

# بررسی الگوی بیان *hsa-miR-11181-5p* طی روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی انسان

سادات دوکانه‌ایی فرد<sup>۱</sup>، تبسم حسن‌نیا<sup>۲</sup>، بهرام محمدسلطانی<sup>۳\*</sup>

۱- گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۲- کارشناسی ارشد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

\* صندوق پستی ۱۱۱-۱۴۱۱۵، تهران، ایران

soltanib@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۰/۰۳/۱۹

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۲/۲۶

## چکیده

بیماری‌های قلبی و عروقی بیشترین عامل مرگ و میر در سراسر دنیا هستند و علیرغم پیشرفت‌های انجام شده در روش‌های درمانی، اختلالات قلبی به سرعت رو به افزایش است. ژن *TRKC* یکی از اعضای خانواده تیروزین رسیپتور کینازها می‌باشد که در نمو سیستم عصبی مرکزی و همچنین نمو قلب نقش دارد. عملکردهای متناقض زیادی برای این ژن تعریف شده است که به نظر می‌رسد بخشی از این عملکردها با RNAهای غیرکدکننده مستقر در آن مرتبط باشد. اخیراً یک ریز RNA با نام *hsa-miR-11181-5p* در ژن *TRKC* انسانی شناسایی و در پایگاه *miRBase* ثبت شده است که در تمایز عصبی دخیل است. ریز RNAها، RNAهای کوچک غیرکدکننده‌ای هستند که در تنظیم بیان ژن‌های هدف خود نقش دارند. هدف مطالعه حاضر بررسی بیان احتمالی *hsa-miR-11181-5p* طی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی می‌باشد. ابتدا، سلول‌های مولد قلبی از پژوهشگاه رویان تهیه و با استفاده از فاکتور رشد *TGFβ* تیمار تمایزی شدند. سپس، موفقیت روند تمایز با استفاده از بررسی بیان مارکرهای تمایز قلبی و نیز روش‌های میکروسکوپی در روزهای ۴، ۸، ۱۲، ۱۶ و ۲۱ تایید شد. پس از آن، الگوی بیانی *hsa-miR-11181-5p* در روزهای اشاره شده با استفاده از روش *RT-qPCR* بررسی شد. بیان *hsa-miR-11181-5p* ابتدا روند افزایشی و سپس الگوی کاهشی را در این دوره تمایزی نشان داد به طوری که بیان آن در هفته سوم به پائین‌تر از سطح بیان آن در سلول‌های تمایز نیافته رسید. تغییرات معنی‌دار بیان *hsa-miR-11181-5p* طی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی بیانگر آن است که این *miRNA* احتمالاً در تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی نقش دارد.

کلید واژگان: *hsa-miR-11181-5p*، ژن *TRKC*، تمایز قلبی

## ۱-مقدمه

انفارکتوس حاد میوکاردیوم<sup>۱</sup> عامل اصلی بسیاری از مرگ‌ومیرهای دنیا به شمار می‌رود. کشف سلول‌های مولد کاردیومیوسیت قلبی، این باور قدیمی را که سلول‌های قلبی توانایی تجدید درونی بسیار کمی دارند را از بین برد. بنابراین، تکثیر و تمایز این سلول‌ها با هدف دست‌یابی به روش‌های درمانی جدید در درمان بیماری‌های قلبی عروقی از اهمیت بالایی برخوردار است [۱].

miRNA، RNAهای کوچک غیرکدکننده با طول تقریبی ۱۸ تا ۲۷ نوکلئوتید می‌باشند که به صورت مستقیم و یا غیرمستقیم در تنظیم بیان بسیاری از ژن‌ها نقش دارند. نقش تغییرات بیان miRNA در ایجاد بیماری‌های قلبی و عروقی به اثبات رسیده است [۲].

ژن *TRKC* گیرنده تیروزین کینازی را کد می‌کند که با اتصال به نوروتروفین ۳، نقش مهمی در ماندگاری و تمایز سیستم عصبی پستانداران و نمو قلب ایفا می‌کند. نوآرای‌های کروموزومی صورت گرفته در این ژن سبب تومورزایی می‌شود. سازماندهی ژنومی و ساختار آگرون‌ها و ایترون‌های ژن *TRKC* اولین بار توسط ناتالیا و همکاران در سال ۱۹۹۸ مشخص شد [۳]. این ژن نقش‌های متضاد زیادی در سلول‌های مختلف ایفا می‌کند و احتمال می‌رود که این نقش‌های متضاد به RNAهای غیرکدکننده قرار گرفته در آن ژن مربوط باشد. اخیراً در مطالعه‌ای که توسط دوکانه‌ای و همکاران انجام شد، اولین miRNA قرار گرفته در ژن *TRKC* انسانی با نام hsa-miR-11181-5p کشف و در پایگاه داده miRBase ثبت شد [۴]. احتمال می‌رود که این RNA غیرکدکننده که توالی حفاظت شده‌ای در میان پستانداران دارد [۴]، یکی از عوامل اصلی در انجام نقش‌های داخل سلولی مرتبط با ژن میزبان آن یعنی *TRKC* باشد. بنابراین، در پژوهش حاضر با توجه به نقش

*TRKC* در نمو قلب [۶،۵،۳] و همچنین بیماری‌های قلبی [۷]، سلول‌های مولد قلبی به کاردیومیست‌ها<sup>۲</sup> تمایز داده شدند و برای نخستین بار الگوی بیان hsa-miR-11181-5p طی روند تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی به کاردیومیست‌ها بررسی شده است.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱ کشت و تمایز سلول‌های پیش‌ساز قلبی

سلول‌های بنیادی قلب انسان<sup>۳</sup> با شماره کد ملی RSCB0180<sup>۴</sup> از بانک سلول‌های بنیادی پژوهشگاه رویان خریداری شد [۸، ۹]. این سلول‌ها در پاساژ صفر قرار داشتند. برای تکثیر سلول‌های بنیادی قلبی از محیط کشت کامل IMDM (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم (FBS, Gibco) و ۱ درصد آنتی بیوتیک پنی سیلین-استرپتومايسين (Sigma)، استفاده شد. تکثیر سلول‌ها تا پاساژ ۵ ادامه یافت. جهت القای تمایز قلبی، پروتکل اسمیت و همکاران، منتشر شده در پایگاه Nature Protocols در سال ۲۰۰۹ مبنای کار قرار گرفت. در این پروتکل از فاکتورهای TGFβ1 و اسکوربیک اسید و فاکتور دتمپله‌کننده ۵-آزاسایتیدین<sup>۵</sup> - برای القای تمایز استفاده شده است [۱۰]. تغییرات موفولوژیکی طی روند تمایز با استفاده از میکروسکوپ اینورت بررسی شد.

### ۲-۲ استخراج RNA و الکتروفورز ژل آگارز

استخراج RNA تام از سلول‌ها با استفاده از ترايزول و طبق دستورالعمل شرکت اینویتروجن<sup>۶</sup> انجام شد. تمام RNAهای استخراج شده تا زمان استفاده در فریزر ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. کیفیت و غلظت RNAهای استخراج شده با استفاده از الکتروفورز ژل آگارز ۱ درصد و دستگاه اسپکتروفومتری بررسی شد. حذف آلودگی DNA در نمونه‌های RNA استخراج شده،

<sup>۴</sup> National code number: RSCB0180

<sup>۵</sup> 5-Azacytidin

<sup>۶</sup> invitrogen

<sup>۱</sup> Myocardial infarction

<sup>۲</sup> cardiomyocyte

<sup>۳</sup> Cardiac progenitor cells

چندین باز آدنین به انتهای 3' آنها اضافه شود. بنابراین، با استفاده از آنزیم باکتریایی پلیمراز A و در حضور ATP ابتدا مجموعه RNA استخراج شده از سلول را تیمار و به انتهای 3' تمامی RNAهای سلولی دم PolyA اضافه شد. سپس، با استفاده از آنزیم رونوشت برداری معکوس<sup>۲</sup> شرکت فرمنتاز و با استفاده از پرایمر اختصاصی الیگو dT انکر دار<sup>۳</sup> سنتز cDNA طبق پروتکل استاندارد انجام شد [۱۱، ۱۲].

با تیمار آنزیم DNaseI شرکت فرمنتاز<sup>۱</sup> به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی گراد انجام شد. سپس، جهت غیرفعال کردن آنزیم DNaseI، از ۵۰ میلی مولار EDTA در دمای ۶۵ درجه سانتی گراد استفاده شد.

### ۲-۳ واکنش پلی A دار کردن RNA و سنتز cDNA

از آنجا که miRNAها فاقد توالی ployA در انتهای 3' خود بوده و دارای طول کوتاهی هستند، نمی‌توان به راحتی آنها را تبدیل به cDNA کرد، مگر اینکه به طریقی

جدول ۱ توالی پرایمرهای استفاده شده در مطالعه حاضر

نام پرایمر	توالی پرایمر
Anchored-Oligo-dT	GCGTCGACTAGTACAACCTCAAGGTTCTTCCAGTCACG(T)18 N
hsa-miR-11181-5p	GTCTGACCAACCTCCTCCC
پرایمر برگشت عمومی	AACTCAAGGTTCTTCCAGTCACG
پرایمر رفت <i>U48</i>	TGACCCAGGTAACCTCTGAGTGTGT
<i>GAPDH</i>	F: GCCACATCGCTCAGACAC R: GGCAACAATATCCACTTTACCAG
<i>GATA6</i>	F: GTTGGCACAGGACAATCCAAG R: CTGCGGGCTCTACAGCAAG
<i>MEF2C</i>	F: CTGGTGTAACACATCGACCTC R: GATTGCCATACCCGTTCCCT
<i>CNX43</i>	F: AGCTGCTGGACATGAATTAC R: CTAGATCTCCAGGTCATCAG
<i>TNNT</i>	F: ACAGAGCGGAAAAGTGGGAAG R: TCGTTGATCCTGTTTCGGAGA
<i>MYH7</i>	F: GGGGCAACAGGAAAAGTTGG R: CTCCTCAGGTCATCAATGGA

<sup>۳</sup>Anchored-Oligo-dT

<sup>۱</sup> Fermentas

<sup>۲</sup>Reverse Transcriptase (RT)

#### ۲-۴ qRT-PCR

هویت سلول‌های CDC مورد مطالعه در این پژوهش با استفاده از تست‌های فلو سائتومتري و ایمونو سیتو شیمی تأیید شد. نتیجه این مطالعه در مطالعات پیشین تیم تحقیقاتی ما به چاپ رسیده است [۹، ۸، ۱].

#### ۳-۱ م مشاهده تغییرات مورفولوژیکی سلول‌ها در روند تمایز سلول‌های مولد قلبی

بررسی تغییرات مورفولوژیکی طی روند تمایز نشان داد که سلول‌ها از ظاهر دوکی شکل شبه سلول‌های فیبروبلاستی (شکل ۱A) به سلول‌های سنسیتیوم<sup>۳</sup> چندشاخه‌ای (شکل ۱B) که یکی از ویژگی‌های تیپیک کاردیومیوسیت‌های قلبی است تغییر یافته‌اند.

#### ۳-۲ تأیید مولکولی روند تمایز با بررسی مارکرهای

##### اولیه و دیر هنگام تمایز قلبی

برای تأیید بیشتر تمایز در سلول‌های مطالعه شده، بیان چندین مارکر زود هنگام (شکل ۲A) و دیر هنگام (شکل ۲B) طی روند تمایز با استفاده از روش qRT-PCR بررسی شد. الگوی بیان ژن‌های مطالعه شده نشان داد که سطح بیان ژن مارکر زود هنگام *GATA6* روند زیگزاگی نشان می‌دهد و تغییر معنی‌داری در بیان *MEF2C* دیده نمی‌شود (شکل ۲A). بیان ژن‌های مارکر دیر هنگام *MYH7* و *TNNT* طی روند تمایز الگوی افزایشی را نشان می‌دهند (شکل ۲B). اگرچه سطح بیان ژن مارکر *CNX43* ابتدا افزایش و سپس کاهش می‌یابد.

بیان *hsa-miR-11181-5p* با استفاده از روش qRT-PCR و با دستگاه ABI 7500 (Applied Biosystems, Foster City CA, USA) اندازه‌گیری شد. این واکنش در حضور اوآگرین<sup>۱</sup> برای ۴۰ سیکل در شرایط دمایی ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه انجام شد. برای نرمالیزه کردن<sup>۲</sup> مقدار RNA استفاده شده در نمونه‌ها، از *snoRNA-U48* به‌عنوان ژن کنترل داخلی استفاده شد. این مقادیر در سلول‌های تمایز یافته نسبت به سلول‌های تیمار نشده نرمال شد. مقادیر تغییرات بیان *hsa-miR-11181-5p* با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و  $2^{-\Delta Ct}$  محاسبه شد.

#### ۲-۵ طراحی پرایمر

پرایمرهای به کار گرفته شده در این مطالعه، الیگو *dT* انکر دار جهت سنتز cDNA، پرایمر رفت اختصاصی *hsa-miR-11181-5p* و پرایمر برگشت عمومی متصل شونده به ناحیه انکر بر روی توالی الیگو *dT* انکر دار، پرایمر رفت ژن *U48*، پرایمرهای *GAPDH* به‌عنوان کنترل داخلی، و پرایمرهای رفت و برگشت لازم جهت بررسی بیان مارکرهای تمایز قلبی هستند. توالی پرایمرهای استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آورده شده است.

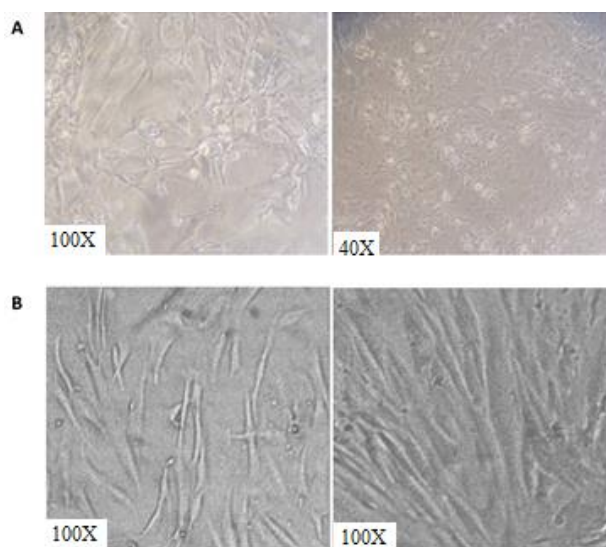
#### ۲-۶ آنالیز داده‌ها

نتایج به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار اندازه‌گیری شد. از *t-test* برای مقایسه دو به دو داده‌ها استفاده شد و هر آزمایش دو بار تکرار شد. داده‌های حاصل از qRT-PCR با روش  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  و  $2^{-\Delta Ct}$  آنالیز شدند.

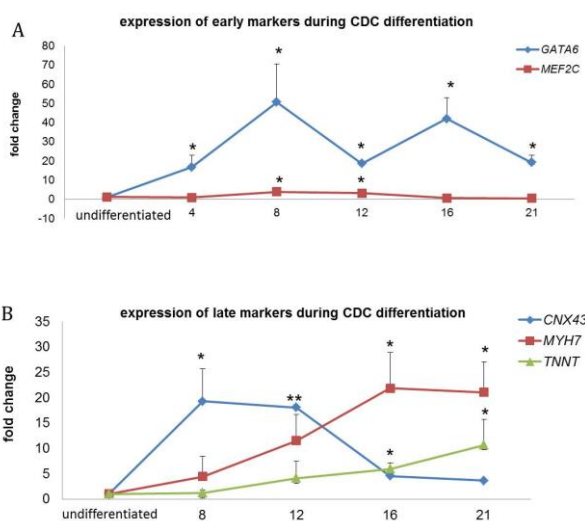
#### ۳- نتایج

<sup>۱</sup>Normalizing  
<sup>۳</sup> syncytium

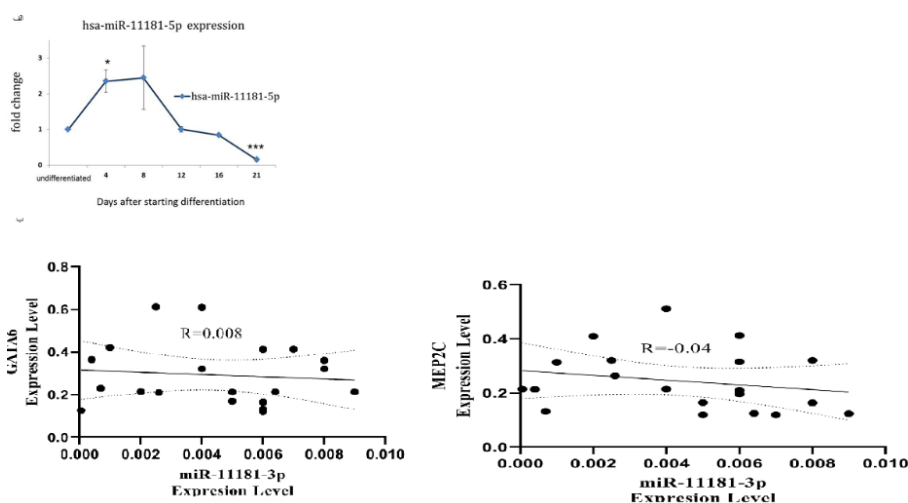
<sup>۲</sup>EvaGreen



شکل ۱ تصویر میکروسکوپ نوری سلول‌های تمایز نیافته قلبی با ظاهر شبه فیروبلاستی در روز بیست و یکم پس از شروع روند تمایز (A) و سلول‌های تحت تیمار تمایزی در روز بیست و یکم پس از شروع روند تمایز با ظاهر چندشاخه‌ای (B). دو تصویر سمت چپ و راست بخش A، به ترتیب با درشت‌نمایی 100x و 40x نشان داده شده است. و هر دو تصویر سمت راست و چپ بخش B، با درشت‌نمایی 100x نشان داده شده است. اندازه هر سلول در این شکل ۱۵ میکرومتر می‌باشد.



شکل ۲ الگوی بیان ژن‌های مارکرهای زود هنگام (A) و دیر هنگام (B) تمایز قلبی. سطح بیان مارکر *MEF2C* در روند تمایز تغییر قابل ملاحظه‌ای نشان نمی‌دهد. در حالی که، بیان *GATA6* یک الگوی زیگزاگی را نشان می‌دهد. بیان *CNX43* تا روز ۸ افزایش معنی‌دار و پس از آن الگوی کاهش معنی‌داری را نشان می‌دهد. الگوی بیان ژن‌های *MYH7* و *TNNT* در روند تمایز الگوی افزایشی را نشان می‌دهد. سطح بیان همه ژن‌های مطالعه شده در اینجا با سطح بیان ژن *GAPDH* انسانی به عنوان ژن کنترل داخلی، نرمالیز شده است. معنی‌داری تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به سلول‌های تمایز نیافته (روز صفر تمایز) محاسبه شده است. هر آزمایش دو بار تکرار شد. ( $P < 0.05$ ).



شکل ۳ الگوی بیان hsa-miR-11181-5p طی روند تمایز سلول‌های قلبی. بیان این miRNA تا روز هشتم پس از القا تمایز الگوی افزایشی نشان داد. سپس، بیان آن تا روز بیست و یکم پس از القا تمایز روند کاهشی نشان داد. معنی‌داری تغییرات بیان ژن‌ها نسبت به سلول‌های تمایز نیافته (روز صفر تمایز) محاسبه شده است. بیان hsa-miR-11181-5p با ژن *U48* از سانی به‌عنوان ژن کنترل داخلی نرمالایز شده است. ( $P < 0.05$ ). همبستگی بیانی منفی بین miR-11181-3p با ژن‌های *GATA6* و *mep2c* (ب).

از تمایز سلول‌های فیروبلاست به سلول‌های قلبی باشد. (شکل ب)

### ۳-۳ بررسی بیان hsa-miR-11181-5p طی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی

بیان hsa-miR-11181-5p طی روند تمایز کاردیومیوسیت‌های قلبی با استفاده از تکنیک qRT-PCR بررسی شد. سطح بیان hsa-miR-11181-5p پس از شروع روند تمایز تا روز چهارم افزایش معناداری نشان داد و پس از آن تا روز هشتم (هفته اول) تغییر معناداری در بیان آن مشاهده نشد (شکل ۳). سپس، از روز هشتم تا روز بیست و یکم (هفته سوم) پس از شروع تمایز روند کاهشی را نشان داد (شکل ۳). از این رو، بیان ژن‌های مذکور با روند تمایز قلبی افزایش بیان پیدا کرده و بیان آنها با ژن‌ها یا miRNA های ممانعت‌کننده از تمایز همبستگی منفی دارد (شکل ۳ ب). بر همین اساس، نتایج حاصل از آنالیزهای بیوانفورماتیکی نشان داد که بیان miRNA- با ژن‌های *GATA6* و *MEF2C* همبستگی منفی دارد و به نظر می‌رسد این همبستگی منفی می‌تواند یکی از مکانیسم‌های درگیر miRNA مذکور در ممانعت

### ۴- بحث و نتیجه‌گیری

قلب اولین اندامی است که در دوره جنینی شکل می‌گیرد. شبکه ژنی پیچیده‌ای متشکل از فاکتورهای رونویسی، مهارکننده‌ها، فعال‌کننده‌ها، عناصر پروموتوری و غیره در شکل‌گیری این اندام دخیل هستند. تنظیم در سطح رونویسی در شکل‌گیری قلب در میان گونه‌های مختلف به شدت حفظ شده است و هر گونه جهش در فاکتورهای رونویسی بیان شونده در قلب منجر به ناهنجاری‌های مختلف می‌شود. امروزه با شناسایی بخش اعظمی از رونوشت‌های ژنی که به پروتئین کد نمی‌شوند (RNAهای غیر کد کننده) و نقش تنظیمی مهمی در سلول ایفا می‌کنند در پیچه جدیدی برای درک مکانیسم‌های تنظیمی تمایز قلبی باز شده است. از جمله این RNAهای غیرکدکننده می‌توان به miRNAها اشاره کرد که در بسیاری از فرایندهای سلولی به عنوان سوئیچ‌های مولکولی عمل می‌کنند [۱۴، ۱۳].

این فاکتورهای مطالعه شده معنی‌دار نشد. لذا تکرار مجدد این آزمایشات در مطالعات آتی، می‌تواند نقش مهمی در معنی‌دار شدن این تغییرات بیانی داشته باشد. این فاکتورها سلول‌ها را برای تمایز به سلول‌های قلبی متعهد می‌سازند. از جمله این فاکتورها می‌توان به اعضای خانواده *GATA* (پروتئین‌های متصل شونده به توالی *GATA*، به‌عنوان مثال *GATA6* که تنظیم‌کننده بیان ژن در سلول‌های ماهیچه‌ای قلب می‌باشد)، *CNX43* (به‌عنوان پروتئین دخیل در شکل‌گیری گپ‌جانکشن‌ها<sup>۱</sup>) و فاکتور *MEF2* اشاره کرد [۲۰-۲۲]. *CNX43* یک پروتئین گپ‌جانکشن یا اتصالات شکاف‌دار می‌باشد که در ایجاد اتصالات سلولی بین میوسیت‌های قلب نقش دارد. از آنجایی که، منبع اولیه سلول‌های CDC مورد استفاده در مطالعه حاضر برای شروع تمایز، هتروژن بودند، انتظار نمی‌رفت که سلول‌های حاصل از تمایز همگی به میوسیت‌ها تمایز یابند. علاوه بر این، نتایج حاصل از فلو سایتومتری سلول‌های تمایز یافته نشان داد که تنها ۳۰ درصد سلول‌های تمایز یافته تروپونین I را بیان می‌کنند که یک ویژگی میوسیت‌ها است؛ اگرچه بیان تروپونین I لزوماً به معنای میوسیتی شدن سرنوشت سلول نیست. همچنین، از آنجایی که میان سلول‌های تمایز یافته میوسیتی تعداد زیادی سلول تمایز یافته غیرمیوسیتی وجود دارد و سلول‌های میوسیت در ارتباط چندانی با همدیگر نیستند که نیازمند بیان پروتئین‌های اتصالات شکاف‌دار یا گپ‌جانکشن باشند، بنابراین در عمل بیان *CNX43* از روز ۱۲ به بعد کاهش می‌یابد. اما دلیل این افزایش بیان اتصالات شکاف‌دار یا گپ‌جانکشن تا روز ۱۲، به بیان افزایش یافته فاکتورهای نسخه‌برداری همچون *NKX-2.5* قلبی مربوط است (داده در اینجا نشان داده نشده است) که سبب افزایش بیان *CNX43* می‌شود [۲۳]. همچنین، لازم به ذکر است که نوع سلول اولیه، پروتکل تمایزی و نوع سلول‌های تمایزی تولید شده بر

نوروتروفین‌ها و گیرنده‌های آنها، از جمله *TRKC* انسانی، در شکل‌گیری قلب و عروق خونی میوکاردیال [۵]، تنظیم تکثیر میوسیت‌های قلبی طی روند نمو اولیه قلب [۶] و هایپرتروفی‌های قلبی [۷] نقش دارند. *hsa-miR-11181-5p* که در یکی از اینترون‌های ژن *TRKC* واقع شده است [۴]، احتمالاً در مسیرهای مرتبط با تمایز و نمو قلب دخیل است. ثابت شده است ژن *HBEGF* که به‌عنوان یک فاکتور رشد کاردیوژنیک و کاردیوهایپرتروفیک عمل می‌کند [۱۶، ۱۵]، *hsa-miR-11181* را هدف قرار می‌دهد [۴]. از آنجا که احتمال می‌رود برخی از عملکردهای ناشناخته و متناقض ژن *TRKC* با RNAهای غیرکدکننده مرتبط با آن هدایت شود [۴]، بیان *hsa-miR-11181-5p* طی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی به کاردیومیوسیت بررسی شد.

ابتدا با استفاده از روش پذیرفته‌شده القای تمایز قلبی با استفاده از تیمار *TGFβ1*، روند تمایز قلبی القاء شد [۱۰]. تغییرات موفولوژیکی سلول‌هایی که تحت تیمار تمایزی قرار گرفته بودند حاکی از درستی روند تمایز بود. در هفته سوم پس از شروع تمایز، سلول‌های تمایز یافته که دارای موفولوژی چندشاخه‌ای بودند کاملاً از سلول‌های تمایز نیافته مولد قلبی در هفته اول که دوکی شکل و شبه فیروبلستی هستند متمایز بودند (شکل ۱). علاوه بر این، الگوی بیان مارکرهای زود هنگام و روند زیگزاگی بیان *GATA6* مشاهده شد که با الگوهای بیانی نوسانی بسیاری از ژن‌ها در مطالعات پیشین بر روی قلب مشابه می‌باشد [۱۷]. این مطالعه با استفاده از روش ریزآرایه الگوی بیان بسیاری از ژن‌ها را بررسی کرده است [۱۷]. همچنین، روند افزایشی بیان ژن‌های مارکرهای دیر هنگام [۱۸، ۱۹]، نیز دلیل دیگری بر درستی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی به کاردیومیوسیت می‌باشد (شکل ۲). علیرغم درستی روند تغییرات بیانی مشاهده شده، تغییرات بیانی برخی از

<sup>۱</sup> gap junction

مبنی بر کشف ژن‌های هدف این miRNA و نیز مطالعاتی با استفاده از روش‌های حذف و کاهش بیان آن در روند تمایز سلولی، نقش دقیق‌تر آن را در روند تمایز نشان خواهد داد.

در مطالعات آتی برای مطالعه بیشتر و تایید بهتر miR-11181-3p در تمایز قلبی انجام تست مدل موشی و بررسی ژن‌ها در سطح پروتیین با انجام وسترن بلات توصیه می‌شود.

#### ۵- تشکر و قدردانی

پژوهش حاضر با حمایت مالی دانشگاه تربیت مدرس و نیز صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF)<sup>۱</sup> بر اساس طرح مصوب شماره ۴۷۰۱۴/ص/۹۵ انجام شده است. لازم است از زحمات آقای میثم جعفرزاده که در انجام این پژوهش ما را یاری کردند قدردانی شود.

#### ۶- منابع

- [1] Ekhteraei Tousi S, Mohammad Soltani B, Sadeghizadeh M, Hoseini S, Soleimani M. Hsa-miR-133b Expression Profile during Cardiac Progenitor Cell Differentiation and its Inhibitory Effect on SRF Expression. *Modares Journal of Medical Sciences: Pathobiology*. 2013;16(1):1-9.
- [2] van Rooij E, Sutherland LB, Liu N, Williams AH, McAnally J, Gerard RD, et al. A signature pattern of stress-responsive microRNAs that can evoke cardiac hypertrophy and heart failure. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006;103(48):18255-60.
- [3] Ichaso N, Rodriguez RE, Martin-Zanca D, Gonzalez-Sarmiento R. Genomic characterization of the human trkC gene. *Oncogene*. 1998;17(14):1871-5.
- [4] Dokanehiifard S, Soltani BM, Parsi S, Hosseini F, Javan M, Mowla SJ. Experimental verification of a conserved intronic microRNA located in the human TrkC gene with a cell type-dependent apoptotic function. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2015:1-13.
- [5] Caporali A, Emanuelli C. Cardiovascular actions of neurotrophins. *Physiological Reviews*. 2009;89(1):279-308.

روی الگوی بیانی ژن‌ها تاثیر گذار می‌باشد. در این مطالعه از سلول‌های CDC استفاده شده که منشا هتروژنی دارند. از طرف دیگر مطالعات گذشته نشان داده که میوسیت‌های مختلف قلبی با توجه به محل قرارگیری شان الگوی متفاوتی از بیان *CNX43* نشان می‌دهند. از آنجایی که در این مطالعه نوع میوسیت‌های تولید شده مشخص نمی‌باشد، بنابراین نمی‌توان الگوی بیان *CNX43* را پیش‌بینی کرد [۲۳].

hsa-miR-11181-5p ریز RNA ای است که در نمونه‌های توموری گلیو مایی مغز بیان بالایی دارد. به علاوه، این ریز RNA نقش تنظیمی مثبتی در تمایز سلول‌های NT2 به سلول‌های شبه عصبی دارد. به طوری که کاهش بیان این ریز RNA سبب به تعویق انداختن روند تمایز سلول‌های NT2 می‌شود (۴). از طرفی بیان hsa-miR-11181-5p تا روز چهارم پس از شروع تمایز قلبی افزایش می‌یابد و پس از آن از روز هشتم تا روز بیست و یکم سطح بیان آن کاهش می‌یابد (شکل ۳). با توجه به الگوی افزایشی بیان hsa-miR-11181-5p تا روز هشتم، می‌توان گفت این miRNA در مراحل اولیه شروع تمایز قلبی دخیل است، به طوری که افزایش بیان آن می‌تواند یکی از فاکتورهای شروع کننده تمایز باشد. اگرچه نمی‌توان با قطعیت ادعا کرد که افزایش بیان آن منجر به شروع تمایز می‌شود و یا شروع تمایز عاملی برای القای افزایش بیان آن می‌باشد. با این وجود می‌توان بیان کرد که این miRNA یکی از فاکتورهای دخیل در تنظیم تمایز قلبی است که تا روز هشتم عملکرد خود را انجام می‌دهد و پس از آن الگوی کاهش معنی‌داری نشان می‌دهد. تغییرات معنی‌دار بیان hsa-miR-11181-5p طی روند تمایز سلول‌های مولد قلبی و نیز طی روند تمایز عصبی بیانگر آن است که این miRNA احتمالاً در تمایز سلول‌های پیش‌ساز به سلول‌های تمایز یافته نقش به‌سزایی دارد. تحقیقات آتی

<sup>1</sup> Iran National Science Foundation (INSF)



- for heart development. *Development*. 1999;126(6):1269-80.
- [15] Koh YH, Suzuki K, Che W, Park YS, Miyamoto Y, Higashiyama S, et al. Inactivation of glutathione peroxidase by NO leads to the accumulation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the induction of HB-EGF via c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase in rat aortic smooth muscle cells. *The FASEB Journal*. 2001;15(8):1472-4.
- [16] Ushikoshi H, Takahashi T, Chen X, Khai NC, Esaki M, Goto K, et al. Local overexpression of HB-EGF exacerbates remodeling following myocardial infarction by activating noncardiomyocytes. *Laboratory investigation*. 2005;85(7):862-73.
- [17] Cao F, Wagner RA, Wilson KD, Xie X, Fu J-D, Drukker M, et al. Transcriptional and functional profiling of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes. *PloS one*. 2008;3(10):e3474.
- [18] Den Hartogh SC, Wolstencroft K, Mummery CL, Passier R. A comprehensive gene expression analysis at sequential stages of in vitro cardiac differentiation from isolated MESP1-expressing-mesoderm progenitors. *Scientific reports*. 2016;6:19386.
- [19] Fonoudi H, Yeganeh M, Fattahi F, Ghazizadeh Z, Rassouli H, Alikhani M, et al. ISL1 protein transduction promotes cardiomyocyte differentiation from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2013;8(1):e55577.
- [20] Olson EN. Gene regulatory networks in the evolution and development of the heart. *Science*. 2006;313(5795):1922-7.
- [21] Akazawa H, Komuro I. Roles of cardiac transcription factors in cardiac hypertrophy. *Circulation research*. 2003;92(10):1079-88.
- [22] Dodou E, Verzi MP, Anderson JP, Xu S-M, Black BL. Mef2c is a direct transcriptional target of ISL1 and GATA factors in the anterior heart field during mouse embryonic development. *Development*. 2004;131(16):3931-42.
- [23] Munshi NV. Gene regulatory networks in cardiac conduction system development. *Circulation research*. 2012;110(11):1525-37.
- [6] Lin MI, Das I, Schwartz GM, Tsoulfas P, Mikawa T, Hempstead BL. Trk C receptor signaling regulates cardiac myocyte proliferation during early heart development in vivo. *Developmental biology*. 2000;226(2):180-91.
- [7] Kawaguchi-Manabe H, Ieda M, Kimura K, Manabe T, Miyatake S, Kanazawa H, et al. A novel cardiac hypertrophic factor, neurotrophin-3, is paradoxically downregulated in cardiac hypertrophy. *Life sciences*. 2007;81(5):385-92.
- [8] Ekhteraei-Tousi S, Mohammad-Soltani B, Sadeghizadeh M, Mowla SJ, Parsi S, Soleimani M. Inhibitory Effect of Hsa-miR-590-5p on Cardiosphere-derived Stem Cells Differentiation Through Downregulation of TGFβ Signaling. *Journal of cellular biochemistry*. 2015;116(1):179-91.
- [9] Jafarzadeh M, Soltani BM. Hsa-miR-590-5p Interaction with SMAD3 Transcript Supports Its Regulatory Effect on The TGFβ Signaling Pathway. *Cell Journal (Yakhteh)*. 2016;18(1):7.
- [10] Smits AM, van Vliet P, Metz CH, Korfage T, Sluijter JP, Doevendans PA, et al. Human cardiomyocyte progenitor cells differentiate into functional mature cardiomyocytes: an in vitro model for studying human cardiac physiology and pathophysiology. *Nature protocols*. 2009;4(2):232-43.
- [11] Dokanehiifard S, Yasari A, Najafi H, Jafarzadeh M, Nikkhah M, Mowla SJ, et al. A novel microRNA located in the TrkC gene regulates the Wnt signaling pathway and is differentially expressed in colorectal cancer specimens. *Journal of Biological Chemistry*. 2017;292(18):7566-77.
- [12] Saleh AJ, Soltani BM, Dokanehiifard S, Medlej A, Tavalaei M, Mowla SJ. Experimental verification of a predicted novel microRNA located in human PIK3CA gene with a potential oncogenic function in colorectal cancer. *Tumor Biology*. 2016;37(10):14089-101.
- [13] Latronico MV, Catalucci D, Condorelli G. Emerging role of microRNAs in cardiovascular biology. *Circulation research*. 2007;101(12):1225-36.
- [14] Tanaka M, Chen Z, Bartunkova S, Yamasaki N, Izumo S. The cardiac homeobox gene Csx/Nkx2.5 lies genetically upstream of multiple genes essential

# Investigating the expression level of hsa-miR-11181-5p during the human cardiac progenitor cells differentiation process

Sadat Dokaneheifard<sup>1</sup>, Tabasom Hasannia<sup>2</sup>, Bahram M. Soltani<sup>3\*</sup>

1. Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2. MSc., Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3. Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

soltanib@modares.ac.ir

Receipt: 2021/05/22

Accepted: 2022/05/16

## Abstract

Cardiovascular diseases (CVDs) are globally the number 1 cause of death. Despite improvement in treatment strategies, heart disorders are strongly increasing. Therefore, identification of new regulatory factors involved in the cardiac differentiation is very important. *TRKC* receptor, part of the large family of receptor tyrosine kinases, is involved in development of the heart and central nervous system. There are many contradictory functions related to the *TRKC* gene which might be attributed to the non-coding RNAs located in it. Recently, a novel miRNA, hsa-miR-11181-5p located in *TRKC* gene, has been reported which is involved in nervous differentiation. MiRNAs are small non-coding RNAs regulating their target genes via mRNA degradation or protein inhibition. The goal of the present study was to investigate the expression pattern of hsa-miR-11181-5p during the course of cardiosphere-derived cells (CDCs) differentiation. Human cardiac progenitor cells were prepared from Royan Stem Cell Bank (RSCB) and differentiated into cardiomyocytes. The cells were treated with 5-azacytidine for initiating differentiation. Ascorbic acid (every other day) and TGFB1 (twice per week) were then added. Successful differentiation of cardiomyocytes was confirmed through microscopy method and expression analysis of the molecular markers, 4, 8, 12, 16 and 21 days after starting differentiation. The expression pattern of hsa-miR-11181-5p was also analyzed through qRT-PCR during the cardiac differentiation course. Expression of hsa-miR-11181-5p during the course of differentiation was initially increased and after this was reduced, as its expression at 3<sup>th</sup> week after starting differentiation was lower than undifferentiated cells. Significant expression alteration of hsa-miR-11181-5p during the course of cardiosphere-derived cells revealed that this miRNA potentially has a critical role in differentiation of cardiac progenitor cells.

**Key words:** hsa-miR-11181-5p, *TRKC* gene, cardiac differentiation