

Changes in Expression of miR-1297 and PTEN Tumor Suppressor Gene in T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia

Malihe Bagheri¹,
Ghasem Mosayebi²,
Mahdieh Mondanizadeh³

¹ MSc in Biotechnology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

² Professor, Department of Microbiology and Immunology, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

³ Assistant Professor, Department of Biotechnology and Molecular Medicine, Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran

(Received June 7, 2020 ; Accepted November 1, 2020)

Abstract

Background and purpose: T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a type of blood malignancy caused by changes in the precursors of T lymphocyte cells. The PTEN gene is one of the most common tumor suppressor genes that mutates in most human cancers, including T-ALL. Therefore, it is important to identify miRNAs that target the PTEN gene in T-ALL. For this purpose, in the present study, miRNAs targeting PTEN gene in T-ALL patients were examined.

Materials and methods: The miRNAs targeting PTEN was predicted and selected using bioinformatics. A total of 40 plasma samples were collected from T-ALL patients and healthy individuals. After RNA extraction and synthesis of cDNA, the expression levels of predicted miRNA and PTEN were assessed by Real time PCR in REST 2009. Statistical analysis was performed in SPSS V16 and $P < 0.05$ were considered significant.

Results: Bioinformatics showed that miR-1297 target the PTEN gene. Compared to healthy individuals, in T-ALL patients, the expression levels of miR-1297 and PTEN gene in the plasma significantly increased (45.93, $P = 0.001$) and decreased (0.191, $P = 0.001$), respectively.

Conclusion: The present study showed that miR-1297 is likely to target the PTEN gene. Therefore, miR-1297 could serve as a new and non-invasive biomarker in diagnosis and treatment of T-ALL.

Keywords: T-ALL, PTEN, miRNA, biomarker

J Mazandaran Univ Med Sci 2021; 30 (192): 24-34 (Persian).

* Corresponding Author: Mahdieh Mondanizadeh- Faculty of Medicine, Arak University of Medical Sciences, Arak, Iran
(E-mail: M_mondanizadeh@yahoo.com)

بررسی تغییرات بیان miR-1297 و ژن سرکوبگر تومور PTEN در لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T

ملیحه باقری¹قاسم مسیبی²مهدیه موندنی زاده³

چکیده

سابقه و هدف: لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T (T-ALL) نوعی بدخیمی خونی است که در اثر بروز تغییرات در پیش‌سازهای سلول‌های لنفوسیت T ایجاد می‌گردد. ژن PTEN یکی از شایع‌ترین ژن‌های سرکوبگر تومور است که در اکثر سرطان‌های انسانی از جمله T-ALL دچار جهش می‌شود. از این رو شناسایی miRNA هایی که ژن PTEN را در T-ALL هدف‌گیری می‌کنند، بسیار حائز اهمیت است. بدین منظور، در مطالعه حاضر، miRNA های هدف‌گیرنده ژن PTEN در بیماران T-ALL مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: miRNA های هدف‌گیرنده ژن PTEN با استفاده از پایگاه‌های بیوانفورماتیکی پیشگویی و انتخاب گردید. در مجموع 40 نمونه پلاسما از بیماران T-ALL و افراد سالم جمع‌آوری گردید. پس از استخراج RNA و ساخت cDNA، میزان بیان miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN به‌وسیله Real time PCR در REST 2009 ارزیابی گردید. آنالیزهای آماری با نرم‌افزار SPSS نسخه 16 انجام و مقادیر $P < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها: نتایج بیوانفورماتیک نشان داد که miR-1297 ژن PTEN را هدف‌گیری می‌کند. میزان بیان miR-1297 و ژن PTEN در پلاسمای بیماران T-ALL نسبت به افراد سالم به ترتیب به‌طور قابل توجهی افزایش (45/93، $P=0/001$) و کاهش (0/191، $P=0/001$) داشت.

استنتاج: نتایج مطالعه حاضر نشان داد که miR-1297 احتمالاً ژن PTEN را هدف‌گیری می‌کند. بنابراین، مطالعه حاضر پیشنهاد می‌کند که miR-1297 می‌تواند احتمالاً به عنوان یک بیومارکر جدید و غیرتهاجمی در تشخیص و درمان T-ALL به کار برده شود.

واژه‌های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T، PTEN، miRNA، بیومارکر

مقدمه

را به ترتیب در کودکان و بزرگسالان تشکیل می‌دهد و شایع‌ترین لوسمی در کودکان محسوب می‌شود (2). T-ALL از نظر بالینی با شمارش بالای گلبول‌های سفید خون، افزایش تعداد سلول‌های بلاست و لنفادنوپاتی

لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T (T-ALL) نوعی بدخیمی خونی است که سلول‌های لنفوسیت T را تحت تاثیر قرار می‌دهد و روندی حاد دارد (1). این لوسمی 15 و 25 درصد از کل موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL)

E-mail: M_mondanizadeh@yahoo.com

مؤلف مسئول: مهدیه موندنی زاده - اراک: دانشگاه علوم پزشکی اراک، دانشکده پزشکی

1. کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

2. استاد، گروه میکروبی‌شناسی و ایمنی‌شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

3. استادیار، گروه زیست فناوری پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی اراک، اراک، ایران

تاریخ دریافت: 1399/3/18 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1399/4/1 تاریخ تصویب: 1399/8/11

قابل تشخیص است (3). اگر چه این لوسمی بیش تر در تیموس ایجاد می گردد، اما قابلیت انتشار به سراسر بدن از جمله سیستم عصبی مرکزی را نیز دارا می باشد (4). T-ALL یک اختلال هتروژن است که در پیدایش آن فاکتورهای متعددی از جمله فاکتورهای ژنتیکی و محیطی نقش دارند (5,6). از نظر ژنتیکی، این لوسمی در اثر ایجاد جهش های متعدد و تغییر در بیان فاکتورهای رونویسی در طی تکامل سلول های لنفوسیت T به وجود می آید و سبب عدم تنظیم تکامل سلول های لنفوسیت T و به دنبال آن تمایز و تکثیر کنترل نشده این سلول ها می گردد (1). این روند می تواند منجر به فعال شدن نابجای چندین مسیر پیام رسانی گردد (7). از این رو شناسایی و ارزیابی مولکول های دخیل در این مسیرها که بیان آن ها نسبت به حالت نرمال دستخوش تغییر شده اند، می تواند امکان ایجاد روش های جدید و موثر را برای تشخیص و درمان این لوسمی فراهم نماید. یکی از این مولکول ها، فسفاتاز و تنسین همولوگ (PTEN) در مسیر پیام رسانی PI3K/AKT است (8). ژن PTEN که با نام های MMAC1 و TEP1 نیز شناخته می شود، یکی از شایع ترین ژن های سرکوبگر تومور است که بر روی بازوی بزرگ کروموزوم شماره 10 (10q23) قرار گرفته است (9). پروتئین PTEN یک اینوزیتول لیپید فسفاتاز است که سبب دفسفریله شدن فسفاتیدیل اینوزیتول 5,4,3 تری فسفات (PIP3) به فسفاتیدیل اینوزیتول 5,4 دی فسفات (PIP2) می شود. دفسفریله شدن PIP3 سبب غیرفعال شدن پروتئین کیناز B یا AKT و در نتیجه مهار مسیر پیام رسان PI3K/AKT می گردد. به عبارت دیگر، PTEN از طریق دفسفریله کردن PIP3 به عنوان تنظیم کننده منفی مسیر PI3K/AKT عمل می نماید (10). این مسیر پیام رسان نقش مهمی را در کنترل فرایندهای متعددی از جمله رشد، تکثیر، بقا و تحرک سلولی، متابولیسم، آنژیوژنز و آپوپتوز ایفا می کند و فعال سازی نابجای آن در T-ALL گزارش شده است (11-13). مطالعات متعددی حاکی از غیرفعال شدن ژن PTEN در اثر ایجاد

جهش یا حذف کروموزومی در رده های سلولی T-ALL انسانی و نمونه های اولیه از بیماران مبتلا به این لوسمی می باشد (14,15). علاوه بر این، ژن PTEN در اکثر سرطان های انسانی از جمله گلیوبلاستوما، ملانوما، اندومتریال، پروستات، سینه، کولورکتال و تیروئید از طریق ایجاد جهش های سوماتیک، خاموش شدن ژن، تغییرات اپی ژنتیکی و همچنین مدیفیکاسیون های پس از ترجمه شامل فسفریلاسیون، اکسیداسیون، استیلاسیون و یوبی کوئیناسیون غیرفعال می گردد (16-18). در کنار نقش ژن سرکوبگر تومور PTEN، مطالعات اخیر نشان داده اند که میکرو RNA ها (miRNAs) به عنوان RNA های کوچک غیر کد کننده، از طریق اتصال به ناحیه 3'UTR مولکول mRNA ژن هدف، سبب تنظیم بیان ژن در مرحله بعد از رونویسی می شوند (19). این مولکول ها فرایندهای مختلف سلولی از جمله رشد، تکثیر، تمایز، چرخه سلولی و آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می دهند (20). شواهد مختلف نشان داده اند که بیان miRNA ها در بافت های مختلف متغیر است و پروفایل بیانی آن ها در حالت بیماری از جمله سرطان ها تغییر می کند (21). علاوه بر این، miRNA ها در سرم و پلاسما پدیدارند و در هر سرطان پروفایل های بیانی ویژه ای ارائه می دهند (22). بدین ترتیب، این مولکول ها این احتمال را ایجاد می کنند که شاید بتوانند به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی در تشخیص و درمان سرطان های مختلف از جمله T-ALL مورد استفاده قرار گیرند (23). در این راستا مطالعات متعدد صورت گرفته حاکی از افزایش بیان miR-20a، miR-92 و miR-19b و کاهش بیان miR-200 و miR-29 در T-ALL می باشد (24,25). بنابراین، در این مطالعه با توجه به نقش مهم مولکول PTEN در T-ALL و همچنین اهمیت اثر تنظیمی miRNA ها در بسیاری از فرایندهای سلولی، به پیشگویی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیک مختلف پرداخته شد. همچنین، میزان بیان miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN در نمونه پلاسمای

افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم با کمک روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش ها

جمع آوری نمونه پلاسما از بیماران و افراد سالم در این مطالعه تجربی، پس از اخذ رضایتنامه آگاهانه، از 40 فرد سالم به عنوان گروه کنترل و 40 فرد مبتلا به T-ALL نمونه خون محیطی از بیمارستان حضرت ولیعصر (عج) اراک جمع آوری گردید. همه افراد بیمار، توسط یک پزشک متخصص انکولوژیک با طبقه بندی FAB به عنوان ALL شناسایی شدند و با روش فلوسایتومتری (وجود آنتی ژن های CD34، CD7، CD2، CD52 و عدم وجود آنتی ژن های میلونیدی از جمله CD33 و CD117) در طبقه بندی T-ALL قرار گرفتند. همچنین، گروه بیماران در این مطالعه، تحت هیچ روش درمانی از جمله شیمی درمانی، رادیوتراپی و جراحی قرار نگرفته بودند. در هر دو گروه بیماران و افراد سالم، 20 مرد و 20 زن وجود داشت. در گروه بیماران میانگین سنی 45 سال با رنج 29-71 سال و در گروه افراد سالم میانگین سن 39 سال با رنج 26-65 سال بود (جدول شماره 1). نمونه خون محیطی از هر دو گروه جمع آوری شد و پلاسما جدا گردید. نمونه پلاسمای تهیه شده برای ادامه کار در دمای 70- درجه سانتی گراد قرار داده شد. این مطالعه در کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی اراک مطابق با بیانیه هلسینکی با کد اخلاق IR.ARAKMU.REC.1396.253 تصویب گردید.

آنالیزهای بیوانفورماتیک

اخذ توالی ژن PTEN از بانک جهانی ژنی NCBI توالی مربوط به ژن PTEN با استفاده از سایت NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) اخذ گردید. بدین صورت که ابتدا در پایگاه داده Gene نام ژن مورد نظر با نماد رسمی PTEN مورد جستجو قرار گرفت و سپس توالی ژن PTEN با شماره دسترسی NC_000010.11 (توالی 87863625 تا 87971930) با

فرمت FASTA دریافت گردید. پیشگویی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN از پایگاه های بیوانفورماتیک

به منظور پیشگویی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN پایگاه های بیوانفورماتیک متعددی از جمله ¹miRanda، ²PicTar، ³TargetScan، ⁴DIANA، ⁵miRDB و ⁶مورد استفاده قرار گرفت. نتایج دریافت شده از هر سایت به ترتیب بر اساس بالاتر بودن امتیاز هر miRNA در فایل Excel ذخیره گردید و سپس از میان داده های به دست آمده، miRNA های با امتیاز بالاتر و اتصال بهتر با ژن هدف انتخاب و گردآوری شدند. سپس از بین آن ها، miRNA که بیشترین تکرار و امتیاز را در پایگاه های مورد مطالعه داشت به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن PTEN جهت بررسی در فاز مطالعه عملی این پژوهش انتخاب گردید.

جدول شماره 1: مشخصات دموگرافیک و خون شناسی مربوط به گروه بیماران مبتلا به T-ALL و گروه کنترل

متغیر	گروه بیماران		گروه کنترل (افراد سالم)	
	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)	تعداد (درصد)
جنس	زن 20 (50)	مرد 20 (50)	زن 20 (50)	مرد 20 (50)
سن	میانگین 45	39	میانگین 39	45
رنج	29-71	26-65	29-71	26-65
خون محیطی	میانگین تعداد گلبول های سفید $10^9/L \times$ 47/2	5/2	میانگین غلظت هموگلوبین gr/L 9/8	14/7
	میانگین تعداد پلاکت $10^9/L \times$ 94	281		

طراحی پرایمرها

در این مطالعه، سه نوع پرایمر از جمله پرایمرهای ساقه -حلقه (Stem-loop) برای ساخت cDNA از miRNA، پرایمرهای رندوم هگزامر برای ساخت cDNA از mRNA مربوط به ژن PTEN و پرایمرهای اختصاصی برای بررسی های کمی میزان بیان miRNA پیشگویی شده و همچنین ژن PTEN مورد استفاده قرار گرفت (جدول شماره 2 و 3). توالی miRNA پیشگویی

- <http://www.microrna.org>
- <http://www.mirbase.org>
- <https://pictar.mdc-berlin.de/>
- <http://www.TargetScan>
- http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=miroT_CDS/index
- <http://www.mirdb.org>

جدول شماره 2: توالی پرایمرهای ساقه حلقه در فرایند ساخت cDNA

نام miRNA	توالی پرایمرهای ساقه حلقه
miR-1297	5'-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTCGATACGACCACTGA-3'
miR-103	5'-GTCGTATCGAGAGCAGGGTCCGAGGTATTTCGACTCGATACGACCAAGGCA-3'

جدول شماره 3: توالی پرایمرهای اختصاصی در Real time PCR

نام	Forward	Reverse
miR-1297	5'-TTCAAGTAATTCAGGTG-3'	5'-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3'
miR-103	5'-GCTTCTTTACAGTGCTGCC-3'	5'-AGAGCAGGGTCCGAGGT-3'
PTEN	5'-GACTTAGACTTGACCTATATTATTC-3'	5'-CACAAAGATTGTATATCTTGTAAATGG-3'
GAPDH	5'-GGAGTCCACTGGCGTCTTCAC-3'	5'-GAGGCATTGCTGATGATCTTGAGG-3'

ساخته شده برای ادامه کار در دمای 70- درجه سانتی گراد نگهداری گردید.

جدول شماره 4: برنامه دمایی - زمانی استفاده شده در دستگاه ترموسایکلر در فرایند ساخت cDNA از miRNA و mRNA

زمان	دما
15 دقیقه	25 °C
15 دقیقه	37 °C
45 دقیقه	42 °C
10 دقیقه	75 °C

واکنش Real time PCR

برای سنجش میزان بیان نسبی miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN تکنیک Real time PCR مورد استفاده قرار گرفت. در این روش مخلوط واکنش در یک حجم 15 میکرولیتر شامل 7/8 میکرولیتر SYBR Green PremixExRaq II (یکتا تجهیز، ایران)، 1/5 میکرولیتر cDNA، 0/3 میکرولیتر از هر کدام از پرایمرهای اختصاصی F و R و 5/1 میکرولیتر آب RNase-DNase free تهیه و برنامه دمایی - زمانی آن در دستگاه Light cycle 96 (Roche، آلمان) تنظیم گردید (جدول شماره 5). به منظور سنجش بیان نسبی miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN، بیان آن‌ها به ترتیب با بیان کنترل‌های داخلی miR-103 و GAPDH مقایسه گردید. واکنش به صورت تکرارهای سه تایی برای همه نمونه‌ها صورت گرفت. پس از انجام واکنش داده‌های خام به صورت سیکل آستانه (Ct) از دستگاه استخراج و سنجش میزان بیان نسبی miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN در بیماران مبتلا به T-ALL و نمونه‌های افراد سالم با برنامه REST 2009 انجام گردید.

شده از سایت miRbase و توالی ژن PTEN از سایت NCBI گرفته شد و سپس با کمک نرم افزارهای AlleleID7 و GeneRunner طراحی پرایمرها صورت گرفت. همچنین به منظور بررسی اختصاصیت محل اتصال پرایمرها از نرم افزار NCBI BLASTn استفاده گردید. ژن GAPDH و miR-103 برای نرمال سازی نتایج حاصل از Real time PCR مورد استفاده قرار گرفتند.

استخراج mRNA و miRNA از پلاسمای بیماران و نمونه‌های کنترل و ساخت cDNA

استخراج mRNA و miRNA از تمام نمونه‌های پلاسمای، با استفاده از کیت RNX Plus (شرکت سینا کلون) طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام گردید. کنترل کیفیت و کمیت (غلظت) RNA های استخراج شده با دستگاه نانودراپ (EPOCH2، آمریکا) مورد سنجش قرار گرفت. سپس با استفاده از واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR) ساخت cDNA صورت گرفت، به طوری که در ابتدا 1 میکروگرم RNA استخراج شده با یک میکرومولار پرایمر ساقه - حلقه (برای miRNA) یا پرایمر رندوم هگزامر (برای mRNA) مخلوط گردید و با آب RNase-DNase free به حجم رسانده شد. مخلوط حاصل به مدت 5 دقیقه در دمای 75 درجه سانتی گراد انکوبه و پس از آن، آنزیم رونویسی معکوس M-MLV (Vivantis, Malaysia)، بافر 1X و dNTP به آن اضافه گردید و مطابق با برنامه دمایی - زمانی مشخصی در دستگاه ترموسایکلر (Eppendorf، آلمان) تحت انکوباسیون قرار گرفت (جدول شماره 4).

جدول شماره 5: برنامه دمایی - زمانی استفاده شده در دستگاه 96 Light cycle برای واکنش های کمی Real-time PCR برای miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN

مرحله	دما	زمان	تعداد سیکل
فعال شدن آنزیم	95 °C	3 دقیقه	1
تکثیر	95 °C	10 ثانیه	
اتصال و طولی سازی	54 °C (miRNA) 52 °C (PTEN)	10 ثانیه (miRNA) 15 ثانیه (PTEN)	40
قنات فلورسانس	72 °C	15 ثانیه (miRNA) 25 ثانیه (PTEN)	
منحنی ذوب	95 °C 65 °C 95 °C	60 ثانیه 10 ثانیه 1 ثانیه	1
خک سازی	40 °C	30 ثانیه	1

آنالیز آماری داده ها

برای آنالیز داده های به دست آمده از واکنش Real time PCR برنامه 2009 REST استفاده گردید. همچنین، کلیه داده های آزمایشگاهی توسط نرم افزار SPSS نسخه 16 آنالیز گردید و مقادیر P کوچک تر از 0/05 به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد.

یافته ها

در گروه بیماران میانگین سنی 45 سال با رنج 29-71 سال و در گروه افراد سالم میانگین سن 39 سال با رنج 26-65 سال بود (جدول شماره 1).

جدول شماره 6: نحوه گزینش miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN

جمع	miRDB	DIANA	TargetScan	PicTar	miRbase	miRanda	miRNA	نام ژن
5	1	1	1	0**	1	1*	miR-1297	PTEN
3	1	1	0	0	0	1	miR-590-3p	PTEN
3	0	0	0	1	1	1	miR-19a	PTEN

*: اتصال miRNA مورد نظر به ژن هدف توسط پایگاه بیوانفورماتیکی تایید شده است.

** : اتصال miRNA مورد نظر به ژن هدف توسط پایگاه بیوانفورماتیکی تایید نشده است.

جدول شماره 7: امتیازات به دست آمده از پایگاه های بیوانفورماتیکی برای miR-1297

miRDB **** (Target score)	DIANA *** (miTG score)	TargetScan ** (Pct)	miRbase (Score)	miRanda (mirSVR score) *	miRNA
100	0/999	0/73	85	-0/1517	Has-miR-1297

*: امتیاز رگرسیون پشتیبانی وکتور miRNA (miRNA support vector regression score): هر چه این امتیاز به صفر نزدیکتر باشد میزان پیشگویی به شدت افزایش می یابد (26).

** : احتمال هدف گذاری محافظت شده (Probability of conserved targeting) (27).

***: امتیاز ژن هدف (miRNA target gene score): هر چه این امتیاز بالاتر باشد احتمال هدف گیری بیشتر است.

****: هر چه این امتیاز بالاتر باشد اعتماد بیشتری به پیشگویی می توان نمود. اگر این امتیاز بالاتر از 80 باشد به احتمال زیاد پیشگویی واقعی است ولی اگر کمتر از 60 باشد توصیه می شود مدارک و شواهد پشتیبان دیگری نیز استفاده گردد.

نتایج حاصل از پیشگویی بیوانفورماتیکی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN

نتایج حاصل از پیشگویی در پایگاه های بیوانفورماتیکی DIANA, TargetScan, PicTar, miRbase, miRanda و miRDB نشان داد، که سه miRNA از جمله miR-1297، miR-590-3p و miR-19a توانایی اتصال به ژن PTEN را دارند (جدول شماره 6). اما از بین این سه miRNA تنها miR-1297 بیشترین تکرار و امتیاز را در پایگاه های مورد مطالعه داشت (جدول شماره 7). به همین دلیل miR-1297 با شماره دسترسی MIMAT0005886 به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن PTEN انتخاب و در فاز مطالعه عملی این پژوهش مورد استفاده واقع گردید.

نتایج حاصل از سنجش میزان نسبی miR-1297 و ژن PTEN

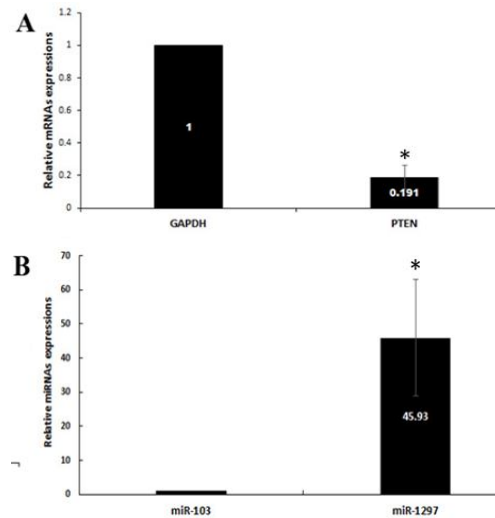
نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که میزان بیان نسبی miR-1297 در پلاسمای افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی افزایش داشت (تصویر شماره 1B) و این افزایش بیان، معنی دار بود (P=0/001، 45/93). میزان بیان نسبی ژن PTEN در پلاسمای افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم به طور قابل توجهی کاهش داشت (تصویر شماره 1A) و این کاهش بیان نیز معنی دار بود (P=0/001، 0/191).

حائز اهمیت است. به طوری که این miRNA ها احتمالاً می توانند به عنوان بیومارکرهای غیرتهاجمی در تشخیص و درمان T-ALL مفید واقع شوند (23).

لذا در این مطالعه با توجه به نقش کلیدی ژن PTEN در T-ALL، این ژن به عنوان گزینه مناسب برای مطالعات بیوانفورماتیکی به منظور یافتن miRNA های هدف گیرنده آن انتخاب گردید. از این رو در مطالعه حاضر، در گام نخست به پیشگویی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN با استفاده از نرم افزارهای بیوانفورماتیکی مختلف پرداخته شد. سپس، میزان بیان miRNA پیشگویی شده و ژن PTEN در نمونه پلاسمای افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم با کمک روش Real time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج حاصل از پیشگویی های بیوانفورماتیکی نشان داد که سه miRNA از جمله miR-1297، miR-590-3p و miR-19a می توانند ژن PTEN را هدف گیری نمایند، اما از بین آن ها miR-1297 بیشترین تکرار و امتیاز را در پایگاه های بیوانفورماتیکی مورد مطالعه داشت و به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن PTEN در فاز مطالعه عملی این پژوهش انتخاب گردید. مطالعات گسترده ای به بررسی miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN در انواع مختلف سرطان ها پرداخته اند. چندین مطالعه نشان داده اند که miR-20b، miR-524، miR-130b و miR-130b به عنوان miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN به ترتیب در هپاتوسلولار کارسینوما، استئوسارکوما و سرطان سینه عمل می نمایند (31-33).

مطالعه ای از Zou و همکارانش نیز miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN را در افراد مبتلا به لوسمی لنفوسیتی مزمن مورد بررسی قرار داد. نتایج آن ها نشان داد که شش miRNA از جمله miR-19a، miR-21، miR-26a، miR-26b، miR-214 و miR-1297 می توانند ژن PTEN را هدف گیری نمایند (34). علاوه بر این، مطالعه ای دیگر نشان داد که miR-20b-5p و miR-363-3p به عنوان miRNA های هدف گیرنده ژن PTEN در



نمودار شماره 1: نتایج حاصل از سنجش میزان بیان نسبی تصویر ژن PTEN (1A) و miR-1297 (1B)

نتایج با سه بار آزمایش مستقل و به صورت $\text{mean} \pm \text{SE}$ نشان داده شده اند و نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل به صورت مقادیر $P < 0/05$ به عنوان سطح معنی دار در نظر گرفته شد ($P \leq 0/05$).

بحث

لوسمی لنفوبلاستیک حاد سلول T نوعی بدخیمی خونی تهاجمی و پیشرونده است که در اثر بروز تغییرات در پیش سازهای سلول های لنفوسیت T ایجاد می گردد (28). رویکردهای درمانی در T-ALL به ویژه در کودکان در طی ده سال گذشته پیشرفت های قابل توجهی داشته است اما تعداد بالای عودهای اولیه که در بیش تر قسمت ها مقاومت به درمان را نشان داده اند، درمان این لوسمی را با مشکل روبه رو کرده است (29). به طور کلی، می توان اظهار داشت که تشخیص و درمان T-ALL همچنان به عنوان یک چالش باقی مانده است (30). از این رو، شناسایی بیومارکرهای جدید با ویژگی و حساسیت بالا در تشخیص و درمان T-ALL امری ضروری است. به نظر می رسد شناسایی miRNA هایی که ژن های کلیدی را در مسیر پاتوژنز T-ALL هدف گیری می کنند، بسیار

سلول‌های T-ALL هستند (35). از این رو با توجه به این که در مطالعه حاضر ژن PTEN به عنوان ژن احتمالی هدف گیرنده miR-1297 معرفی شده است و نظر به معرفی چندین miRNA دیگر در مطالعات پیشین، لذا شایسته است که در تحقیقات آتی کارایی بیش تر این بیومارکرها در شناسایی T-ALL مورد بررسی و مقایسه قرار گیرند. نتایج حاصل از Real time PCR در مطالعه حاضر نشان داد که سطح پلاسمایی miR-1297 در پلاسمای افراد مبتلا به T-ALL به طور قابل توجهی بالاتر از افراد سالم بود. میزان بیان نسبی miR-1297 در افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم افزایش داشت که این افزایش بیان معنی دار بود ($P=0/001$, 45/93). در حالی که میزان بیان نسبی ژن PTEN به اندازه 5/23 برابر در افراد مبتلا به T-ALL در مقایسه با افراد سالم کاهش را نشان داد که این کاهش بیان نیز معنی دار بود ($P=0/001$). این نتایج نشان دهنده وجود یک ارتباط منفی بین افزایش بیان miR-1297 و کاهش بیان ژن PTEN است و می تواند حاکی از این باشد که احتمالاً miR-1297 به عنوان یک انکوژن، ژن سرکوبگر تومور PTEN را هدف قرار می دهد. miR-1297 یکی از miRNA مرتبط با سرطان است که نقش مهمی را در پاتوژنز سرطان های انسانی ایفا می کند (36، 37)، اختلال در بیان این miRNA در انواع سرطان های انسانی گزارش شده است (38). بیان و عملکرد miR-1297 منحصر به هر سلول و بافت است، به طوری که بیان miR-1297 در سرطان های کولورکتال، پانکراس و آدنوکارسینومای ریه کاهش و در سرطان های حنجره و سینه افزایش می یابد (38-42). عملکرد miR-1297 بسته به نوع سرطان

متفاوت است و می تواند در سرطان های مختلف به عنوان انکوژن یا سرکوبگر تومور عمل نماید (38). miR-1297 به عنوان انکوژن سبب القای تکثیر، مهاجرت و تومورزایی در سلول های سرطانی حنجره و بیضه می گردد (43-40). در حالی که همین miRNA می تواند به عنوان سرکوبگر تومور سبب افزایش آپوپتوز، مهار تکثیر، مهاجرت و تهاجم در سلول های سرطانی پروستات و هیپاتوسلولار کارسینوما گردد (44-46).

این مطالعه برای اولین بار تغییرات miR-1297 را به عنوان miRNA هدف گیرنده ژن PTEN در افراد مبتلا به T-ALL مورد بررسی قرار داد. نتایج این مطالعه نشان داد که miR-1297 به عنوان یک انکوژن در T-ALL عمل می کند، که احتمالاً ژن سرکوبگر تومور PTEN را هدف قرار می دهد. بنابراین به نظر می رسد که miR-1297 شاید بتواند به عنوان یک بیومارکر احتمالی بالقوه و غیرتهاجمی در تشخیص و درمان T-ALL به کار برده شود. اگرچه این امر نیازمند مطالعات و بررسی های بیش تر از جمله آزمون لوسی فراز است، تا رابطه عملکردی بین miR-1297 و ژن PTEN بهتر مشخص گردد.

سپاسگزاری

مطالعه حاضر به عنوان بخشی از پایان نامه کارشناسی ارشد بوده است که هزینه مربوط به انجام آن توسط معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اراک تامین گردیده است. بدین منظور تمامی نویسندگان مراتب قدردانی خود را از همکاران محترم در آزمایشگاه ویروس شناسی دانشگاه علوم پزشکی اراک اعلام می دارند.

References

1. Belver L, Ferrando A. The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016; 16(8): 494-507.
2. Szarzyńska-Zawadzka B, Kunz JB, Sędek Ł, Kosmalka M, Zdon K, Biecek P, et al. PTEN abnormalities predict poor outcome in children with T-cell acute lymphoblastic

- leukemia treated according to ALL IC-BFM protocols. *Am J Hematol* 2019; 94(4): E93-E96.
3. Chiaretti S, Foà R. T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 2009; 94(2): 160-162.
 4. Koch U, Radtke F. Notch in T-ALL: new players in a complex disease. *Trends Immunol* 2011; 32(9): 434-442.
 5. Passaro D, Quang CT, Ghysdael J. Microenvironmental cues for T cell acute lymphoblastic leukemia development. *Immunol Rev* 2016; 271(1): 156-172.
 6. Graux C, Cools J, Michaux L, Vandenberghe P, Hagemeijer A. Cytogenetics and molecular genetics of T-cell acute lymphoblastic leukemia: from thymocyte to lymphoblast. *Leukemia* 2006; 20(9): 1496-1510.
 7. Ferrando A. Can one target T-cell ALL? *Best Pract Res Clin Haematol* 2018; 31(4): 361-366.
 8. Georgescu MM. PTEN tumor suppressor network in PI3K-Akt pathway control. *Genes Cancer* 2010; 1(12): 1170-1177.
 9. Bastola DR, Pahwa GS, Lin M-F, Cheng P-W. Downregulation of PTEN/MMAC/TEP1 expression in human prostate cancer cell line DU145 by growth stimuli. *Mol Cell Biochem* 2002; 236(1-2): 75-81.
 10. Fruman DA, Chiu H, Hopkins BD, Bagrodia S, Cantley LC, Abraham RT. The PI3K pathway in human disease. *Cell* 2017; 170(4): 605-635.
 11. Boutouja F, Stiehm CM, Platta HW. mTOR: A cellular regulator interface in health and disease. *Cells* 2019; 8(1): 18.
 12. Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J, Liu G, Hendricks W, Lengauer C, et al. PI3Kα inhibitors that inhibit metastasis. *Oncotarget* 2010; 1(5): 339-348.
 13. Kharas MG, Okabe R, Ganis JJ, Gozo M, Khandan T, Paktinat M, et al. Constitutively active AKT depletes hematopoietic stem cells and induces leukemia in mice. *Blood* 2010; 115(7): 1406-1415.
 14. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* 2007; 446(7137): 758-764.
 15. Palomero T, Sulis ML, Cortina M, Real PJ, Barnes K, Ciofani M, et al. Mutational loss of PTEN induces resistance to NOTCH1 inhibition in T-cell leukemia. *Nat Med* 2007; 13(10): 1203-1210.
 16. Milella M, Falcone I, Conciatori F, Cesta Incani U, Del Curatolo A, Inzerilli N, et al. PTEN: multiple functions in human malignant tumors. *Front Oncol* 2015; 5: 24.
 17. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; 6(269): p11.
 18. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; 2(5): 401-404.
 19. Wahid F, Shehzad A, Khan T, Kim YY. MicroRNAs: synthesis, mechanism, function, and recent clinical trials. *Biochim Biophys Acta* 2010; 1803(11): 1231-1243.
 20. Lai EC. Two decades of miRNA biology: lessons and challenges. *RNA* 2015; 21(4): 675-677.
 21. Di Leva G, Croce CM. miRNA profiling of cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23(1): 3-11.
 22. Rotkrua P, Shimada S, Mogushi K, Akiyama Y, Tanaka H, Yuasa Y. Circulating microRNAs as biomarkers for early detection

- of diffuse-type gastric cancer using a mouse model. *British J Cancer* 2013; 108(4): 932-940.
23. Drobna M, Szarzyńska-Zawadzka B, Dawidowska M. T-cell acute lymphoblastic leukemia from miRNA perspective: Basic concepts, experimental approaches, and potential biomarkers. *Blood Rev* 2018; 32(6): 457-472.
 24. Sanghvi VR, Mavrikis KJ, Van der Meulen J, Boice M, Wolfe AL, Carty M, et al. Characterization of a set of tumor suppressor microRNAs in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Sci Signal* 2014; 7(352): ra111.
 25. Mavrikis KJ, Van Der Meulen J, Wolfe AL, Liu X, Mets E, Taghon T, et al. A cooperative microRNA-tumor suppressor gene network in acute T-cell lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Nat Genet* 2011; 43(7): 673-678.
 26. Betel D, Koppal A, Agius P, Sander C, Leslie C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. *Genome Biol* 2010; 11(8): R90.
 27. Friedman RC, Farh KK-H, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19(1): 92-105.
 28. Bongiovanni D, Saccomani V, Piovan E. Aberrant signaling pathways in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci* 2017; 18(9): 1904.
 29. Martelli AM, Paganelli F, Fazio A, Bazzichetto C, Conciatori F, McCubrey JA. The key roles of PTEN in T-Cell acute lymphoblastic leukemia development, progression, and therapeutic response. *Cancers* 2019; 11(5): 629.
 30. Litzow MR, Ferrando AA. How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood* 2015; 126(7): 833-841.
 31. He J, Mu M, Luo Y, Wang H, Ma H, Guo S, et al. MicroRNA 20b promotes proliferation of H22 hepatocellular carcinoma cells by targeting PTEN. *Oncol Lett* 2019; 17(3): 2931-2936.
 32. Zhuang M, Qiu X, Cheng D, Zhu C, Chen L. MicroRNA-524 promotes cell proliferation by down-regulating PTEN expression in osteosarcoma. *Cancer Cell Int* 2018; 18(1): 1-9.
 33. Miao Y, Zheng W, Li N, Su Z, Zhao L, Zhou H, et al. MicroRNA-130b targets PTEN to mediate drug resistance and proliferation of breast cancer cells via the PI3K/Akt signaling pathway. *Sci Rep* 2017; 7: 41942.
 34. Zou Z-J, Fan L, Wang L, Xu J, Zhang R, Tian T, et al. miR-26a and miR-214 down-regulate expression of the PTEN gene in chronic lymphocytic leukemia, but not PTEN mutation or promoter methylation. *Oncotarget* 2015; 6(2): 1276-1285.
 35. Drobna M, Szarzyńska B, Jaksik R, Sędek Ł, Kuchmiy A, Taghon T, et al. hsa-miR-20b-5p and hsa-miR-363-3p Affect Expression of PTEN and BIM Tumor Suppressor Genes and Modulate Survival of T-ALL Cells In Vitro. *Cells* 2020; 9(5): 1137.
 36. Wang C, Li Q, Liu F, Chen X, Nesa EU, Guan S, et al. Serum miR-1297: a promising diagnostic biomarker in esophageal squamous cell carcinoma. *Biomarkers* 2016; 21(6): 517-522.
 37. Wang J, Xu X, Mo S, Tian Y, Wu J, Zhang J, et al. Involvement of microRNA-1297, a new regulator of HMGA1, in the regulation of glioma cell growth in vivo and in vitro. *Am J Transl Res* 2016; 8(5): 2149-2158.
 38. Chen Z, Ma Y, Pan Y, Zhu H, Yu C, Sun C. MiR-1297 suppresses pancreatic cancer cell

- proliferation and metastasis by targeting MTDH. *Mol Cell Probes* 2018; 40: 19-26.
39. Chen P, Wang BL, Pan BS, Guo W. MiR-1297 regulates the growth, migration and invasion of colorectal cancer cells by targeting cyclo-oxygenase-2. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014; 15(21): 9185-9190.
 40. Li X, Wang Hl, Peng X, Zhou Hf, Wang X. miR-1297 mediates PTEN expression and contributes to cell progression in LSCC. *Biochem Biophys Res Commun* 2012; 427(2): 254-260.
 41. Zhang C, Chi YL, Wang PY, Wang YQ, Zhang YX, Deng J, et al. miR-511 and miR-1297 inhibit human lung adenocarcinoma cell proliferation by targeting oncogene TRIB2. *PloS one* 2012; 7(10): e46090.
 42. Liu C, Liu Z, Li X, Tang X, He J, Lu S. MicroRNA-1297 contributes to tumor growth of human breast cancer by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling. *Oncol Rep* 2017; 38(4): 2435-2443.
 43. Yang N-Q, Luo X-J, Zhang J, Wang G-M, Guo J-M. Crosstalk between Meg3 and miR-1297 regulates growth of testicular germ cell tumor through PTEN/PI3K/AKT pathway. *Am J Transl Res* 2016; 8(2): 1091-1099.
 44. Liu Y, Liang H, Jiang X. MiR-1297 promotes apoptosis and inhibits the proliferation and invasion of hepatocellular carcinoma cells by targeting HMGA2. *Int J Mol Med* 2015; 36(5): 1345-1352.
 45. Liu F, He Y, Shu R, Wang S. MicroRNA-1297 regulates hepatocellular carcinoma cell proliferation and apoptosis by targeting EZH2. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8(5): 4972-4980.
 46. Liang X, Li H, Fu D, Chong T, Wang Z, Li Z. MicroRNA-1297 inhibits prostate cancer cell proliferation and invasion by targeting the AEG-1/Wnt signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2016; 480(2): 208-214.