

اثر کاهش بیان RNA غیر کدکننده *TUG1* بر بیان رسپتور CD20

محبوبه رجحان‌نژاد^۱، عبدالرضا ناصر مقدسی^۲، عباس نیک‌روش^۳، مهرداد بهمنش^۴

- ۱- دانشجوی دکتری، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- استادیار، مرکز تحقیقات مالتیپل اسکلروزیس، انستیتو علوم نوروساینس، دانشگاه علوم پزشکی، تهران، ایران
- ۳- دانشیار، دپارتمان علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده علوم پزشکی، خراسان شمالی، بجنورد، ایران
- ۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

*صندوق پستی ۱۴۱۱۵-۱۵۴، تهران، ایران
behmanesh@modares.ac.ir

پذیرش: ۱۴۰۱/۰۶/۱۵

دریافت: ۱۴۰۱/۰۱/۲۷

چکیده

مالتیپل اسکلروزیس (MS) یکی از شایع‌ترین بیماری‌های خودایمن در ایران و جهان است. جهت کنترل پیشرفت MS به عنوان یک بیماری التهابی مزمن سیستم عصبی مرکزی، تاکنون داروهای زیادی تولید شده است. ریتوکسیماب آنتی‌بادی مونوکلونال کایمیریک موشی-انسانی است که به رسپتور CD20 روی سطح سلول‌های B متصل و باعث القای آپوپتوز می‌شود. امروزه پژوهش‌های فراوانی نقش کلیدی RNAهای غیر کدکننده را در تنظیم بیان ژن‌ها و مسیرهای مولکولی از جمله آپوپتوز را تایید کرده‌اند. نتیجه آنالیزهای بیوانفورماتیکی بیانگر تغییرات بیانی *TUG1* LncRNA در بیماران مبتلا به MS می‌باشد. بنابراین، در مطالعه حاضر نقش احتمالی *TUG1* LncRNA در تنظیم مکانیسم عملکرد ریتوکسیماب در القای آپوپتوز به صورت تجربی بررسی شد. برای این بررسی، DNase برای اختلال در بیان *TUG1* طراحی و در حضور و عدم حضور دارو به سلول‌های Raji ترانسفکت شد. در ادامه پس از انجام ترانسفکشن، استخراج RNA و سنتز cDNA، بیان ژن‌های هدف با تکنیک RT-qPCR بررسی شد. به دنبال کاهش بیان *TUG1*، بیان ژن CD20 افزایش و بیان *SMAD2* کاهش یافت. همچنین، کاهش بیان *TUG1* منجر به القای آپوپتوز و تجمع سلول‌ها در فاز G1 شد. به نظر می‌رسد سطح بیان *TUG1* نقش موثری در تنظیم بیان ژن CD20 در سلول‌های B و میزان اثربخشی درمان با ریتوکسیماب داشته باشد.

کلید واژگان: ریتوکسیماب، CD20، long non coding RNA، *TUG1*

۱- مقدمه

بیماری مالتیپل اسکلروزیس^۱ (MS) یک بیماری التهابی است که با دمیالینه شدن و آسیب نورونی به واسطه التهاب در سیستم عصبی مرکزی CNS ایجاد می شود. این بیماری سبب ناتوانی در حرکت و عملکردهای اوتونومیک و شناختی بیمار می شود. بیماری MS بیشتر در جوانان و به ویژه خانم ها بین سن ۲۰ تا ۴۰ سال رخ می دهد و بار روانی و مالی فراوانی به جامعه تحمیل می کند [۱، ۲]. بیماری در ابتدا با حملات و شکل گیری پلاک های التهابی در ماده سفید مغز مشخص می شود. این حملات معمولاً با بهبود کامل یا نسبی آسیب همراه می شوند. با پیشرفت بیماری آسیب ها بیشتر می شوند و تحلیل عصبی هم افزایش می یابد. بیماری MS بر اساس علائم بالینی به انواع مختلفی از جمله RRMS (Relapsing-remitting MS)، SPMS (secondary- progressive MS)، PPMS (Primary-progressive MS) دسته بندی می شود [۳]. مهم ترین ژن هایی که تاکنون توسط مطالعات همراهی کل ژنوم (GWAS) برای استعداد ابتلا به MS گزارش شده اند، از جمله کلاستر ژنی HLA کلاس دو هستند که همراهی واضحی با شیوع بیماری دارند. واریانت های ژنی معنی دار غیر HLA که با بیماری همراهی نشان دادند نیز شامل IL2RA، IL7، IL12A، CYP27B1، MGAT5، STAT، IRF8، CD40 و چندین ژن دیگر موثر در مسیر التهاب هستند [۴]. مطالعه Ivan Jelcic و همکاران نشان داد که تکثیر خود به خودی سلول های T فعال شده، در بیماران MS افزایش پیدا می کند. اینترکشن بین B-cell و HLA-DR15 روی سطح سلول و T-cell ها سبب فعال شدن و رشد خودبخودی سلول های ایمنی می شود که نقش بسیار مهمی در پاسخ ایمنی در MS و همچنین در حفظ التهاب در سیستم عصبی مرکزی بازی می کند. بررسی ها نشان داده که B-cell ها آنتی ژن هایی را تولید می کنند که در مغز

افزایش می یابد و توسط سلول های T دارای CD4⁺ در حال رشد شناسایی می شوند. نتایج این مطالعات توضیحات احتمالی برای نقش مهم سلول های B و همچنین موفقیت درمان ها علیه سلول های B بیان کننده رسپتور آنتی CD-20 در بیماری های مرتبط با T-cell مانند MS را ارائه می دهد [۵].

مارکر CD20 یک فسفو پروتئین گلیکوزیله است که روی سطح پیش ساز لنفوسیت های B و خود لنفوسیت های B بیان می شود. برای این پروتئین هیچ لیگاندی تاکنون شناسایی نشده است و مطالعات زیاد صورت گرفته برپایه آنتی بادی نشان داده که CD20 نقش مهمی در تنظیم تکثیر سلول های B دارد. اگرچه، آنتی بادی های تولید شده ضد CD20، سبب القای تاثیرات ضد تکثیری در *in vitro* می شوند، اما همچنان مکانیسم دقیق مولکولی و عملکرد آن روشن نیست. مارکر CD20، همچنین، برای ایجاد پاسخ ایمنی مناسب سلول های B به ویژه بر علیه آنتی ژن های مستقل از T کاربرد دارد. تاکنون CD20 هدف مناسبی برای طراحی آنتی بادی های مونوکلونال زیادی، از جمله Obinutuzumab، Rituximab، Ofatumumab، Ibritumomab، Tositumomab و Ublituximab بوده است که برای بیماری های مختلفی مانند لنفوم سلول B، لوکمی و بیماری های خودایمنی استفاده می شوند.

ریتوکسیماب یک آنتی بادی مونوکلونال مهندسی شده کایمیریک موشی-انسانی است که برای برخی از بیماران MS تجویز می شود. تیمار ریتوکسیماب باعث کاهش ذخایر و همچنین کاهش سلول های B در حال چرخش در جریان خون می شود و در ادامه سبب کاهش سلول های T خود تکثیر شونده و کاهش پاسخ سایتوکاین های التهابی می شود [۵، ۶]. با وجود تاثیرات مثبت مشاهده شده پس از استفاده از ریتوکسیماب، بررسی ها نشان دادند که پاسخ

^۱ Multiple Sclerosis

درمانی به داروها از جمله ریتوکسیماب در هر فرد متفاوت است [۷]. در نتیجه یافتن شاخصه‌های زمینه ژنتیکی برای شنا سایی بیمارانی که درمان مورد نظر برای آنها بیشترین فایده را دارد، بسیار مفید و مهم خواهد بود [۸].

از مهم‌ترین تنظیم‌کننده‌های مسیر سلول‌های ایمنی و همچنین تنظیم‌کننده بیان ژن‌ها در سطح رونویسی و اپی ژنتیکی می‌توان Long non coding RNAs (lncRNAs) را نام برد، که احتمالاً می‌توانند در یافتن دلایل هتروژنتیتی بین افراد نقش مهمی را بازی کنند. LncRNAs رونوشت‌های غیر کدکننده پروتئین هستند که بیشتر از ۲۰۰ نوکلئوتید طول دارند و به چند دسته antisense، sense، intronic، enhancer RNA، circular و intergenic تقسیم‌بندی می‌شوند. شواهد زیادی نشان می‌دهد که LncRNA ها می‌توانند در مراحل مهم فعالیت نرمال و همچنین غیرطبیعی سلول‌های ایمنی نقش داشته باشند. تاکنون مطالعات مختلف تغییر میزان بیان چندین LncRNA از جمله *NEAT1*، *TUG1*، *FAS-AS1* را در سرم و سلول‌های ایمنی بیمارانی MS نسبت به نمونه کنترل نشان داده‌اند [۹].

TUG1 اولین بار در شبکه چشم موش شنا سایی شد و وجود آن برای رشد شبکه ضروری است. مطالعات در سال ۲۰۱۹ و ۲۰۲۰ نشان دادند که *TUG1* به میزان زیادی در پاسخ التهابی در ایسکمی قلبی و آسیب‌های شدید ریوی دخیل است [۱۰]. براساس یافته‌های موجود، *TUG1* LncRNA نقش بسیار مهمی در تنظیم بیان ژن‌ها بازی می‌کند و نقش‌هایی در مورد تغییرات بیان آن در تنظیم تکثیر، مهاجرت سلولی و آپوپتوز مشاهده شده است. *TUG1* با کمپلکس مهار Polycomb برهمکنش برقرار می‌کند و می‌تواند به صورت اپی ژنتیکی در تنظیم مسیرهای مولکولی نقش داشته باشد. نتیجه بررسی‌های بیوانفورماتیکی بیانگر آن است که *TUG1* پس از رونویسی نیز از طریق اسپانچ کردن microRNA(miR) ها در سیتوپلاسم در تنظیم ژن‌ها از جمله ژن‌های مهم در مسیر

التهابی *IL-1β*، *IL-6*، *IL-10*، *TNFα* نقش به سزایی بازی می‌کند [۱۱]

در حال حاضر از ریتوکسیماب در درمان دسته خاصی از مبتلایان به MS استفاده می‌شود، اما بیماران پاسخ یکسانی به دارو نمی‌دهند. برای یافتن دلیل مولکولی این پاسخ متفاوت و با توجه به اهمیت بالقوه LncRNA ها در تنظیم بیان ژن‌ها، در این مطالعه ابتدا با بررسی‌های بیوانفورماتیکی *TUG1* به عنوان یک کاندید برای ایفای نقش در پاسخ متفاوت به ریتوکسیماب انتخاب شد. در نتیجه بیان ژن *TUG1* در سلول‌های رده لنفوییدی Raji کاهش داده شد و سطح بیان *CD20* و میزان کارایی تیمار ریتوکسیماب بررسی شد. برای این بررسی، ابتدا سلول‌های Raji کشت داده شد و تیمار با دو غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی گرم و ۴۰ میکروگرم بر میلی گرم انجام شد و بیان ژن‌های کاندید پس از تیمار بررسی شد. همچنین، پس از طراحی DNase Zyme اختصاصی برای *TUG1*، ناک داون این ژن در سلول‌ها در حضور و عدم حضور داروی ریتوکسیماب انجام شد. پس از ترنسفکشن، آنالیز نتایج Real-Time PCR نشان داد که بیان رسپتور ریتوکسیماب *CD20* افزایش داشت و در مقابل بیان *SMAD2* به عنوان یکی از تنظیم‌کننده‌های منفی *CD20* کاهش یافت. علاوه بر این، تاثیر کاهش بیان *TUG1* بر چرخه سلولی و میزان آپوپتوز نیز بررسی شد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱ کشت سلول

رده سلولی با منشأ لنفوم بورکیت Raji CD20⁺ از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران خریداری و در فلاسک T25 کشت داده شد. برای رشد و نگهداری سلول‌ها از محیط RPMI (Gibco) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS, Gibco) و ۱ درصد پنی سیلین (۱۰۰ واحد بر میلی لیتر) و استرپتومایسین (۱۰۰ میلی گرم بر میلی لیتر) (Gibco) استفاده شد. برای رسیدن سلول‌ها به حد مطلوب

۳-۲ کاهش بیان *LncRNA TUG1*

۱-۳-۲ طراحی الیگودنوکیسی نوکلئوتید برش دهنده (DNAzyme)

برای کاهش بیان *LncRNA TUG1* از ۲ الیگودنوکیسی نوکلئوتید برش دهنده DNAzyme طراحی شده بر علیه *LncRNA TUG1* RNA استفاده شد. برای طراحی پس از یافتن نواحی مشترک بین واریانت‌های مختلف *TUG1* توسط سایت Clustal^۲ Omega، طراحی توالی‌های تک رشته DNA با طول ۳۲ و ۳۱ نوکلئوتید توسط نرم‌افزارهای Oligo7 و NCBI-Blast انجام شد. همچنین، برای بررسی تشکیل ساختارهای ثانویه درون رشته mRNA هدف، از نرم‌افزار پیش‌بینی ساختار دوم RNA به نام RNAfold^۳ و rna.urme.rochester.edu استفاده شد. توالی DNAzyme های استفاده شده در جدول ۱ آورده شده است [۱۳].

از لحاظ تعداد و مورفولوژی، سلول‌ها در حضور CO₂ ۵ درصد و در ۳۷ درجه سانتی‌گراد در انکوباتور نگهداری شدند. سپس، این سلول‌ها برای انجام آزمایش‌های بعدی استفاده شدند.

۲-۲ تیمار سلول Raji با داروی ریتوکسیماب

برای یافتن غلظت مناسب داروی ریتوکسیماب (شرکت آریژن لب، ۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)، آزمون MTT^۱ انجام شد و براساس نتایج به‌دست آمده دو غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌گرم و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌گرم از داروی ریتوکسیماب انتخاب شد. غلظت‌های دارویی به‌صورت تازه و با استفاده از محیط‌کشت به‌عنوان حلال تهیه شد. سلول‌های Raji در شرایط ذکر شده تکثیر شدند و در پلیت ۱۲ خانه به تعداد ۵×۱۰^۴ سلول کشت شدند. سلول‌های Raji به مدت ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار و از آن‌ها در مقایسه با سلول‌های کنترل برای آنالیز بیان ژن استفاده شد [۱۲].

نام ژن	توالی	Tm	محصول (bp) PCR
B actin, NM_001101.5	F:TAAGGAGAAGCTGTGCTACGTC	۶۶	261
	R:AGCACTGTGTTGGCGTACAGGTC	۷۲	
TUG1 DNAzyme	ACTGGCTTCAGGCTAGCTACAACGATCTCTACATCG		-
	AAACGCTGTCAGGCTAGCTACAACGACAGGATTCAAG		
TUG1, NR_152871.1	F:GCTCTCTTTACTGAGGGTGCTT	۶۶	304
	R:GGATCTGTCAAGTCTCAATGTTGG	۷۰	
CD20, NM_152866.3	F:TGCTCCAGACCCAAATCTAAC	۶۲	296
	R:CTCTTGAAGCTATGAACAC	۵۸	
SMAD2, NM_001003652.4	F:GTCAAAAGTACGATGTGGTTCC	۶۴	266
	R:CACAGGTAAGAGCAACAAG	۶۲	
TP53, NM_001407269.1	F:GCTCAGATAGCGATGGTCTGGC	۷۰	156
	R:AGTGGATGGTGGTACAGTCAGAG	۵۸	

جدول ۱ توالی پرایمرها و DNAzyme مورد استفاده در این تحقیق در جدول زیر ارائه شده است.

^۳ <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>

^۱ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

^۲ <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

۲-۳-۲ ترانسفکشن DNAzyme TUG1 به درون سلول‌های Raji

برای ترانسفکشن DNAzyme ها به سلول‌های Raji، تعداد 7×10^4 سلول Raji درون هر چاهک در پلیت ۱۲ خانه کشت داده شد. در ادامه DNAzyme های طراحی شده با ۲۰۰ میکرولیتر محیط کشت فاقد سرم و با استفاده از TurboFect™ (Thermo Fisher Scientific, USA) به سلول‌ها ترانسفکشن شد. چاهک حاوی سلول بدون اضافه کردن DNAzyme به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. برای اطمینان از عملکرد صحیح توربوفاکت و انجام صحیح روند ترانسفکشن سلول‌ها، از یک وکتور بیان کننده پروتئین GFP^۵ به عنوان کنترل ترانسفکشن استفاده شد.

۲-۳-۳ استخراج RNA و سنتز cDNA

برای بررسی میزان تغییرات بیان ژن‌های مورد نظر در سلول‌های ترانسفکشن شده با DNAzyme، استخراج RNA از سلول‌های تیمار شده و کنترل پس از گذشت ۳۰ ساعت از زمان ترانسفکشن انجام شد. RNA کل از سلول‌های Raji بر اساس روش فنول-کلروفرم و توسط سلول‌های Raji (Gene All, Korea) و طبق دستورالعمل شرکت سازنده استخراج شد. کیفیت و کمیت RNA استخراج شده به ترتیب توسط الکتروفورز روی ژل آگارز و دستگاه اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. سنتز cDNA به وسیله کیت سنتز cDNA (Biofact, Korea) و با $3 \mu\text{g}$ از RNA کل و ۲۰۰ واحد از آنزیم رونوشت بردار معکوس و به کمک پرایمرهای الیگو dT و Random hexamer (MWG, Germany) و مطابق با دستورالعمل کیت شرکت سازنده (بیوفکت) انجام شد.

۲-۳-۴ طراحی پرایمر

توالی ژن‌های *ACT-B*، *TUG1*، *CD20*، *SMAD2* از بانک ژن NCBI بدست آمد. پس از کنار هم قرار دادن

ترانسکرپت‌های تایید شده با استفاده از سایت Clustal Omega از ژن‌های هدف پرایمرهای اختصاصی ژن‌ها برای نواحی مشترک و با استفاده از نرم‌افزار Oligo7 طراحی شد. سپس با استفاده از NCBI BLAST از اختصاصی بودن محل اتصال پرایمرها اطمینان حاصل شد (جدول ۱). در این مطالعه از ژن بتا اکتین انسانی به عنوان ژن کنترل داخلی برای نرمال کردن آنالیز بیان ژن‌ها استفاده شده است.

۲-۳-۵ آنالیز بیان ژن‌ها با تکنیک RT-qPCR

سطح بیان ژن‌های *ACT-B*، *TUG1*، *CD20*، *SMAD2* با روش qPCR اندازه گیری شد. PCR توسط دستگاه Applied Biosystems StepOne (Applied Biosystems, USA) و با استفاده از ۱۰ نانوگرم از cDNA، ۲ میکرولیتر از مستر EvaGreen (5X, Solis BioDyne, Estonia) و ۴ پیکومولار از هر کدام از پرایمرهای پیش‌برنده^۶ و برگرداننده^۷ در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر انجام شد. تمام واکنش‌ها با حداقل ۲ بار تکرار انجام شد. شرایط دمایی واکنش شامل: دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۵ به مدت ۱۵ دقیقه، به دنبال آن ۴۰ سیکل دناتوراسیون در ۹۵ درجه به مدت ۱۵ ثانیه، دمای اتصال پرایمرها در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۲۰ ثانیه و تکثیر در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه بود. برای اطمینان از صحت عملکرد پرایمرها و تک باند بودن محصولات PCR آنالیز منحنی ذوب انجام شد و محصولات PCR روی ژل PAGE نیز بررسی شد.

۲-۴ بررسی چرخه سلولی و آپوپتوز به وسیله

فلوسایتومتری

برای بررسی اثر زیستی کاهش بیان *LncRNA TUG1* بر چرخه سلولی و میزان آپوپتوز در سلول Raji، سلول‌ها کشت داده شدند و DNAzyme *TUG1* با استفاده از

^۷ Revers

^۵ PGFP-V-RS scramble vector

^۶ Forward

توریوفکت به سلول‌ها ترنسفکت شد و پس از گذشت زمان ۳۰ ساعت سانتیفریوژ شدند و برای انجام فلوسایتومتری طبق پروتوکل آماده شدند. میزان تغییرات آپپتوز در سلول‌ها با استفاده از کیت Annexin-PI و دستگاه فلو سیتومتری (BD FACS Calibur, San Jose, CA, USA) ارزیابی شد.

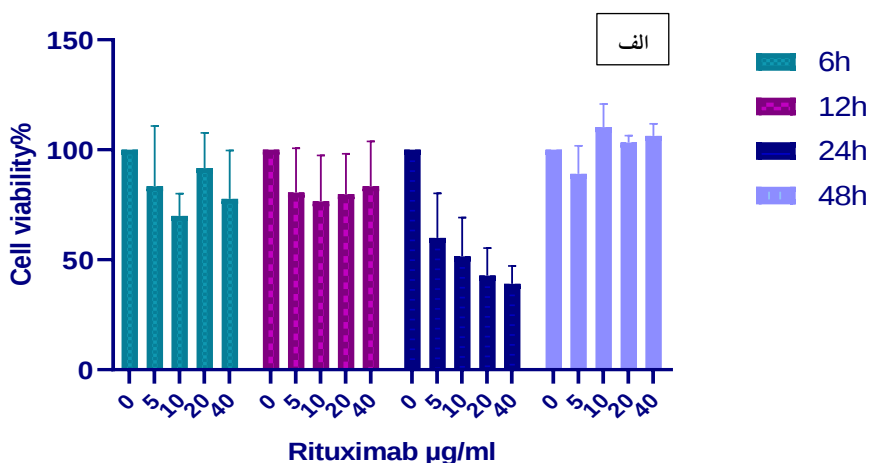
۲-۵ آنالیز آماری

آنالیزهای آماری و رسم نمودارها توسط نرم‌افزار (Graph Pad prism (Version 8 انجام شد. آنالیز بیان ژن به صورت کمی با استفاده از فرمول $2^{-\Delta CT}$ جهت محاسبه سطح بیان و $2^{-\Delta\Delta CT}$ برای محاسبه مقدار fold change انجام شد [۱۴]. همچنین برای مقایسه دو گروه از آزمون آماری unpaired Student T-test استفاده شد. نتایج برای هر گروه با میانگین و خطای استاندارد از میانگین (Mean $\pm$ SEM) نشان داده شدند. سطح معنی‌داری $P \leq 0.05$ در نظر گرفته شد.

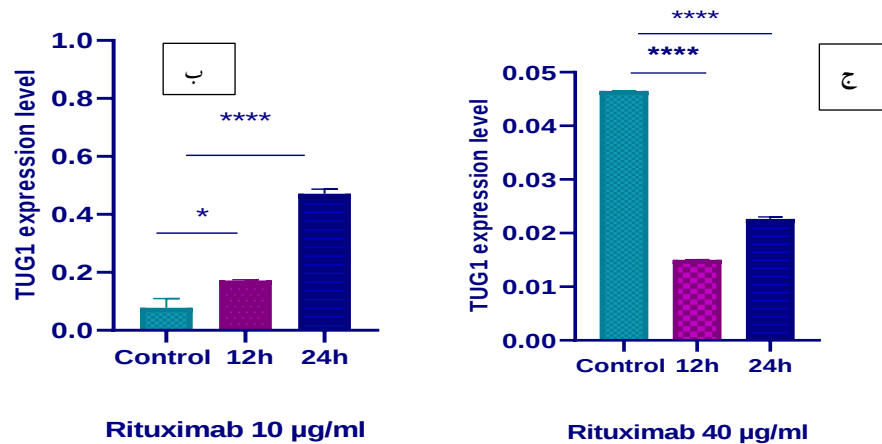
۳- نتایج

۳-۱ بررسی تغییرات بیان ژن *TUG1* تحت تیمار داروی ریتوکسیماب

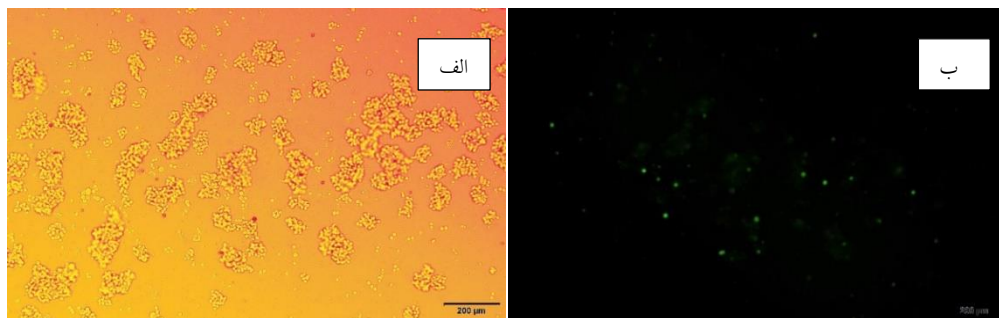
برای بررسی تغییرات بیان *TUG1* تحت تیمار داروی ریتوکسیماب، لازم بود ابتدا غلظت مناسب تعیین شود. از این رو سلول‌ها با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در زمان‌های ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار شدند. سپس، زنده‌مانی سلول‌ها و تاثیر سیتوتوکسیک ریتوکسیماب با کمک تست MTT بررسی شد (شکل ۱، الف) برای ساس نتایج به‌دست آمده از MTT و بیان ژن‌های کاندید تحت تیمار دارویی، دو غلظت ۱۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از داروی ریتوکسیماب برای مطالعه انتخاب شد. آنالیز بیان ژن *TUG1* در غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از دارو افزایش بیان وابسته به زمان را نشان داد. به این صورت که در دوز ۱۰ میکروگرم افزایش معنی‌داری در ۱۲ ساعت (P -value= 0.0149) و در ۲۴ ساعت (P -value= 0.0001) در سطح بیان *TUG1* مشاهده شد (شکل ۱، ب). در مقابل تیمار سلول‌های Raji در دوز ۴۰ میکروگرم سبب کاهش معنی‌دار بیان ژن *TUG1* به صورت وابسته به زمان در ۱۲ ساعت (P -value= 0.0001) و در ۲۴ ساعت (P -value= 0.0001) شد (شکل ۱، ج).



⁸ BD FACS Calibur (BD biosciences, San Jose, CA, USA)



شکل ۱۰. بررسی بیان *LncRNA TUG1* تحت تیمار داروی ریتوکسیماب. (ب) در دوز 10ug/ml پس از ۱۲ (P value= 0.0149) و ۲۴ ساعت (P value=0.0001) بیان *TUG1* به صورت وابسته به زمان به طور معنی دار افزایش یافت. (ج) در دوز 40ug/ml در هر دو زمان ۱۲ (P value=0.0001) و ۲۴ (P value= 0.0001) ساعت کاهش بیان *TUG1* مشاهده شد.



شکل ۱۲. ترانسفکشن وکتور بیان کننده GFP به سلول Raji با استفاده از توربوفکت. (الف) سلول Raji با نور مرئی؛ (ب) سلول Raji ترانسفکت شده به وسیله وکتور PGFP-V-RS.

فلورسنت (Olympus IX53) مشاهده شدند. نور سبزرنگی که از سلول‌های ترانسفکت شده تابیده می‌شود، بیانگر موفقیت آمیز بودن روند انجام ترانسفکشن است. تصاویر مربوط به تصویربرداری از سلول‌های ترانسفکت شده در شکل ۲ (الف، ب) نشان داده شده است.

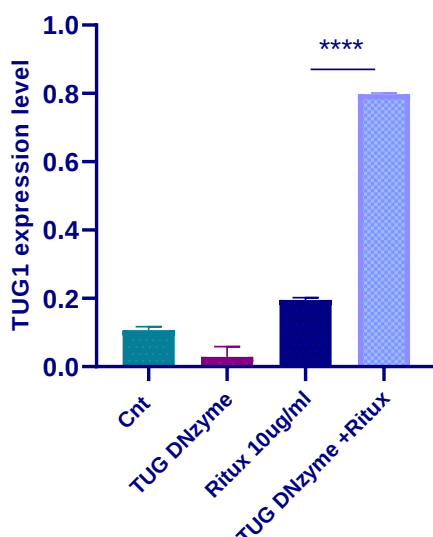
۳-۳ بررسی عملکرد *TUG1*-DNAzyme

برای بررسی عملکرد DNAzyme استفاده شده، بیان ژن *TUG1* پس از ترانسفکشن کردن با آن بررسی شد (شکل ۳). نتایج RT-PCR کمی بیانگر توانایی DNAzyme

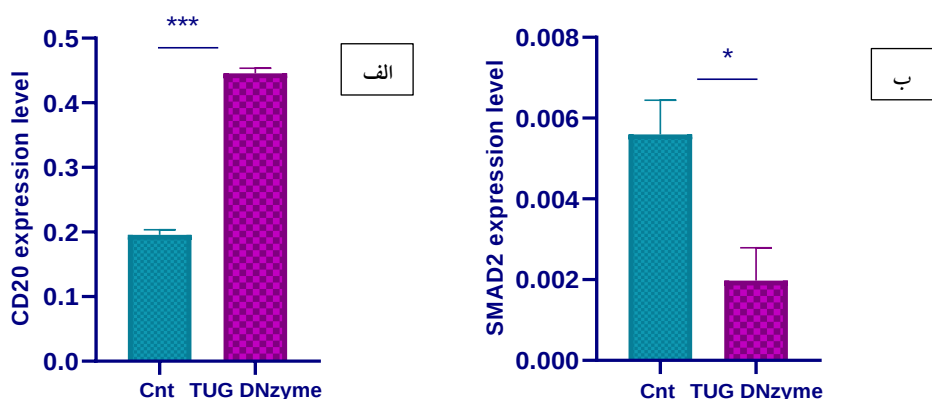
۲-۳ بررسی صحت ترانسفکشن سلول‌های Raji با DNAzyme طراحی شده برای RNA غیر کدکننده *TUG1* برای بررسی عملکرد ژن *TUG1* در سلول‌های Raji، DNAzyme اختصاصی ژن به سلول‌ها ترانسفکت شد. برای تایید صحت روند ترانسفکشن از پلاسמיד کدکننده پروتئین GFP به عنوان کنترل استفاده شد. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، برای ردیابی رنگ سبز مربوط به بیان ژن GFP، سلول‌ها در شرایط کاملاً استریل با میکروسکوپ

TUG1 مورد بررسی قرار گرفت و نتایج نشان دهنده افزایش بیان TUG1 بود (P-value=0.0001) پس از تیمار بود.

طراحی شده در کاهش بیان ژن TUG1 نسبت به گروه کنترل بود (P-value= 0.07) در بازه زمانی ۳۰ ساعت پس از ترانسفکت سلول‌ها بود. همچنین، برای بررسی عملکرد DNzyme در حضور داروی ریتوکسیماب نیز بیان ژن



شکل ۳ بررسی میزان کاهش بیان ژن هدف به وسیله DNzyme طراحی شده در کاهش دادن بیان ژن هدف. کاهش سطح بیان lncRNA TUG1 در نمونه ترانسفکت شده نسبت به نمونه کنترل و افزایش سطح بیان TUG1 در نمونه‌ای که به‌طور همزمان تیمار ریتوکسیماب و DNzyme دریافت کرده است (P-value=0.0001).



شکل ۴ بررسی تاثیر کاهش بیان TUG1 بر بیان ژن‌های CD20 و SMAD2. الف) افزایش حدوداً دوبرابری (Foldchange:2.24) میزان CD20 در اثر ناک داون TUG1 نسبت به سلول کنترل (P-value=0.001). ب) کاهش سطح بیان SMAD2 به حدود نصف (Foldchange:0.41) در اثر کاهش بیان TUG1 (P-value=0.0488).

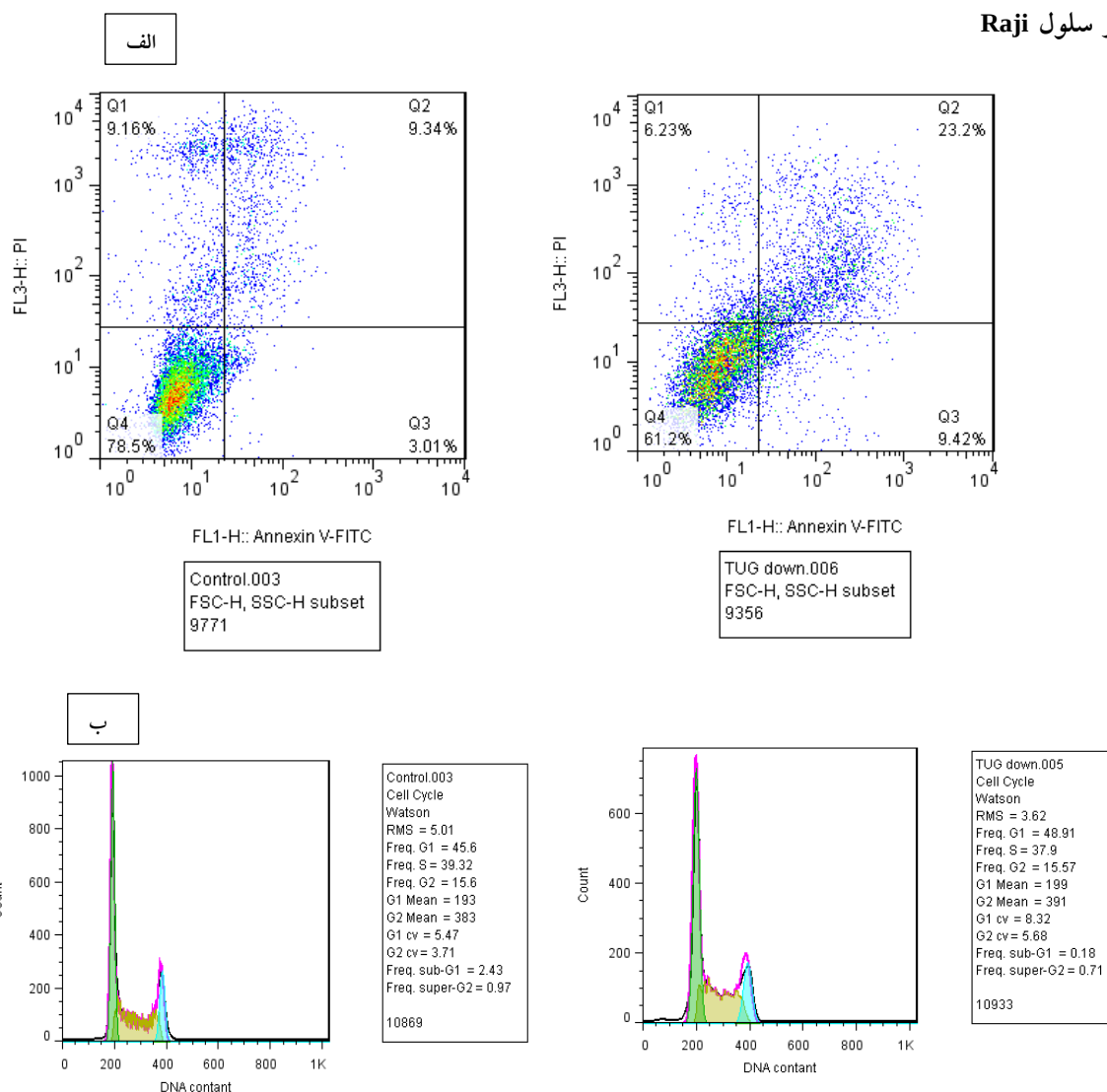
۳-۴ بررسی اثر ترانسفکشن *TUG1*-DNAzyme بر بیان

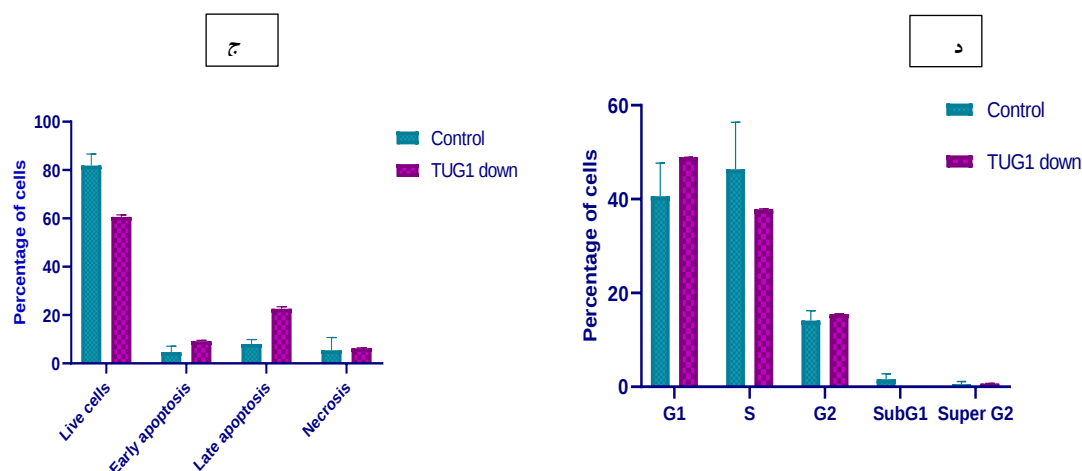
CD20 و *SMAD2*

برای مطالعه تاثیر کاهش بیان ژن *TUG1* بر مقدار بیان گیرنده داروی ریتوکسیماب و همچنین مسیر *SMAD2*، بیان ژن در سلول‌های تیمار شده با DNAzyme بررسی شد. آنالیز بیان ژن‌های *CD20* و *SMAD2* بیانگر افزایش میزان بیان *CD20* (Foldchange:2.24, P-value= 0.001) و همچنین کاهش بیان ژن *SMAD2* به صورت معنی دار و همچنین کاهش بیان ژن *SMAD2* (P-value=0.0488, Foldchange= 0.41) بود (شکل ۴، الف و ب).

۳-۵ بررسی اثر ترانسفکشن بر چرخه سلولی و آپوپتوز

در سلول *Raji*





شکل ۵ بررسی اثر کاهش بیان ژن *TUG1* بر آپوپتوز و سیکل سلولی در سلول Raji. الف) نمودارهای حاصل از فلوسایتومتری Annexin-FITC نشان دهنده افزایش آپوپتوز و کاهش تعداد سلول‌های زنده پس از ترانسفکشن ب) نمودارهای حاصل از چرخه سلولی نشان دهنده افزایش G1 و کاهش SubG1 در سلول ترانسفکت شده. ج و د) نمودار کمی حاصل از نتایج به دست آمده از انجام آنالیز فلوسایتومتری برای ارزیابی مقدار آپوپتوز و سیکل سلولی.

۴- بحث

مولتیپل اسکلروزیس (MS) شایع ترین اختلال مزمن دمیeline کننده سیستم عصبی مرکزی (CNS) است. تخمین زده شده که در سال ۲۰۲۰ بیش از ۲/۸ میلیون نفر در سراسر جهان به آن مبتلا شده‌اند. مشخص شده که در پاتوزن این بیماری علاوه بر لنفوسیت‌های T، سلول‌های B نیز با تولید آنتی‌بادی و پاسخ‌های سائتوکائینی شامل سائتوکائین‌های التهابی نقش دارند که خود توانایی القای پاسخ‌های Th1 و Th17 را دارد. در برخی موارد کاهش دادن سلول‌های B از طریق آنتی‌بادی‌های ضد *CD20* یکی از درمان‌های موثر در برخی از موارد MS است.

ریتوکسیماب یک آنتی‌بادی مونوکلونال و اولین داروی طراحی شده علیه *CD20* است که در درمان بیماری MS استفاده می‌شود. بررسی‌ها نشان داده که استفاده از ریتوکسیماب سبب کاهش فعالیت التهابی و همچنین کاهش تعداد حملات و جلوگیری از تشکیل ضایعات جدید در مغز بیماران RRMS می‌شود [۱۷-۱۵]. Czuczman و همکاران نشان دادند که در بیماری‌های

مختلف از جمله MS و لنفوم، احتمال عود مجدد و ایجاد مقاومت به ریتوکسیماب وجود دارد. مکانیسم‌های مختلفی برای ایجاد مقاومت پیشنهاد شده است که یکی از آنها کاهش یافتن سطح رسپتور دارو بر روی سلول‌های B می‌باشد. مطالعات متفاوتی نشان دادند که در سلول‌های مقاوم شده نسبت به سلول‌های حساس به داروی ریتوکسیماب میزان بیان و سطح پروتئینی *CD20* کاهش چشمگیری پیدا می‌کند [۱۸]. از این رو، پیدا کردن مولکول‌های تنظیم کننده بیان این رسپتور از اهمیت بالایی برخوردار است. یکی از کاندیدهای احتمالی تنظیم کننده *CD20*، می‌تواند RNAهای غیر کدکننده بلند از جمله *TUG1* باشد.

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که در ابتدا به دنبال تیمار ریتوکسیماب در سلول Raji بیان *TUG1*، به صورت وابسته به غلظت تحت تاثیر قرار گرفت. بدین شکل که غلظت ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در ۱۲ و ۲۴ ساعت تیمار دارو به صورت وابسته به زمان سبب افزایش سطح بیان *TUG1* شد، در حالی که در غلظت ۴۰ میکروگرم بر

میلی لیتر در همین ساعات به صورت وابسته به زمان کاهش بیان مشاهده شد. مطالعات مختلفی نشان دادند که اتصال ریتوکسیماب به *CD20* می تواند سبب راه اندازی مسیرهای سیگنالینگ متفاوتی در سلول شود. به طور مثال، اتصال دارو به *CD20* منجر به فعال شدن فسفولیپاز $C\gamma$ می شود که این فعال سازی از طریق کینازهای خانواده SRC انجام می شود. اثرات پلیوتروپیک $PLC-\gamma$ شامل فعال سازی MAP کیناز و به طور خاص JNK، ERK و p38MAPK است که در مسیر مولکولی ریتوکسیماب دخیل هستند [۱۹]. در سال های ۲۰۱۶ و ۲۰۱۷ مشخص شد که ریتوکسیماب سبب القای مسیر Notch1 پس از اتصال به سلول های CLL می شود و از سویی نشان داده شد که Notch1 یکی از مسیرهای فعال کننده *TUG1* در سلول های گلیوما است [۲۰، ۲۱]. در نتیجه القای *TUG1* در دوز ۱۰ میکروگرم ریتوکسیماب ممکن است به دلیل مولکول های حد واسطه القا شده توسط دارو از جمله مسیر Notch1 باشد. همچنین، مطالعه پروموتور *TUG1* توسط E- b Zhang و همکاران نشان دهنده حضور ناحیه هدف برای اتصال به P53 در آن است. این گروه با استفاده از تکنیک ر سوب دهی کروماتین و لو سیفراز نشان دادند که *TUG1* به طور مستقیم به و سیله P53 القا می شود [۲۲]. از سویی مطالعات Weijie Zhong و همکاران نیز بیانگر سرکوب P53 توسط ریتوکسیماب می باشد. به این ترتیب که نشان دادند تیمار ریتوکسیماب سبب القای IL-6 و در ادامه القای IL-17A می شود، که در نهایت القای IL-17 منجر به سرکوب بیان P53 می شود [۲۳]. با توجه بر داده های مطالعات قبلی مبنی بر تنظیم منفی P53 توسط ریتوکسیماب، در این مطالعه نیز بیان P53 پس از تیمار در دو دوز ۱۰ و ۴۰ میکروگرم بر میلی لیتر بررسی شد و روند کاهش بیان P53 با افزایش دوز ریتوکسیماب مشاهده شد (نتایج نشان داده نشده است). در نتیجه با توجه به اینکه P53 سبب القای *TUG1* می شود و از سویی ریتوکسیماب

باعث کاهش P53 به صورت وابسته به دوز می شود، بنظر می رسد که در مطالعه حاضر نیز کاهش بیان *TUG1* با افزایش دوز دارو، تایید کننده همین نتایج و البته وجود سایر عناصر تنظیمی احتمالی وابسته به دوز دارو می باشد. از سوی دیگر، مطالعات نشان دادند که *TUG1* در چندین مسیر بیولوژیکی و در بیماری های انسانی نقش به سزایی بازی می کند. این LncRNA از روش های متفاوت از جمله اپی ژنتیکی و کنترل ترجمه می تواند سبب تنظیم بیان ژن های زیادی شود. بنابراین، در این مطالعه برآن شدیم که تاثیر این ژن را بر تنظیم بیان ژن *CD20* به عنوان ریسپتور داروی ریتوکسیماب بررسی کنیم. نتایج مطالعه حاضر نشان داد که کاهش بیان *TUG1* با استفاده از DNase منجر به افزایش سطح بیان *CD20* در سلول های Raji می شود. در ادامه حد واسطه های احتمالی بین این LncRNA و *CD20* به صورت بیوانفورماتیک (<https://starbase.sysu.edu.cn/>) و با کمک مقالات مطالعه شد. یکی از این تنظیم کننده های حد واسطه SMAD2/3 می باشد که مطالعات بیانگر برهمکنش آن با *TUG1* و *CD20* می باشد. در مطالعه ای Kawabata و همکاران نشان دادند که فعال شدن مسیر سیگنالینگ $TGF-\beta$ همبستگی منفی با میزان بیان *CD20* دارد. در این مسیر SMAD2/3 در حضور $TGF\beta$ به پروموتور *CD20* فراخوانی شده و سبب کاهش بیان آن می شود و از طرف دیگر مهارکننده های $TGF\beta$ می توانند سبب افزایش بیان *CD20* شوند. در نتیجه SMAD2/3 یک تنظیم گر منفی *CD20* می باشد. از سوی دیگر در مطالعه ای در سال ۲۰۲۰ نشان داده شد که *TUG1* از طریق اسپانچ کردن microRNA 222-3p میتواند SMAD2/7 را تنظیم کند [۲۴، ۲۵]. در مطالعه حاضر نیز کاهش سطح بیان *SMAD2* و نیز افزایش سطح بیان *CD20* در سلول های Raji پس از ناک داون *TUG1* مشاهده شد، که با یافته های مطالعات

قبلی مبنی بر تنظیم منفی پروموتور *CD20* توسط *SMAD*ها و تنظیم *SMAD*ها توسط *TUG1* مطابقت دارد. تیمار سلولی با داروی ریتوکسیماب باعث افزایش بیان *TUG1* نسبت به کنترل می شود. در سلول هایی که بیان ژن *TUG1* در آن کاهش یافته و با ریتوکسیماب نیز تیمار شدند، افزایش بیان *TUG1* مشاهده شد، که احتمالاً به دلیل تاثیر بیشتر مکانیسم های فعال شونده به وسیله ریتوکسیماب نسبت به کاهش بیان القا شده توسط *DNAzyme* است. همچنین، ممکن است پاسخ سلولی برای جبران این کاهش بیان به همراه تاثیر تیمار ریتوکسیماب به صورت هم افزون عمل کرده باشند. برای بررسی میزان اثر گذاری کاهش بیان *TUG1* بر سیکل های متفاوت چرخه سلولی و همچنین بر میزان آپوپتوز سلول های *Raji*، فلوسایتومتری انجام شد. در این مطالعه ناک داون کردن *TUG1* به وسیله *DNAzyme* سبب افزایش میزان آپوپتوز در فاز ابتدایی و انتهایی و کاهش تعداد سلول های زنده، شد. همچنین، مرحله S از چرخه سلولی کاهش و مرحله G1 و SubG1 افزایش یافت، که نشان دهنده کاهش تکثیر سلولی و افزایش مرگ برنامه ریزی سلولی با کاهش *TUG1* می باشد. *TUG1* توانایی راه اندازی یک فرایند بیولوژیکی یکسان را از طریق تنظیم ژن های هدف متفاوت در انواع رده های سلولی دارد. یکی از نقش های اصلی *TUG1* تنظیم بیان ژن ها و تاثیر گذاری بر تکثیر سلولی است. تعدیل بیان *TUG1* سطح ژن های متعددی را در سلول های سرطانی مختلف تغییر می دهد. تعداد متنوعی از ژن ها به طور مستقیم یا به وسیله مولکول ها و ژن های حد واسط، توسط *TUG1* مورد هدف قرار می گیرند، از جمله *p53* و *KLF2* و *BAX*؛ که از تنظیم کننده های تکثیر سلولی و آپوپتوز هستند. مشابه نتایج مطالعه حاضر، در مطالعه ای دیگر نیز نشان داده شد که در سلول های اپی تلیالی سرطان تخمدان، *TUG1* سبب مهار آپوپتوز و افزایش تکثیر سلولی می شود.

علاوه بر این، سرکوب *TUG1* در سلول های کارسینوم سلول سنگفرشی دهان منجر به کاهش تکثیر در شرایط آزمایشگاهی شد. همچنین، در سلول های سرطان پانکراس نیز ناک داون *TUG1* باعث مهار رشد و تکثیر سلول شد [۲۶، ۲۷]. در سال ۲۰۱۹ نیز در یک مطالعه دیگری روی سلول های تروفوبلاست نشان داده شد که خاموش کردن ژن *TUG1* سبب مهار تکثیر سلولی و در مقابل افزایش بیان آن منجر به افزایش تکثیر سلولی می شود [28]. اما از سوی دیگر نشان داده شده که ناک داون *TUG1* به طور قابل توجهی تکثیر سلول های نوعی سرطان ریه را با تنظیم منفی *CELF1* افزایش می دهد [26]. مطالعات بسیاری نقش *TUG1* را در تکثیر و آپوپتوز سلول ها بررسی کردند و براساس رده سلولی و روش تست یا مدل بیماری مورد مطالعه به نتایج متفاوتی دست یافتند.

۵- نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که ناک داون *TUG1* منجر به فعال سازی مکانیسم های حد واسطی می شود که سبب افزایش سطح بیان ژن *CD20*، به عنوان رسپتور داروی ریتوکسیماب می شود. این افزایش بیان خود می تواند زمینه ساز افزایش اتصال ریتوکسیماب به سلول B و در نتیجه افزایش میزان آپوپتوز از طریق مسیر مولکولی دارو شود. همچنین، از سوی دیگر کاهش *TUG1* در سلول، خود به تنهایی می تواند منجر به افزایش آپوپتوز و کاهش تکثیر سلولی شود. در مطالعه ی حاضر به بررسی اثر تنظیمی *TUG1* بر بیان *CD20* پرداخته شد. به طور کلی، نتایج این مطالعه نشان می دهد که *LncRNA TUG1* می تواند یکی از اهداف درمانی برای جلوگیری از ایجاد مقاومت سلولی به داروی ریتوکسیماب محسوب شود و بررسی بیان این *LncRNA* در نمونه خون بیماران MS مقاوم و حساس به داروی ریتوکسیماب، می تواند در ادامه مسیر مدنظر قرار گیرد.

Favorova, "Pharmacogenetics of multiple sclerosis: Personalized therapy with immunomodulatory drugs," *Pharmacogenet. Genomics*, vol. 26, no. 3, pp. 103–115, 2016, doi: 10.1097/FPC.0000000000000194.

[9] C. Fenoglio *et al.*, "LncRNAs expression profile in peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients," *J. Neuroimmunol.*, vol. 324, no. August, pp. 129–135, 2018, doi: 10.1016/j.jneuroim.2018.08.008.

[10] Q. M. Liu *et al.*, "Silencing lncRNA TUG1 Alleviates LPS-Induced Mouse Hepatocyte Inflammation by Targeting miR-140/TNF," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 8, no. February, pp. 1–11, 2021, doi: 10.3389/fcell.2020.616416.

[11] C. Guo, Y. Qi, J. Qu, L. Gai, Y. Shi, and C. Yuan, "Pathophysiological Functions of the lncRNA TUG1," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 26, no. 6, pp. 688–700, 2019, doi: 10.2174/1381612826666191227154009.

[12] Y. Li *et al.*, "Effects of complement and serum IgG on rituximab - dependent natural killer cell - mediated cytotoxicity against Raji cells," pp. 339–347, 2019, doi: 10.3892/ol.2018.9630.

[13] Behmanesh, M ; Moradi, "Evaluation of the role of long noncoding RNAs lnc-DC and TUG1 on the regulation of BDNF expression and cell cycle," *Tarbiat Modares*, 1398.

[14] S. T. Livak KJ, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. Methods," no. 2001 Dec;25(4):402–8., doi: doi: 10.1006/meth.2001.1262.

[15] N. Nissimov *et al.*, "B cells reappear less mature and more activated after their anti-CD20-mediated depletion in multiple sclerosis," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 117, no. 41, pp. 25690–25699, 2020, doi: 10.1073/pnas.2012249117.

[16] C. G. Chisari, E. Sgarlata, S. Arena, S. Toscano, M. Luca, and F. Patti, "Rituximab for the treatment of multiple sclerosis: a review," *J. Neurol.*, vol. 269, no. 1, pp. 159–183, 2022, doi: 10.1007/s00415-020-10362-z.

[17] S. Brancati, L. Gozzo, L. Longo, D. C. Vitale, and F. Drago, "Rituximab in Multiple Sclerosis: Are We Ready for Regulatory Approval?," *Front. Immunol.*, vol. 12, no. July, 2021, doi: 10.3389/fimmu.2021.661882.

[18] M. S. Czuczman *et al.*, "Acquirement of rituximab resistance in lymphoma cell lines is associated with both global CD20 gene and protein down-regulation regulated at the pretranscriptional and posttranscriptional levels," *Clin. Cancer Res.*, vol. 14, no. 5, pp. 1561–1570, 2008, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1254.

[19] M. R. Smith, "Rituximab (monoclonal anti-CD20 antibody): mechanisms of action and

تشکر و قدردانی: پژوهش حاضر بخشی از رساله دانشجویی دکتری ژنتیک مولکولی مصوب دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس است.

تأییدیه اخلاقی:
http://ethics.research.ac.ir/IR.MODARES.REC.139
8.078

تعارض منافع: هیچ گونه تعارض منافی وجود ندارد.

سهام نویسندگان: محبوبه رجحان نژاد (طراحی اجرایی - علمی) و نگارنده مقاله، مهرداد بهمنش (طراحی علمی)، عبدالرضا ناصر مقدسی و عباس نیک روش (مشاور علمی)
منابع مالی: حمایت مالی این مطالعه توسط دانشگاه تربیت مدرس و صندوق حمایت از پژوهشگران کشور انجام شده است.

۶- منابع

- [1] C. Du and X. Xie, "G protein-coupled receptors as therapeutic targets for multiple sclerosis," *Cell Res.*, vol. 22, no. 7, pp. 1108–1128, 2012, doi: 10.1038/cr.2012.87.
- [2] B. N. Gargari, M. Behmanesh, and M. A. Sahraian, "Effect of vitamin D treatment on interleukin-2 and interleukin-4 genes expression in multiple sclerosis," *Physiol. Pharmacol.*, vol. 19, no. 1, pp. 14–21, 2015.
- [3] K. Cervantes-Gracia and H. Husi, "Integrative analysis of Multiple Sclerosis using a systems biology approach," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, pp. 1–14, 2018, doi: 10.1038/s41598-018-24032-8.
- [4] T. Olsson, L. F. Barcellos, and L. Alfredsson, "Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis," *Nat. Rev. Neurol.*, vol. 13, no. 1, pp. 26–36, 2016, doi: 10.1038/nrneurol.2016.187.
- [5] I. Jelcic *et al.*, "Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis," *Cell*, vol. 175, no. 1, pp. 85–100.e23, 2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.08.011.
- [6] A. Abulayha, A. Bredan, H. El Enshasy, and I. Daniels, "Rituximab: Modes of action, remaining dispute and future perspective," *Futur. Oncol.*, vol. 10, no. 15, pp. 2481–2492, 2014, doi: 10.2217/fon.14.146.
- [7] V. F. Cuzzola *et al.*, "Pharmacogenomic update on multiple sclerosis: A focus on actual and new therapeutic strategies," *Pharmacogenomics J.*, vol. 12, no. 6, pp. 453–461, 2012, doi: 10.1038/tpj.2012.41.
- [8] E. Tsareva, O. Kulakova, A. Boyko, and O.

periodontal ligament stem cell through sponging microRNA-222-3p to negatively regulate Smad2/7," *Arch. Oral Biol.*, vol. 117, 2020, doi: 10.1016/j.archoralbio.2020.104814.

[25] K. C. Kawabata, S. Ehata, A. Komuro, K. Takeuchi, and K. Miyazono, "TGF- β -induced apoptosis of B-cell lymphoma Ramos cells through reduction of MS4A1/CD20," *Oncogene*, vol. 32, no. 16, pp. 2096–2106, 2013, doi: 10.1038/onc.2012.219.

[26] H. Zhou, L. Sun, and F. Wan, "Molecular mechanisms of TUG1 in the proliferation, apoptosis, migration and invasion of cancer cells (Review)," *Oncol. Lett.*, vol. 18, no. 5, pp. 4393–4402, 2019, doi: 10.3892/ol.2019.10848.

[27] C. Qin and F. Zhao, "Long non-coding RNA TUG1 can promote proliferation and migration of pancreatic cancer via EMT pathway," pp. 2377–2384, 2017.

[28] Q. Li *et al.*, "lncRNA TUG1 modulates proliferation, apoptosis, invasion, and angiogenesis via targeting miR-29b in trophoblast cells," *Hum. Genomics*, vol. 13, no. 1, p. 50, 2019, doi: 10.1186/s40246-019-0237-z.

resistance," pp. 7359–7368, 2003, doi: 10.1038/sj.onc.1206939.

[20] J. Edelmann *et al.*, "Rituximab Activates NOTCH1 Signaling in CLL Cells and Induces Changes in the Cytokine Repertoire Favoring a Tumor-Protective Microenvironment," *Blood*, vol. 130, no. Supplement 1, pp. 2996–2996, 2017, doi: 10.1182/blood.V130.Suppl_1.2996.2996.

[21] K. Katsushima *et al.*, "Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment," *Nature Communications*, vol. 7, 2016, doi: 10.1038/ncomms13616.

[22] E. b. Zhang *et al.*, "P53-regulated long non-coding RNA TUG1 affects cell proliferation in human non-small cell lung cancer, partly through epigenetically regulating HOXB7 expression.," *Cell Death Dis.*, vol. 5, pp. 1–12, 2014, doi: 10.1038/cddis.2014.201.

[23] W. Zhong *et al.*, "Increased interleukin-17A levels promote rituximab resistance by suppressing p53 expression and predict an unfavorable prognosis in patients with diffuse large B cell lymphoma," *Int. J. Oncol.*, vol. 52, no. 5, pp. 1528–1538, 2018, doi: 10.3892/ijo.2018.4299.

[24] D. Wu *et al.*, "Long noncoding RNA TUG1 promotes osteogenic differentiation of human

Effect of TUG1 non-coding RNA knockdown on CD20 receptor expression

Mahbubeh Rojhannezhad¹, Abdorreza Naser Moghadasi², Abbas Nikravesh³, Mehrdad Behmanesh^{4*}

1. PhD. student, Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.
2. Assistant Professor, Multiple sclerosis Research Center, Neuroscience institute, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
3. Associate Professor, Department of Advanced Sciences and Technologies in Medicine, School of Medicine, North Khorasan University of Medical Sciences, Bojnurd, Iran;
4. Professor, Department of Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

behmanesh@modares.ac.ir

Receipt: 2022/04/16

Accepted: 2022/09/06

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is one of the most common autoimmune diseases in Iran and the world. To date, many drugs have been developed to control the progression of MS as a chronic inflammatory disease of the central nervous system. Rituximab is a chimeric mouse-human monoclonal antibody that binds to the CD20 receptor on the surface of B cells and induces apoptosis. Today, numerous studies have confirmed the increasing role of non-coding RNAs in regulating the expression of genes and molecular processes, including apoptosis. Furthermore, bioinformatic analysis results indicate that TUG1 LncRNA is differentially expressed in MS patients. Thus, in the present study the possible role of TUG1 in regulating rituximab mechanism of action and apoptosis induction was experimentally investigated. To do this, specific DNase against TUG1 was designed and transfected into Raji cells in the presence or absence of the drug. After transfection, RNA extraction and cDNA synthesis were performed. Then, the expression of target genes was examined by Real-Time PCR technique. The results showed an increase in CD20 expression and a decrease in SMAD2 expression levels. Furthermore, decreased TUG1 gene expression led to an increase in apoptosis and cell accumulation in the G1 phase. It seems that TUG1 expression level can play a significant role in CD20 expression in B cells and therefore on the therapeutic efficacy of rituximab.

Keywords: Rituximab, CD20, Long non coding RNA, TUG1