی به میزان کمی انجام شده است. بنابراین هدف مطالعه حاضر شناسایی و تعیین ارتباط بین سطوح بیان دو LncRNA رایج (MALAT-1 and HOTAIR) و بروز هموفیلی A در بیماران مرد ایرانی بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه مورد/شاهدی، دو LncRNA رایج (MALAT-1 و HOTAIR) بر اساس ویژگی‌هایشان، برای تجزیه و تحلیل بیان ژن با استفاده از روش کمی Real-time PCR انتخاب شدند. در ابتدا، 5 میلی‌لیتر خون تام در لوله حاوی ضد انعقاد EDTA از 50 بیمار مرد با هموفیلی شدید A و 50 مرد سالم جمع‌آوری شد. سپس، RNA تام از خون محیطی استخراج و cDNA توسط روش رونویسی معکوس سنتز شد. بعد از آن، بیان LncRNA های انتخاب شده با استفاده از qRT-PCR مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. نهایتاً، نسبت‌های بیان ژن برای LncRNA ها توسط نرم‌افزار REST-2009 تجزیه و تحلیل شدند.

یافته‌ها: مقایسه بین گروه‌های هموفیل و غیرهموفیل (سالم) نشان داد که میانگین سطوح بیان دو LncRNA انتخاب شده (MALAT-1 و HOTAIR) در نمونه‌های هموفیلی A در مقایسه با نمونه‌های نرمال، به‌طور قابل توجهی پایین‌تر بود ($P < 0/05$).

استنتاج: میزان بیان پایین LncRNA های HOTAIR و MALAT-1 ممکن است با بروز بیماری در بیماران مرد هموفیلی A ارتباط داشته باشد.

واژه‌های کلیدی: RNA غیر کدکننده طویل، MALAT-1، HOTAIR، هموفیلی، فاکتور 8

مقدمه

بیماری هموفیلی یک بیماری ژنتیکی وابسته به جنس مغلوب است که دارای دو نوع A و B می‌باشد. هموفیلی نوع A یک اختلال خونریزی‌دهنده وابسته به جنس نادر است که در اثر کمبود یا نقص فاکتور 8

E-mail: A_bolhasani@pasteur.ac.ir

مؤلف مسئول: اعظم ابوالحسنی - تهران: خیابان 12 فروردین، انستیتو پاستور ایران، بخش هپاتیت و ایدز

E-mail: alinamvar@outlook.com

علی نامور - تهران: میدان فاطمی، خیابان جویبار، تقاطع خیابان فلسطین و زرتشت، مرکز درمان جامع هموفیلی ایران

1. کارشناسی علوم آزمایشگاهی، مرکز درمان هموفیلی ایران، تهران، ایران

2. دکتری ژنتیک مولکولی، مرکز درمان هموفیلی ایران، تهران، ایران

3. دکتری یوشیمی بالینی، بخش هپاتیت و ایدز، انستیتو پاستور ایران، تهران، ایران

تاریخ تصویب: 1401/10/21

تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1401/7/10

تاریخ دریافت: 1401/6/27

انعقادی به علت ناهمگنی ژنتیکی در ژن فاکتور 8 (FVIII) ایجاد می‌شود (2,1). براساس سطح فعالیت فاکتور 8 انعقادی در پلاسما، سه نوع هموفیلی A وجود دارد. بیماران هموفیلی با میزان فعالیت فاکتور 8 انعقادی کم‌تر از 1 درصد مبتلا به هموفیلی شدید (Severe) هستند که تقریباً 50 درصد تمام بیماران را شامل می‌شود. در 10 درصد بیماران، میزان فعالیت فاکتور 8 انعقادی بین 1 تا 5 درصد است که هموفیلی متوسط (Moderate) دارند و 40 درصد مابقی نیز هموفیلی خفیف (Mild) دارند که سطح فعالیت فاکتور 8 انعقادی آن‌ها بین 5 تا 30 درصد سطح نرمال است (3-5). به منظور بررسی اثر عوامل ثانویه بر بروز هموفیلی می‌توان به مطالعه و اندازه‌گیری تغییرات سطح بیان RNAهای غیرکدکننده طویل (LncRNAs) در افراد مبتلا در مقایسه با افراد سالم پرداخت. این نوع RNA غیرکدکننده طویل در گروه RNAهای رمزگذار شناسایی شده‌اند که در طول رونویسی حاوی 200 نوکلئوتید یا طویل‌تر هستند. آن‌ها مشابه با ژن‌های کدکننده پروتئین می‌باشند و گاهی اوقات به عنوان بخشی از رونوشت‌های آنتی‌سنس برای ژن‌های کدکننده، رونویسی می‌شوند (3,4). توالی ژن‌های LncRNA در گونه‌های مختلف، حفاظت شده نیستند (5-7). LncRNAها شبیه انواع دیگر RNA، ساختارهای ثانویه‌ای را تشکیل می‌دهند که نقش مهمی در مکانیسم‌های عملکردی دارند (8). در حقیقت، LncRNAها می‌توانند با DNA، RNA و پروتئین، میان‌کنش بیوشیمیایی داشته باشند (9). در سال‌های اخیر، LncRNAها به عنوان مهم‌ترین عوامل تنظیمی بیان ژن در نظر گرفته شده‌اند. بررسی‌ها نشان دادند که LncRNAها، با بسیاری از اختلالات اپی‌ژنتیکی مرتبط هستند. بعضی از اولین LncRNAهای اپی‌ژنتیک در پستانداران، در واقع از نشانه‌گذاری ژنومی و مطالعات غیر فعال شدن کروموزوم X شناسایی شده‌اند. چنین LncRNAهایی به عنوان عاملی برای تغییر کروماتین مطرح شده‌اند (10).

LncRNAها در طیف گسترده‌ای از فرآیندهای سلولی و مولکولی از جمله: رشد و تمایز (11)، بقا (12)، بازسازی کروماتین (13)، چرخه سلولی (14)، مهاجرت (15) و متابولیسم (8) نقش دارند. نقش‌های LncRNAها در کمپلکس‌های پروتئینی ریبونوکلیک مشاهده شده است که مراحل مختلف بیان ژن را تنظیم می‌کنند. پژوهش‌ها در ارتباط با مکانیسم‌هایی که توسط آن LncRNAها، ژن هدف خود را شناسایی می‌کنند، ادامه دارد (16). به هر حال، LncRNAها می‌توانند بیان ژن را در سطح پس از رونویسی، از طریق اتصال به miRNAهای اختصاصی تنظیم و در نتیجه از اتصال این miRNAها به رونوشت mRNA هدف خود، جلوگیری کنند (17). اخیراً نقش LncRNAها در بیماری‌های مختلف انسانی مورد بررسی قرار گرفته است (18,19). بررسی مطالعات و جمع‌آوری شواهد، ایجاد جهش و بنابراین تغییر در ساختارهای اول و دوم و سطح بیان LncRNAها را در تعدادی از آسیب‌های مربوط به انسان، از جمله بیماری‌های خود-ایمنی، سرطان‌ها (20)، بیماری‌های خونی (21) و بیماری‌های نورودژنراتیو (neurodegenerative diseases) نشان می‌دهد (22,23). هم‌چنین، اختلال در تنظیم LncRNAها با بسیاری از سرطان‌ها، از جمله کارسینوم سلول‌های بنیادی (24)، کارسینوم سلول‌های کلیه (25) و سرطان تخمدان (26) مرتبط است. در بافت سرطانی، LncRNAها اغلب با اتصال به مجموعه‌های اپی‌ژنتیک، به عنوان اجزای اصلی در تنظیمات رونویسی، نقش خود را ایفا می‌کنند (27,28). به علاوه، مشارکت برخی LncRNAها در تنظیم بلوغ سلول‌های خونی نشان داده شده است (29) که مرتبط با β -تالاسمی است. مطالعات نشان دادند که جهش در ژن β -گلوبین ممکن است بیان مربوط به LncRNAها را تحت تأثیر قرار داده و در نهایت بیان ژن هدف را تغییر دهد. نتایج نشانگر آن هستند که LncRNAها می‌توانند به شیوه‌های مختلفی، تنظیم بیان ژن را تحت تأثیر قرار دهند و تغییر سطح بیان آن‌ها با فنوتیپ بسیاری از بیماری‌ها از جمله ناهنجاری‌های

که در تنظیم بیان ژن و تغییرات کروماتین نقش عمده‌ای دارند با بیماری هموفیلی مورد ارزیابی قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

1) انتخاب نمونه‌ها

در این پژوهش (مورد/شاهدی) 50 بیمار مرد مبتلا به هموفیلی نوع A (کمبود شدید فاکتور VIII) و 50 مرد سالم (غیر هموفیل) به‌عنوان شاهد، شرکت کردند (36، 37). این مطالعه در بخش تحقیقات مرکز درمان جامع هموفیلی ایران و مطابق با قوانین کمیته اخلاق این مرکز (طبق مقررات 1975 هلسینکی و قوانین محلی مربوطه با کد IR.IAU.SRB.REC.1400.001) تصویب و انجام شد. از همه افراد شرکت کننده قبل از ورود به مطالعه، رضایت کتبی آگاهانه گرفته شد. میانگین سنی افراد هموفیل و سالم به ترتیب $25/66 \pm 8/95$ و $27/42 \pm 5/51$ سال بود. تشخیص بیماران مبتلا به هموفیلی با استفاده از تست‌های انعقادی شامل مدت زمان خونریزی (BT)، سطح فاکتور 8 (factor VIII)، زمان نسبی ترومبوپلاستین (PTT)، زمان پروترومبین (PT)، زمان نسبی ترومبوپلاستین فعال شده (APTT) صورت پذیرفت (جدول شماره 1).

جدول شماره 1: مشخصات دموگرافیک و داده‌های تست‌های آزمایشگاهی شرکت کنندگان در مطالعه

تعداد افراد	مبتلایان به هموفیلی	گروه شاهد
50	50	50
جنس	مرد	مرد
میانگین سنی (سال)	$25/66 \pm 8/95$	$27/42 \pm 5/51$
شدت بیماری	کمبود شدید فاکتور VIII	سالم
آسیب‌ناخت آمینوترانسفراز (AST) IU/L	$30/94 \pm 19/91$	$25 \pm 15/9$ (رنج کیت 10-40)
آلین آمینوترانسفراز (ALT) IU/L	$(\pm 22/45) 28/77$	$31 (\pm 24)$ (رنج کیت 7-55)
بیلی روبین کل mg/dL	$(\pm 1/08) 1/53$	$0/65 (\pm 0/35)$ (رنج کیت 0/3-1)
بیلی روبین مستقیم mg/dL	$(\pm 0/17) 0/32$	$0/2 (\pm 0/1)$ (رنج کیت 0/1-0/3)
سطح فاکتور VIII	<1	طبیعی (>5)
PT (sec)	$(8 \pm 98) 12/62$	$11/5 (1 \pm 5)$ (رنج طبیعی 13-10)
PTT (sec)	>38	28-38
APTT (sec)	>38	28-38
BT (min)	>7	7-2
INR	-	1-1/3

PT: Prothrombin Time;
PTT: Partial Thromboplastin Time;
APTT: Activated Partial Thromboplastin Time;
BT: Bleeding Time;
INR: International Normalized Ratio

هماتوپوئیتیک مانند لوکمی (23) در ارتباط است. با توجه به آن که LncRNA در بیماری‌هایی مثل تالاسمی مورد بررسی قرار گرفته است، می‌توان به بررسی آن در بیماران مبتلا به هموفیلی نیز پرداخت. در این مطالعه، سطح بیان دو LncRNA متداول سنجش شده در اختلالات دیگر (MALAT-1 و HOTAIR) را در بیماران مرد هموفیل و غیرهموفیل (افراد سالم) مورد بررسی قرار دادیم. MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcription 1)، که به نام NEAT2 (nuclear enriched abundant transcripts) نیز شناخته می‌شود، یک LncRNA انکوژن 8/7 کیلوبازی است که روی بازوی بلند کروموزوم 11 قرار دارد. نقش کلیدی این LncRNA در پیرایش و تنظیم بیان ژن مشاهده شده است (30). در اصل، MALAT1 به عنوان نشانگر پیش‌آگهی در سرطان ریه معرفی شد اما مطالعات بیش‌تر نشان داد این LncRNA با سرطان‌های متعددی مانند سرطان سینه، سرطان تخمدان، سرطان پروستات، سرطان پانکراس و لوکمی مرتبط است (31). هم‌چنین، HOTAIR (HOX transcript antisense intergenic RNA)، یک LncRNA انکوژن 2/2 کیلوبازی واقع در بازوی بلند کروموزوم 12 است که نقش آن در سرطان پستان، سرطان ریه، سرطان دهانه رحم، سرطان کولورکتال، سرطان مثانه و گلیوما شناسایی شده است (32). HOTAIR با کمپلکس‌های مختلف تغییرات کروماتین میان‌کنش دارد و به عنوان یک داربست مولکولی برای تغییر حالت کروماتین عمل کرده و در نتیجه بیان ژن‌های هدف را تنظیم می‌کند (33، 34).

لازم به ذکر است تنها مطالعه‌ای که در مورد ارتباط LncRNA‌ها با بروز بیماری هموفیلی وجود دارد مطالعه سابق ما در ارتباط با طراحی و بررسی دو LncRNA اختصاصی NONHSAT139215 و NONHSAT139219 در همین گروه از بیماران مبتلا به هموفیلی بوده است (35). بنابراین، در این مطالعه سعی شد که برای اولین بار، ارتباط دو LncRNA رایج (MALAT-1 و HOTAIR)

جدول شماره 2: توالی پرایمرهای طراحی شده برای LncRNA های MALAT-1 و HOTAIR و ژن کنترل GAPDH

Primer name	Sequence 5' to 3'	Primer length
MALAT F	GGGTGTTTACGTAGACCAGAACC	136 bp
MALAT R	CTTCCAAAAGCCTTCTGCCTTAG	
HOTAIR F	GGTAGAAAAAGCAACCAGGAAGC	170 bp
HOTAIR R	ACATAAACCTCTGCTGTGAGTGCC	
GAPDH F	CCCCCAATGTATCCGTTGTG	118 bp
GAPDH R	TAGCCCAAGGATGCCCTTAGT	

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از مسترمیکس آماده حاوی آنزیم Taq DNA polymerase شرکت یکتاتجهیز آزما، برای LncRNA های مورد نظر انجام و نتایج آن روی ژل آگارز 1 درصد بررسی شد.

(4) واکنش Real time PCR کمی (qRT-PCR) پس از تایید PCR، از نمونه‌های cDNA سنتز شده، رقت‌های مختلف تهیه و سپس با استفاده از دستگاه Real time PCR (Roche, Lightcycler 96 system) و آنزیم SYBR Green، واکنش Real time PCR به منظور محاسبه کارایی واکنش (Efficacy) انجام شد. به این صورت که با استفاده از مسترمیکس‌های آماده SYBR Green و پرایمرهای طراحی شده، میکروتیوب جداگانه‌ای برای هر نمونه تهیه شد (هر میکروتیوب حاوی 100 نانوگرم از cDNA سنتز شده، 10 پیکومول از پرایمرها و 10 میکرولیتر از آنزیم و بافر، در حجم نهایی 20 میکرولیتر بود) و پس از انجام واکنش Real time PCR، Ct (سیکل حد آستانه‌ی هر نمونه) یادداشت شد. سپس، با استفاده از فرمول (Pffaf) میزان افزایش یا کاهش بیان ژن‌های مورد نظر سنجیده شد (38).

$$\text{ratio} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta C_P \text{ target (control - sample)}}}{(E_{\text{ref}})^{\Delta C_P \text{ ref (control - sample)}}$$

(5) آنالیز آماری

با توجه به توزیع نرمال داده‌ها و برقراری اصل تجانس واریانس‌ها، نسبت بیان (Ratio) با استفاده از نرم‌افزار REST محاسبه شده و داده‌های به‌دست آمده توسط آزمون One Way ANOVA، تحلیل شد (39). در

معیارهای ورود به جمعیت مورد مطالعه شامل ابتلا به هموفیلی نوع A، مبتلایان مرد 18 سال به بالا، عدم ابتلا به سایر بیماری‌های زمینه‌ای مانند بیماری‌های ویروسی و عروقی، عدم ابتلا به سایر اختلالات خونی بود. به‌علاوه، معیارهای خروج از جمعیت مورد مطالعه شامل وجود مهارکننده (Inhibitor) و ابتلا به سایر اختلالات انعقادی مانند نقص ترکیبی فاکتور انعقادی مربوط به نقص هم‌زمان فاکتور 8 و فاکتور فون‌ویلبراند بود.

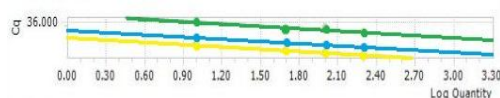
(2) نمونه‌گیری، جداسازی RNA و سنتز cDNA

نمونه‌گیری از بیماران انتخاب شده، به میزان 5 میلی‌لیتر خون کامل در لوله حاوی ضدانعقاد EDTA انجام شد (38). به منظور جداسازی RNA از نمونه‌ها، استخراج توسط کیت یکتاتجهیز آزما (FavorPrep™ Blood/ (Cultured Cell Total RNA Mini Kit (Favorgen, Taiwan) به روش ستونی و با استفاده از بافرهای لیزکننده، متصل‌کننده و خارج‌کننده صورت گرفت. برای تعیین غلظت RNA استخراج شده و اطمینان از عدم آلودگی به پروتئین و DNA، دستگاه نانودراپ شرکت THERMO FISHER مورد استفاده قرار گرفت. همچنین برای تایید خلوص RNAهای استخراج شده، نمونه‌ها روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شدند. سپس واکنش سنتز cDNA با روش رونوشت بردار معکوس (Reverse Transcriptase) و استفاده از راهنمای کیت یکتاتجهیز (ساخت کشور تایوان) و در حضور آنزیم RT و پرایمرهای Random hexamer انجام شد.

(3) طراحی پرایمر و PCR

طراحی پرایمرها برای دو LncRNA (MALAT-1 و HOTAIR) و ژن کنترل GAPDH (به دلیل بیان پایدار و ثابت در هر دو گروه بیمار و شاهد) توسط نرم افزار NCBI Primer صورت گرفت و همچنین با استفاده از نرم افزار SnapGene تایید شد. این پرایمرها در شرکت metabion کانادا سنتز شدند. توالی پرایمرها در جدول شماره 2 قابل مشاهده است.

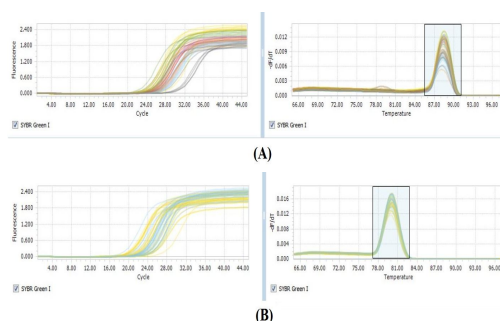
سپس واکنش qRT-PCR انجام شد. مقادیر کمی به عنوان سیگنال فلورسنت آستانه PCR به دست آمد. از ژن GAPDH برای نرمال سازی داده ها استفاده شد. سطح LncRNA هدف نسبت به سطح ژن مرجع، در همان نمونه نرمال و اندازه گیری هر نمونه سه بار تکرار شد (نمودار شماره 1).



نمودار شماره 1: منحنی استاندارد، بازده واکنش ها برای GAPDH (سبز)، HOTAIR (آبی) و MALAT-1 (زرد) به ترتیب 1/92، 2/08 و 1/92 است.

پس از انجام واکنش Real time PCR برای تایید اختصاصیت محصول PCR، آنالیز منحنی ذوب انجام گرفت. نتایج نشان داد که منحنی ذوب برای MALAT-1 و HOTAIR در دمای حدود 80-85 درجه سانتی گراد می باشد. این دماها منطبق بر محصول PCR است و به صورت اختصاصی نشان دهنده تکثیر صحیح ژن های MALAT-1 و HOTAIR می باشد (نمودار شماره 2).

از روش سیکل حد آستانه (Ct) برای محاسبه کمیت نسبی LncRNA ها در نمونه های خون هموفیلی در مقایسه با نمونه های شاهد (سالم) استفاده شد (نمودار شماره 3).

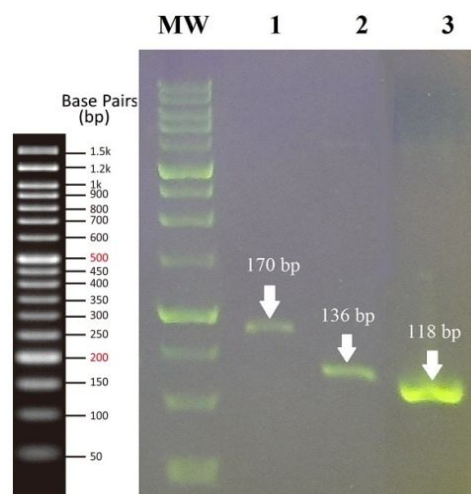


نمودار شماره 3: منحنی ذوب و منحنی تکثیر. منحنی ذوب نمایانگر دمای حدود 80-85 درجه سانتی گراد برای HOTAIR (A) و MALAT-1 (B) است.

حقیقت، محاسبه اختلاف بیان میان گروه ها توسط نرم افزار REST انجام شد و محاسبه کارایی توسط فرمول Pfaffl و با استفاده از داده های Ct به دست آمده از دستگاه صورت گرفت. در مقایسه بین گروهی، ارزش $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

دو LncRNA، MALAT-1 و HOTAIR برای بررسی تغییر میزان بیان (بین افراد مبتلا به هموفیلی و گروه شاهد)، بر اساس ویژگی هایشان انتخاب شدند. ابتدا واکنش PCR برای بررسی عملکرد صحیح پرایمرهای طراحی شده انجام و سپس محصول به دست آمده روی ژل آگارز 1 درصد الکتروفورز شد. صحت تکثیر ژن های HOTAIR، MALAT-1 و GAPDH در کنار شاخص مولکولی 50 جفت بازی شرکت SmoBio تایید شد (تصویر شماره 1).



تصویر شماره 1: نتیجه حاصل از الکتروفورز محصول PCR روی ژل آگارز 1 درصد

ستون 1) باند 170 جفت بازی HOTAIR،

ستون 2) باند 136 جفت بازی MALAT-1

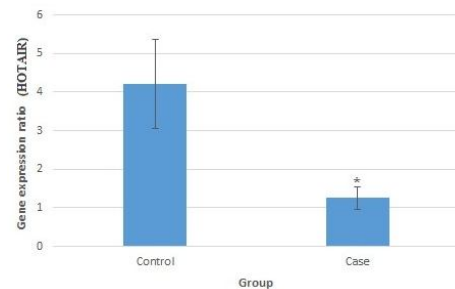
ستون 3) باند 118 جفت بازی GAPDH

MW نشان دهنده شاخص اندازه مولکولی بر اساس جفت باز (bp) می باشد (SmoBio، 50 bp)

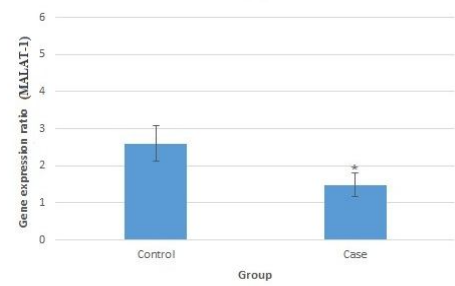
سطح بیان متفاوت در بافت‌های نرمال و آسیب‌دیده در بیماری‌های مختلف نظیر سرطان‌ها، تلانژکتازی خونریزی‌دهنده ارثی و اوتیسم شناسایی شدند (40-44). تاکنون تعداد زیادی LncRNA شناسایی و عملکرد آن‌ها ارزیابی شده‌اند (45) که از بین آن‌ها دو مورد MALAT1 و HOTAIR برای بررسی در بیماران مبتلا به هموفیلی نوع A در این پژوهش انتخاب و بررسی شد. این انتخاب بر اساس مطالعات گسترده پیشین روی این دو LncRNA در بیماری‌های مختلف، عملکرد مهم آن‌ها در تنظیم بیان ژن و نیاز به بررسی و اندازه‌گیری آن‌ها در مبتلایان به هموفیلی صورت گرفت.

مطالعات اخیر نقش تاثیرگذار MALAT1 را در فرآیندهای بیولوژیکی از جمله پردازش RNA، رونویسی ژن، تخریب پروتئین و تنظیم متابولیسم نشان داده‌اند (46، 47). Wang و همکاران نشان دادند که ارزیابی آنتی‌ژن کارسینوما مریونیک (CEA) و MALAT-1 با هم، از دقت و حساسیت بالاتری در پیش‌آگهی ابتلا به سرطان ریه نسبت به ارزیابی CEA به تنهایی برخوردار است (48). اگرچه گزارش‌های اولیه شواهدی مبنی بر ارتباط MALAT1 با متاستاز در مراحل ابتدایی سرطان ریه ارائه کردند، مطالعات بعدی نشان دادند که MALAT1 یک رونوشت هسته‌ای بسیار فراوان است و به طور گسترده و حفاظت شده در بین 33 گونه پستانداران وجود دارد (49). هم‌چنین HOTAIR نه تنها در انسان، بلکه در رت و موش نیز وجود دارد. با این حال، این LncRNA در مهره‌داران غیرپستاندار یافت نمی‌شود (50). مطالعات اخیر نشان داده است که HOTAIR در خون محیطی به عنوان یک نشانگر پیش‌آگهی قوی در بیماران مبتلا به سرطان معده، سرطان پستان یا گلیوبلاستوما عمل می‌کند (51-53).

Liu X-h و همکاران در سال 2013 دریافتند که در مراحل پایانی تومورزایی و در تومورهای متاستاتیک، میزان بیان HOTAIR به‌طور قابل توجهی بالاتر از بافت‌های طبیعی است. هم‌چنین، در بیماران با بیان بالاتر



(A)



(B)

نمودار شماره 3: مقایسه نسبی بیان LncRNA های HOTAIR (A) و MALAT-1 (B) اندازه‌گیری شده توسط تکنیک qRT-PCR در بیماران مبتلا به هموفیلی و گروه شاهد * : نمایانگر $P < 0/05$ است.

نتیجه محاسبه کمی بیان LncRNA ها با استفاده از نرم افزار REST در جدول شماره 3 نمایش داده شده است. مقایسه بین گروه‌های هموفیلی و گروه شاهد نشان داد که میانگین سطح بیان دو LncRNA در نمونه‌های هموفیلی A در مقایسه با نمونه‌های سالم، به طور قابل توجهی پایین‌تر بود ($P < 0/05$).

جدول شماره 3: نتیجه محاسبه کمی بیان LncRNA ها با استفاده از نرم‌افزار REST

MALAT-1	HOTAIR	
2/5	4/2	گروه شاهد
1/4	1/2	مبتلایان به هموفیلی A

بحث

در سال 2005 برای اولین بار اشکال متنوعی از RNA های غیرکدکننده مثل رونوشت‌های غیرکدکننده طویل (LncRNA) در سلول‌های پستانداران یافت شد. با انجام مطالعات گسترده‌تر، تعداد زیادی LncRNA با

HOTAIR، زمان بقای کلی فرد به طور قابل توجهی کوتاه تر از بیماران با بیان کم تر HOTAIR است (54). مطالعه ای در سال 2018 روی مبتلایان به سرطان دهانه رحم نیز نشان داد که سطوح پلاسمایی چهار LncRNA شامل HOTAIR، PVT1، XLOC_000303 و AL592284.1 به طور قابل توجهی نسبت به افراد سالم افزایش یافته است (55). هم چنین مشاهده شده که HOTAIR تومورزایی و پیشرفت سرطان دهانه رحم را با مکانیسم های مختلفی از جمله افزایش تکثیر سلولی، مهاجرت و تهاجم، مهار آپوپتوز سلولی، افزایش اتوفاژی سلولی، تحریر رگ زایی، تسریع پیشرفت چرخه سلولی و گذر از حالت اپی تلیالی به حالت مزانشیمی در روند سرطان، تسهیل می کند (56). در بین بیماری های خونی، تاکنون تنها بیماری تالاسمی از نظر تغییرات میزان بیان LncRNA مورد بررسی قرار گرفته است. در بیماران مبتلا به بتا تالاسمی بیان LncRNA های MIAT، MALAT1 و ANRIL اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که تمام LncRNA های مورد مطالعه به طور قابل توجهی در مقایسه با افراد سالم افزایش داشته است که می تواند بیانگر نقش احتمالی آن ها در پاتوفیزیولوژی یا پیشرفت تالاسمی بتا باشد (57). هموفیلی نیز یکی از شایع ترین بیماری های ارثی و همچنین یک مشکل بهداشت عمومی در جهان است. هیچ مطالعه ای در مورد سطح بیان MALAT-1 و HOTAIR در خون محیطی بیماران مبتلا به هموفیلی A وجود ندارد. در گذشته، مطالعه ای متمرکز بر دو LncRNA اختصاصی فاکتور VIII توسط گروه ما انجام شده است. نتایج نشان داد که سطوح بیان LncRNA های اختصاصی NONHSAT139215 و NONHSAT139219 نسبت به گروه شاهد، کاهش معنی دار داشته است ($P < 0/05$) (35). در پژوهش حاضر برای اولین بار ارتباط بین میزان بیان دو RNA غیر کد کننده طویل MALAT-1 و HOTAIR و بروز هموفیلی در بیماران ایرانی مبتلا به هموفیلی نوع A مورد

بررسی قرار گرفت. بیان این LncRNA ها با تکنیک qRT-PCR بررسی شد. نتایج حاصل از محاسبه کمی توسط نرم افزار REST، نشانگر کاهش بیان این LncRNA ها در نمونه های مبتلایان به هموفیلی شدید در مقایسه با گروه شاهد بود ($P < 0/05$) که ممکن است در بروز بیماری نقش داشته باشند. نتایج دو مطالعه ما (35) نشان داد که سطح بیان دو LncRNA اختصاصی فاکتور VIII و نیز MALAT-1 و HOTAIR در بیماران هموفیلی به طور مهمی کاهش یافتند. در حقیقت ابتدا به هموفیلی منجر به کاهش سطح بیان چهار LncRNA شده است. این مطالعه نشان داد که سطح بیان پایین LncRNA ها در موارد شدید هموفیلی نوع A ممکن است با کاهش سطح FVIII ($< 1 \text{ IU/dL}$) مرتبط باشد. این امکان وجود دارد که بیان LncRNA ها منجر به خاموش یا فعال شدن ژن (اثرات تنظیمی) شود. بر اساس یافته های مطالعه حاضر بیان پایین دو LncRNA در بیماران مبتلا به هموفیلی نوع A شدید ممکن است یک نشانگر زیستی قوی با کاربردهای بالینی بالقوه در پیش آگهی بیماری و همچنین یک هدف درمانی باشد. به هر حال، هموفیلی یک بیماری پیچیده، شامل میان کنش بالقوه بین ژن ها است. از این نظر، بررسی ارتباط بیان LncRNA های مورد مطالعه با نقایص مولکولی مختلف بیماری های خونریزی دهنده، در مطالعات آینده چه در جمعیت فعلی و/یا سایرین، ارزشمند است. علاوه بر این، مطالعات هم گروهی بزرگ تر برای ارائه داده های محکم و توجه این که آیا MALAT1 و HOTAIR می توانند به عنوان نشانگرهای زیستی جدید دخیل در بروز یا شدت بیماری عمل کنند، پیشنهاد می شود.

سپاسگزاری

از مدیر و همکاران محترم مرکز درمان جامع هموفیلی ایران، که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند سپاسگزاریم.

References

1. Franchini M, Mannucci PM. Past, present and future of hemophilia: a narrative review. *Orphanet J Rare Dis* 2012; 7(1): 1-8.
2. Roualdes O, Nougier C, Fretigny M, Talagrand E, Durand B, Negrier C, et al. Usefulness of an in vitro cellular expression model for haemophilia A carrier diagnosis: illustration with five novel mutations in the F8 gene in women with isolated factor VIII: C deficiency. *Haemophilia* 2015;21(3):e202-e209.
3. Ørom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, et al. Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* 2010; 143(1): 46-58.
4. Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 2009; 136(4): 629-641.
5. Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, et al. Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* 2011; 25(18): 1915-1927.
6. Chodroff RA, Goodstadt L, Sirey TM, Oliver PL, Davies KE, Green ED, et al. Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes. *Genome Biol* 2010; 11(7): 1-16.
7. Church DM, Goodstadt L, Hillier LW, Zody MC, Goldstein S, She X, et al. Lineage-specific biology revealed by a finished genome assembly of the mouse. *PLoS Biol* 2009; 7(5): e1000112.
8. Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest-and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* 2010; 3(107): ra8.
9. Statello L, Guo C-J, Chen L-L, Huarte M. Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2021; 22(2): 96-118.
10. Lee JT, Bartolomei MS. X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* 2013; 152(6): 1308-1323.
11. Klattenhoff CA, Scheuermann JC, Surface LE, Bradley RK, Fields PA, Steinhauser ML, et al. Braveheart, a long noncoding RNA required for cardiovascular lineage commitment. *Cell* 2013; 152(3): 570-583.
12. Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, et al. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet* 2011; 43(7): 621-629.
13. Cabianca DS, Casa V, Bodega B, Xynos A, Ginelli E, Tanaka Y, et al. A long ncRNA links copy number variation to a polycomb/trithorax epigenetic switch in FSHD muscular dystrophy. *Cell* 2012; 149(4): 819-831.
14. Meola N, Pizzo M, Alfano G, Surace EM, Banfi S. The long noncoding RNA Vax2os1 controls the cell cycle progression of photoreceptor progenitors in the mouse retina. *Rna* 2012; 18(1): 111-123.
15. Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071-1076.
16. Guttman M, Rinn JL. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* 2012; 482(7385): 339-346.
17. Cesana M, Cacchiarelli D, Legnini I, Santini T, Sthandier O, Chinappi M, et al. A long

- noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell* 2011; 147(2): 358-369.
18. Wapinski O, Chang HY. Corrigendum: Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 2011; 21(10): 354-561.
 19. Chen G, Wang Z, Wang D, Qiu C, Liu M, Chen X, et al. LncRNADisease: a database for long-non-coding RNA-associated diseases. *Nucleic Acids Res* 2012; 41(D1): D983-D986.
 20. Jiang MC, Ni JJ, Cui WY, Wang BY, Zhuo W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am J Cancer Res* 2019; 9(7): 1354-1366.
 21. Rodríguez-Malavé NI, Rao DS. Long noncoding RNAs in hematopoietic malignancies. *Brief Funct Genom* 2016; 15(3): 227-238.
 22. Carpenter S, Aiello D, Atianand MK, Ricci EP, Gandhi P, Hall LL, et al. A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science* 2013; 341(6147): 789-792.
 23. Gao J, Wang F, Wu P, Chen Y, Jia Y. Aberrant LncRNA expression in leukemia. *J Cancer* 2020; 11(14): 4284.
 24. Yang FU, Zhang L, Huo Xs, Yuan Jh, Xu D, Yuan Sx, et al. Long noncoding RNA high expression in hepatocellular carcinoma facilitates tumor growth through enhancer of zeste homolog 2 in humans. *Hepatology* 2011; 54(5): 1679-1689.
 25. Yu G, Yao W, Wang J, Ma X, Xiao W, Li H, et al. LncRNAs expression signatures of renal clear cell carcinoma revealed by microarray. *PLoS One* 2012; 7(8): e42377.
 26. Xu H, Wang L, Jiang X. Silencing of lncRNA DLEU1 inhibits tumorigenesis of ovarian cancer via regulating miR-429/TFAP2A axis. *Mol Cell Biochem* 2021; 476(2): 1051-1056.
 27. Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 2010; 329(5992): 689-693.
 28. Wang Y-L, Chang L-C, Chen K-B, Wang S-C. Aptamer-guided targeting of the intracellular long-noncoding RNA HOTAIR. *Am J Cancer Res* 2021; 11(3): 945-954.
 29. Alvarez-Dominguez JR, Hu W, Yuan B, Shi J, Park SS, Gromatzky AA, et al. Global discovery of erythroid long noncoding RNAs reveals novel regulators of red cell maturation. *Blood* 2014; 123(4): 570-581.
 30. Ahmadi A, Kaviani S, Yaghmaie M, Pashaiefar H, Ahmadvand M, Jalili M, et al. Altered expression of MALAT1 lncRNA in chronic lymphocytic leukemia patients, correlation with cytogenetic findings. *Blood Res* 2018; 53(4): 320-324.
 31. Sun Y, Ma L. New insights into long non-coding RNA MALAT1 in cancer and metastasis. *Cancers* 2019; 11(2): 216.
 32. Angelopoulou E, Paudel YN, Piperi C. Critical role of HOX transcript antisense intergenic RNA (HOTAIR) in gliomas. *J Mol Med (Berl)* 2020; 98(11): 1525-1546.
 33. Rajagopal T, Talluri S, Akshaya RL, Dunna NR. HOTAIR LncRNA: a novel oncogenic propellant in human cancer. *Clin Chim Acta* 2020; 503: 1-18.
 34. Yuan C, Ning Y, Pan Y. Emerging roles of HOTAIR in human cancer. *J Cell Biochem* 2020; 121(5-6): 3235-3247.
 35. Naderi N, Namvar A, Amani N, Nasoohi N, Bolhassani A. Analysis of long non-coding RNA expression in hemophilia A patients. *Hematology* 2019; 24(1): 255-262.
 36. Fallah P, Molaie M, Ehsan Heidari A, Soleimani M, Jahedi Zargar M, Arefian E, et

- al. HOTAIR expression in newly diagnosed Acute Lymphoblastic Leukemia pateints. Scientific Journal of Iran Blood Transfus Organ 2018; 15(1): 28-35.
37. AghamohammadhosseinTajrishi M, Atashi A, Soleimani M, Sajjadi E, Fallah P, Kaviani S, et al. Evaluating the Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR in Patients with Chronic Myeloid Leukemia. J Adv Med Biomed Res 2017; 25(111): 57-66.
 38. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res 2001; 29(9): e45.
 39. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. Nucleic Acids Res 2002; 30(9): e36.
 40. Brosius J. Waste not, want not—transcript excess in multicellular eukaryotes. TRENDS in Genetics 2005; 21(5): 287-288.
 41. Spizzo R, Almeida Mle, Colombatti A, Calin GA. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? Oncogene 2012; 31(43): 4577-4587.
 42. Harries LW. Long non-coding RNAs and human disease. Biochem Soc Trans 2012; 40(4): 902-906.
 43. Sparber P, Filatova A, Khantemirova M, Skoblov M. The role of long non-coding RNAs in the pathogenesis of hereditary diseases. BMC Medical Genomics 2019; 12(Suppl2): 63-78.
 44. Tørring PM, Larsen MJ, Kjeldsen AD, Ousager LB, Tan Q, Brusgaard K. Long non-coding RNA expression profiles in hereditary haemorrhagic telangiectasia. PloS One 2014; 9(3): e90272.
 45. Fernandes JCR, Acuña SM, Aoki JI, Floeter-Winter LM, Muxel SM. Long non-coding RNAs in the regulation of gene expression: physiology and disease. Noncoding RNA 2019; 5(1): 17.
 46. Chen R, Liu Y, Zhuang H, Yang B, Hei K, Xiao M, et al. Quantitative proteomics reveals that long non-coding RNA MALAT1 interacts with DBC1 to regulate p53 acetylation. Nucleic Acids Res 2017; 45(17): 9947-9959.
 47. Goyal B, Yadav SRM, Awasthee N, Gupta S, Kunnumakkara AB, Gupta SC. Diagnostic, prognostic, and therapeutic significance of long non-coding RNA MALAT1 in cancer. Biochim Biophys Acta Rev Cancer 2021; 1875(2): 188502.
 48. Wang WW, Zhou XL, Song YJ, Yu CH, Zhu WG, Tong YS. Combination of long noncoding RNA MALAT1 and carcinoembryonic antigen for the diagnosis of malignant pleural effusion caused by lung cancer. Onco Targets Ther 2018; 11: 2333-2344.
 49. Amodio N, Raimondi L, Juli G, Stamato MA, Caracciolo D, Tagliaferri P, et al. MALAT1: a druggable long non-coding RNA for targeted anti-cancer approaches. J Hematol Oncol 2018; 11(1): 63.
 50. Wu Y, Liu J, Zheng Y, You L, Kuang D, Liu T. Suppressed expression of long non-coding RNA HOTAIR inhibits proliferation and tumorigenicity of renal carcinoma cells. Tumor Biol 2014; 35(12): 11887-11894.
 51. Elsayed ET, Salem PE, Darwish AM, Fayed HM. Plasma long non-coding RNA HOTAIR as a potential biomarker for gastric cancer. Int J Biol Markers 2018; 33(4): 528-533.
 52. Lu R, Zhang J, Zhang W, Huang Y, Wang N, Zhang Q, et al. Circulating HOTAIR expression predicts the clinical response to neoadjuvant chemotherapy in patients with breast cancer. Cancer Biomark 2018; 22(2): 249-256.

53. Tan SK, Pastori C, Penas C, Komotar RJ, Ivan ME, Wahlestedt C, et al. Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme. *Mol Cancer* 2018; 17(1): 74
54. Liu Xh, Liu Zl, Sun M, Liu J, Wang Z-x, De W. The long non-coding RNA HOTAIR indicates a poor prognosis and promotes metastasis in non-small cell lung cancer. *BMC Cancer* 2013; 13: 464.
55. Sun W, Wang L, Zhao D, Wang P, Li Y, Wang S. Four circulating long non-coding RNAs act as biomarkers for predicting cervical cancer. *Gynecol Obstet Invest* 2018; 83(6): 533-539.
56. Zhou YH, Cui YH, Wang T, Luo Y. Long non-coding RNA HOTAIR in cervical cancer: Molecular marker, mechanistic insight, and therapeutic target. *Adv Clini Chem* 2020; 97: 117-140.
57. Fakhr-Eldeen A, Toraih EA, Fawzy MS. Long non-coding RNAs MALAT1, MIAT and ANRIL gene expression profiles in beta-thalassemia patients: A cross-sectional analysis. *Hematology* 2019; 24(1): 308-317.