

اثر حذف ژن موثر در بروز سرطان *UCA1* با روش نوین ویرایش ژنی CRISPR/Cas9 در رده سلولی سرطان تخمدان

نویسندگان:

بهشاد منتظری نجف آبادی^۱، عباس دوستی^{۲*}، جعفر کیانی^۳

۱- دانشجوی دکتری، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
 ۲- دانشیار، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
 ۳- استادیار، گروه پزشکی مولکولی، دانشکده فناوری‌های پیشرفته پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

چکیده:

مقدمه: lncRNAها در رشد، رونویسی، ترجمه و آپوتوز سلول نقش دارند. *UCA1* نوعی lncRNA مهم است که با پیشرفت سرطان تخمدان ارتباط دارد. بیش از نیمی از زنان مبتلا به سرطان تخمدان در کمتر از پنج سال بعد از تشخیص از بین می‌روند. هدف از پژوهش حاضر حذف ژن *UCA1* (Urothelial Carcinoma Associated 1) با استفاده از روش پیشرفته CRISPR/Cas9 در سلول SK-OV-3 و تعیین اثر آن بر پیشرفت سرطان و آپوتوز بود.

روش کار: ابتدا با نرم افزار CHOPCHOP، دو نوع sgRNA برای *UCA1* طراحی شد. این sgRNAها پس از سنتز، در دو وکتور pSCas9 به صورت جداگانه کلون شدند. سلول‌های SK-OV-3 نیز با دو وکتور حامل sgRNA ترانسفکت شدند. پس از تایید عملکرد صحیح CRISPR در این سلول‌ها، بیان ژن‌های *FAS* و *BAK*، *BAX*، *P53* و آنتی‌آپوتوزی *BCL2* و *Survivin* به روش Real time PCR ارزیابی شد. همچنین میزان تکثیر سلولی و آپوتوز با متیل تیازول تترازولیوم (MTT) و فلوسیتومتری بررسی شد.

یافته‌ها: نتایج نشان دهنده حذف موفق ژن *UCA1* در رده سلولی SK-OV-3 بود. بیان ژن‌های *FAS* و *BAK*، *BAX*، *P53* در سلول‌های دست‌ورزی شده نسبت به سلول‌های شاهد، به صورت معناداری افزایش بیان نشان داد ($p < 0.05$). همچنین، کاهش بیان ژن‌های *BCL2* و *Survivin* در سلول‌های دچار حذف ژن نسبت به گروه شاهد مشاهده شد ($p < 0.05$). نتایج MTT و فلوسیتومتری حاکی از کاهش تکثیر سلولی و افزایش آپوتوز بود.

نتیجه‌گیری: حذف ژن *UCA1* در سلول SK-OV-3، اثرات مثبت در کاهش تکثیر و افزایش آپوتوز نشان داد، از این رو جلوگیری از بیان این ژن نقش موثری در کنترل رشد سلول‌های سرطان تخمدان دارد.

واژگان کلیدی: *UCA1*، سرطان تخمدان، CRISPR/Cas9

Pars J Med Sci 2021;19(1):10-20

مقدمه:

پیشرفته و خیلی دیر هنگام میسر می‌شود و به همین دلیل این سرطان از جمله کشنده ترین نوع سرطان‌های زنان به حساب می‌آید. سه نوع سرطان در مورد بافت تخمدان قابل بررسی است؛ تومورهای اپیتلیال، تومورهای سلول‌های تولید کننده تخمک و تومورهای استروما. تومورهای اپیتلیال، شایع‌ترین نوع سرطان تخمدان را تشکیل می‌دهند که در سلول‌های پوشش خارجی

سرطان تخمدان یکی از شایع‌ترین سرطان‌های زنان است که پس از سرطان‌های سرویکس و رحم در رتبه سوم قرار دارد [۱]. خطر ابتلا به سرطان تخمدان در بین زنان تقریباً ۱ نفر به ازای هر ۷۸ نفر است و این سرطان رتبه پنجم مرگ و میرهای ناشی از سرطان در بین زنان را به خود اختصاص داده است [۲]. سرطان تخمدان علایم خاصی نداشته و معمولاً تشخیص آن در مراحل

* نویسنده مسئول، نشانی: دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شهرکرد

پست الکترونیک: abbasdoosti@yahoo.com

تلفن تماس: ۰۹۱۳۳۸۲۳۶۳۸

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۱۵

اصلاح: ۱۴۰۰/۰۱/۳۰

دریافت: ۱۳۹۹/۰۲/۲۹

سرطان با کمک این روش روی یک انسان در سال ۲۰۱۶ میلادی برای درمان سرطان ریه اجرا شد. در این روش درمانی انجام شده در چین، ژن PD-1 در سلول‌های ایمنی فرد مبتلا به سرطان ریه در خارج بدن با کاربرد روش نوین کریسپر با موفقیت غیرفعال شد. تاکنون موارد متعددی از کاربرد این روش در اصلاح و ویرایش ژنوم بسیاری از موجودات همچون گیاهان و جانوران مختلف با موفقیت به سرانجام رسیده است [۱۴ و ۱۵]. هدف از پژوهش حاضر، تعیین اثر حذف ژن *UCA1* موثر در بروز سرطان با روش نوین ویرایش ژنی CRISPR/Cas9 در رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 است.

روش کار:

طراحی سیستم کریسپر اختصاصی

در این پژوهش تجربی-آزمایشگاهی، یک سیستم ویرایش ژنی تخصصی با استفاده از روش کریسپر طراحی شد تا بخش نسبتاً بزرگی از پروموتور و ناحیه اگزون ژن *UCA1* از ژنوم رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 حذف شود. در این راستا دو RNA راهنما (sgRNA یا Single guide RNA) با استفاده از نرم افزار آنلاین CHOPCHOP طراحی شد. توالی RNA راهنمای اول به نام sgRNA1 که بر ناحیه پروموتور ژن *UCA1* منطبق است به صورت TGACGGAGGGGAGATACCAG و توالی sgRNA2 که بر اگزون شماره ۱ ژن *UCA1* موثر است شامل AGTCCCCCTGGCCCAGATTT بود. در صورت تاثیر صحیح این دو RNA راهنما، ناحیه بینابین آن‌ها که شامل بخشی از پروموتور و قسمتی از اگزون شماره ۱ ژن *UCA1* است، از ژنوم سلول حذف خواهد شد. به عبارت ساده تر، ژنوم سلول SK-OV-3، به گونه‌ای با روش کریسپر ویرایش می‌شود که قادر به تولید محصولات ژن *UCA1* نباشد.

دو توالی RNA راهنما که در بالا بیان شدند، به صورت جداگانه در وکتورهای کریسپری pSCas9(BB)-2A-Puor (PX459) (Addgene, USA) V2.0، همسان سازی شدند. بنابر این دو وکتور نوترکیب تخصصی برای ویرایش ژنوم که در این پژوهش با نام‌های PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 خوانده می‌شوند، ایجاد شد. تایید صحت و وکتورهای نوترکیب حاصل با انجام PCR با پرایمرهای اختصاصی sgR1-F و sgR1-R برای وکتور نوترکیب PX459-sgRNA1 و پرایمرهای sgR2-F و sgR2-R برای وکتور نوترکیب PX459-sgRNA2 انجام شد. حضور باند ۲۹۲ و ۲۹۳ جفت بازی به ترتیب برای هر یک از وکتورهای PX459-sgRNA1 و sgRNA2 موید حضور RNA های راهنما در وکتورهای کریسپری است. وکتورهای ایجاد شده علاوه بر حمل RNA های راهنما، امکان بیان آنزیم Cas9 را نیز دارند. این آنزیم

تخمدان پدید می‌آیند. تومورهای استروما در سلول‌های بافت تخمدان که مسئول تولید هورمون‌های زنانه استروژن و پروژسترون هستند، تشکیل می‌شوند. شایع‌ترین نوع سرطان تخمدان، تومورهای سلول‌های اپیتلیال است [۳].

از جمله مهم‌ترین مولکول‌هایی که در سلول‌های یوکاریوتی نقش حیاتی ایفا می‌کنند، RNA ها هستند. تعداد زیادی از این RNAها شامل رونوشت‌هایی هستند که به پروتئین ترجمه نمی‌شوند و اعمال حیاتی خود را به همان شکل و ساختار RNA به انجام می‌رسانند. به این نوع از رونوشت‌ها، اصطلاح RNA های غیر کدکننده (ncRNAs, non coding RNAs) اطلاق می‌شود و همان طور که از نام این مولکول‌ها پیداست، هیچ پروتئینی را کد نمی‌کنند [۴ و ۵]. در این بین، به ncRNA هایی که طولی بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید داشته باشند، RNA های غیر کدکننده بلند یا lncRNAs گویند. هر چند lncRNAها برای اولین بار در اوایل دهه ۱۹۹۰ میلادی شناخته شدند، اما این RNA ها در سال ۲۰۰۲ به عنوان گروهی مستقل و مشخص از RNAها پذیرفته شدند [۲۰]. RNA های غیر کدکننده بلند در پدیده‌های مهم سلولی همچون تنظیم بیان ژن، آپوپتوز، مهاجرت سلولی، تنظیم رونویسی، میزان ترجمه و غیره نقش دارند. بسیاری از موارد نام برده به شکل مستقیم و غیرمستقیم در بروز یا عدم بروز سرطان دخیل هستند. به عبارت ساده‌تر، lncRNAها می‌توانند هم در پیشرفت سرطان و هم در مهار آن نقش داشته باشند [۷ و ۸].

یکی از lncRNAهای معروف که در فرایندهای سلولی نقش مهمی ایفا می‌کند، *UCA1* است. *UCA1* نقش مهمی در پدیدار شدن و پیشرفت تومور دارد. این RNA غیر کدکننده بلند با پروتئین و فاکتورهای هسته‌ای برهم کنش داشته و بیان ژن را در سطح رونویسی و پس از رونویسی تنظیم می‌کند. بیان *UCA1* در بافت‌های توموری به شدت افزایش می‌یابد و در تکثیر سلول‌های توموری، تهاجم، آپوپتوز و مهاجرت نقش اساسی دارد. طی پژوهش‌های گذشته، نقش *UCA1* در توسعه تومور در دستگاه‌های حیاتی بدن انسان همچون سیستم تنفسی، دستگاه گوارش، دستگاه تولید مثل، سیستم ادراری و غیره تایید شده است [۹-۱۲].

رده سلول‌های سرطان تخمدان با نام SK-OV-3، یکی از سلول‌های سرطانی تومورهای سلول‌های اپیتلیال است. این رده سلولی اولین بار از تومور تخمدان یک زن ۶۴ ساله قفقازی جداسازی شد و امروزه در پژوهش‌های سلولی در زمینه سرطان تخمدان کاربرد وسیعی دارد [۱۳]. امروزه با پیشرفت روش‌های مهندسی ژنتیک امکان دست کاری در محتوای ژنتیکی سلول‌ها ممکن شده است. یکی از روش‌های نوین و قدرتمند در ویرایش ژنوم، روش کریسپر (CRISPR) است. اولین قدم در درمان

برش‌های لازم را در محل اتصال RNA های راهنما روی ژنوم سلول هدف ایجاد می‌کند. از وکتور PX459-GFP که حامل ژن *GFP* بوده و فاقد هر گونه RNA راهنماست، به عنوان کنترل آزمایش بهره گرفته شد.

کشت سلول و ویرایش ژنوم

سلول SK-OV-3 به عنوان یکی از رده‌های سلولی سرطان تخمدان از انستیتو پاستور ایران با کد بانک سلولی C209 خریداری شد. سلول مذکور در محیط RPMI حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) کشت داده شد. سلول‌ها تا رسیدن به تراکم ۸۰٪ در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن نگهداری شدند.

برای انتقال پلاسمیدهای نو ترکیب PX459- و PX459-sgRNA1 و sgRNA2 به رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 از روش استاندارد لیپوفکشن بهره گرفته شد. به این منظور از محلول لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (ترموفیشر، آمریکا) استفاده شد. به طوری که ابتدا سلول‌های SK-OV-3 در پلیت ۶ خانه به تعداد ۳۰۰ هزار سلول به ازای هر خانه کشت داده شدند. سلول‌ها به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و در شرایط ۵٪ دی‌اکسیدکربن قرار داده شدند. سپس محیط کشت روی سلول‌ها با محیط کشت تازه فاقد FBS تعویض شد و مخلوط لیپوفکشن در حجم نهایی ۱۰۰ میکرولیتر شامل ۲ میکرولیتر لیپوفکتامین، ۲ میکروگرم پلاسمید به همراه محیط کشت RPMI، به صورت قطره قطره به کشت سلولی اضافه شد. برای چاهک اول، دو پلاسمید PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 (گروه تیمار) و برای چاهک دوم پلاسمید PX459-GFP اضافه شد (گروه پلاسمید خالی). چاهک سوم فقط حاوی سلول‌های کشت شده بدون هر گونه تیمار بود (گروه فاقد پلاسمید). پس از گذشت ۲۴ ساعت، محیط کشت روی سلول‌ها با محیط تازه حاوی پورومایسین (۲ میکروگرم در هر میلی‌لیتر) تعویض شد. مارکر انتخابی وکتور PX459، مقاوم نسبت به پورومایسین است.

بررسی صحت عملکرد ویرایش ژنوم

همانطور که در بخش‌های بالا شرح داده شد، در صورت اتصال RNA های راهنما (sgRNA1 و sgRNA2) به نواحی مکمل خود روی ژنوم سلول SK-OV-3، آنزیم کریسپری Cas9 سبب برش در این نواحی خواهد شد. از این رو، قطعه بزرگی از ژن *UCA1* شامل ناحیه پروموتور و بخشی از اگزون شماره ۱ آن بریده و حذف می‌شود.

نظر به این که ساختار کروموزومی سلول‌های انسان به صورت دیپلوئید (2n) است، در نتیجه پس از تاثیر سیستم ویرایش ژنوم

کریسپر ممکن است یک آلل یا هر دو آلل ژن *UCA1* در سلول‌های SK-OV-3 تخریب شود. برای یافتن سلول‌هایی که هر دو آلل ژن *UCA1* در آن‌ها حذف شده، از سیستم انتخاب کلون‌های تک سلولی بهره گرفته شد. یعنی از میان سلول‌های مقاوم به پورومایسین که نشان دهنده دریافت وکتورهای کریسپری است، رقت سازی‌های متوالی در پلیت ۹۶ خانه استریل انجام شد. سپس ۴۸ ساعت به سلول‌ها اجازه رشد در شرایط انکوباتور CO2 در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد داده شد. از رقت‌های آخر که احتمال رشد تک کلون در آن‌ها بیشتر است، نمونه برداری شد. سپس به منظور بررسی این ناحیه حذف شده، از روش PCR با کمک پرایمرهای اختصاصی ژن *UCA1* استفاده شد. بنابراین ابتدا از سلول‌های دست‌ورزی شده (گروه تیمار و گروه کنترل) با استفاده از کیت استخراج DNA سیناکلون (ایران)، ژنوم کامل سلول تخلیص شد. کیفیت و غلظت DNA خالص شده با استفاده از دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) بررسی شد.

واکنش PCR، شامل ۲ میکرولیتر ماستر میکس 2X شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران)، ۰/۰۳ نانومول از هر یک از پرایمرهای *UCA1-F* و *UCA1-R* (جدول ۱)، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از DNA سلول و با افزودن آب مقطر، در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر انجام شد. سپس مخلوط واکنش گرما در دستگاه ترمال سایکلر (اپندرف، آلمان) با برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، سپس ۳۰ سیکل به صورت دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه، اتصال در ۶۳ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه، تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه و تکثیر نهایی در یک مرحله با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انجام شد. محصولات PCR روی ژل آگارز ۱٪ الکتروفورز شدند و پس از رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید، تصویر برداری از ژل با دستگاه UVI tech (انگلستان) انجام شد.

با انجام PCR با دو پرایمر *UCA1-F* و *UCA1-R* روی ژنوم سلول‌های دست‌کاری نشده یا سلول‌های گروه کنترل (پلاسمید خالی)، قطعه‌ای به اندازه ۱۲۰۷ جفت باز تکثیر می‌شود. در صورت صحت عملکرد سیستم کریسپری خاص روی رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 تیمار شده، یک قطعه ۷۴۴ جفت بازی حذف می‌شود. بنابر این در این گونه سلول‌ها، یک محصول PCR کوتاه به اندازه ۴۶۳ جفت باز تشکیل می‌شود. بر این اساس، مشاهده قطعات ۱۲۰۷ و ۴۶۳ جفت بازی روی ژل آگارز به ترتیب نشان‌دهنده ژن سالم *UCA1* و ژن ویرایش شده *UCA1* خواهد بود. بنابراین در مورد این گونه سلول‌ها سه حالت ممکن است اتفاق بیفتد. در یک حالت ممکن است هر دو آلل *UCA1* دچار حذف شوند و فقط یک باند کوتاه ۴۶۳ جفت بازی مشاهده شود

گروه‌های کنترل (گروه پلاسמיד خالی و گروه فاقد پلاسמיד)، با MTT آزمون شد. به طور خلاصه، در این آزمایش هر یک از گروه‌های سلولی بالا در پلیت کشت سلولی ۹۶ خانه کشت داده شدند. پس از رشد سلول‌ها، محیط کشت روی سلول‌ها خارج و دو بار با PBS شستشو انجام شد. سپس به هر خانه، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI فاقد PBS به علاوه ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر از متیل تiazول تترازولیوم (سیگما، آلمان) اضافه شد و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور CO₂ دار در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. سپس محلول روی سلول‌ها خارج و مقدار ۵۰ میکرولیتر دی متیل سولفوکساید (DMSO) اضافه شد. در نهایت جذب نوری با دستگاه قرائتگر ELISA اندازه‌گیری و با رسم نمودار استاندارد میزان زنده مانی و تکثیر سلولی محاسبه شد.

فلوسیتومتری

در راستای تعیین میزان آپوپتوز و نکروز در سلول‌های گروه‌های تحت تیمار با سیستم کریسپری و سلول‌های کنترل، از روش فلوسیتومتری استفاده شد. آپوپتوز به کمک Annexin V کونژوگه با فلئوروکروم ایزوتیوسیانات فلورسین (FITC) و نکروز با PI (Propidium Iodide) سنجش می‌شوند. به این منظور از کیت Annexin-V-FITC / Propidium iodide Mab Taq استفاده شد. به طور خلاصه تعداد یک میلیون از هر یک از گروه‌های سلولی بالا در ۱ میلی‌لیتر از بافر IX به نام Annexin-V binding buffer به صورت سوسپانسیون در آمده و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از این سوسپانسیون سلولی به لوله‌های مخصوص فلوسیتومتری منتقل شد. سپس ۵ میکرولیتر از محلول Annexin V FITC و ۵ میکرولیتر از محلول PI به هر لوله اضافه شد. لوله‌ها در تاریکی به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شدند. در نهایت، لوله‌های حاوی سلول توسط دستگاه فلوسیتومتری بررسی شدند.

تحلیل آماری:

کلیه داده‌های حاصل در نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ (SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) وارد و تفاوت بین گروه‌ها با آزمون آماری T و آزمون ANOVA محاسبه شد. همچنین با استفاده از نرم‌افزار GraphPad Prism نسخه ۵/۰۱ ویندوز (GraphPad Software, USA, <http://www.graphpad.com>) نمودارهای مورد نیاز ترسیم شدند. از نظر آماری $p < 0.05$ معنادار در نظر گرفته شد.

(UCA1⁻/UCA1⁺). در حالت دوم ممکن است یک آلل دچار حذف شود و آلل دیگر دست نخورده بماند و در نتیجه دو باند ۱۲۰۷ و ۴۶۳ جفت بازی هر دو به وجود آید (UCA1⁺/UCA1⁻). در حالت سوم که ممکن است هیچ یک از آلل‌ها دچار حذف نشده باشند، فقط یک باند بزرگ ۱۲۰۷ تشکیل می‌شود (UCA1⁺/UCA1⁺).

استخراج RNA و سنتز cDNA

از سلول‌های تیمار شده با سیستم کریسپری و سلول‌های کنترل با استفاده از محلول RNX-Plus ساخت شرکت سیناکلون ایران، RNA سلول‌ها تخلیص شد. کیفیت و غلظت RNAهای خالص شده با کمک دستگاه نانودراپ (ترموفیشر، آمریکا) سنجیده شدند. سنتز cDNA به وسیله کیت شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) بر اساس دستورالعمل کیت انجام شد.

بررسی تغییرات بیان ژن‌ها

در این مرحله تغییرات میزان بیان ژن‌های مرتبط با آپوپتوز و سرطان در رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 تیمار شده (ویرایش ژنوم شده) در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل ارزیابی شد. برای نیل به این هدف ژن‌های *FAS*, *BAK*, *BAX*, *P53*, *survivin* و *BCL2* به روش مولکولی Real time PCR بررسی شدند. در هر چرخه واکنش، از ژن مرجع GAPDH برای نرمال سازی داده‌ها استفاده شد.

مخلوط واکنش گرما شامل ۷/۵ میکرولیتر از مستر SYBR Mix 2X (یکتا تجهیز آزما، ایران)، ۰/۰۳ نانومول از هر یک از پرایمرهای رفت و برگشت (جدول ۱)، مقدار ۱۰۰ نانوگرم از cDNA و با افزودن آب مقطر، در حجم نهایی ۱۵ میکرولیتر آماده شد. برنامه دمایی در دستگاه Real time PCR (کیاژن، آلمان) اجرا شد. برنامه دمایی شامل دناتوراسیون اولیه در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ دقیقه، ۴۰ چرخه دناتوراسیون در دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ ثانیه، مرحله اتصال پرایمرها براساس جدول ۱ به مدت ۱۵ ثانیه، مرحله تکثیر در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ ثانیه بود. در نهایت، به منظور تحلیل منحنی ذوب، دمای دستگاه بین ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد با طیف افزایش دمایی ۱ درجه سانتی‌گراد در هر ثانیه تنظیم شد. داده‌های حاصل از بررسی بیان ژن‌ها، با نرم افزار Rotor Gene 6000 در دستگاه Real time PCR و به روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ تحلیل شدند.

سنجش میزان زیستایی سلول‌ها

بررسی میزان تغییرات بقا و تکثیر سلولی در رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 تحت تیمار (ویرایش ژن شده) در مقایسه با

جدول ۱: توالی پرایمرهای مورد استفاده در واکنش‌های PCR و Real time PCR

ژن	نام پرایمرها	توالی پرایمر 5'-----3'	دمای اتصال	طول محصول PCR (bp)
<i>UCA1</i>	UCA1-F UCA1-R	CTGCTCACATATATACTCAGTGACCAC GACTGGACAGGGAGATTGGAG	۶۳	۴۶۳
PX549-sgRAN1	sgR1-F sgR1-R	GAGGCCTATTTCCCATGATT CACCGATGACGGAGGGAGATACCAG	۶۶	۲۹۲
PX549-sgRAN2	sgR2-F sgR2-R	GAGGGCCTATTTCCCATGATT CACCGAGTCCCCCTGGCCCAGATTT	۶۶	۲۹۳
<i>P53</i>	P53-F P53-R	TGCGTGTGGAGTATTTGGATGAC CAGTGTGATGATGGTGAGGATGG	۶۴	۱۷۰
<i>BCL2</i>	BCL2-F BCL2-R	GACGACTTCTCCCGCCGCTAC CGTTTCAGGTAATCAGTCATCACCAC	۶۵	۲۴۵
<i>FAS</i>	FAS-F FAS-R	CAATTCTGCCATAAGCCCTGTC GTCCTTCATCACACAATCTACATCTTC	۶۴	۱۶۳
<i>BAX</i>	BAX-F BAX-R	AGGTCTTTTTCCGAGTGGCAGC GCGTCCCAAAGTAGGAGAGGAG	۶۵	۲۴۳
<i>BAK</i>	BAK-F BAK-R	CGTTTTTTACCGCCATCAGCAG ATAGCGTCGGTTGATGTCGTCC	۶۶	۱۵۴
<i>survivin</i>	Surv-F Surv-R	AGAACTGGCCCTTGGAGG CTTTTTATGTTCTCTATGGGGTC	۶۴	۱۷۰
<i>GAPDH</i>	GDH-F GDH-R	GCCAAAAGGGTCATCATCTCTGC GGTCACGAGTCCTCCACGATAC	۶۴	۱۸۳

یافته‌ها:

سلول‌های دست‌ورزی شده با وکتور PX459-GFP مشاهده شد. نتایج این آزمایش در شکل ۱ نشان داده شده است.

نتیجه ویرایش ژنی سلول‌ها

پس از انتقال همزمان دو وکتور PX459-sgRNA1 و PX459-GFP به سلول‌های SK-OV-3، انتظار می‌رود ژن *UCA1* تخریب شود. در نتیجه عملکرد موفق این سیستم کریسپری خاص، یک قطعه ۷۴۴ جفت بازی شامل بخشی از پروموتور تا قسمتی از اگرون شماره ۱ ژن *UCA1* حذف می‌شود. حذف این قطعه ژنی با انجام PCR روی DNAهای استخراج شده از سلول‌های گروه تیمار در مقایسه با سلول‌های گروه کنترل، محصولات PCR متفاوتی تشکیل می‌دهد. نتایج نشان داد که انجام PCR با پرایمرهای UCA1-F و UCA1-R روی سلول‌های مذکور سبب تشکیل باند ۱۲۰۷ جفت بازی برای گروه کنترل بود، در حالی که واکنش PCR مشابه برای سلول‌های گروه تیمار (ویرایش ژن شده)، سبب تشکیل باند کوتاه ۴۶۳ جفت بازی شد. مقایسه باندهای حاصل بین سلول‌های گروه تیمار و گروه کنترل مویید اختلاف ۷۴۴ جفت بازی بین آن‌ها است که نشان دهنده

تایید صحت همسان سازی RNA های راهنما

پس از کلون سازی RNAهای راهنما sgRNA1 و sgRNA2 در وکتور کریسپری، واکنش PCR برای تایید درج شدن این دو RNA راهنما در وکتورهای مربوطه انجام شد. نتایج PCR روی هر یک از پلاسمیدهای نو ترکیب PX459-sgRNA1 و PX459-GFP سبب تشکیل باند ۲۸۶ جفت بازی شد که صحت حضور RNAهای راهنما در وکتورهای کریسپری را تایید می‌کند.

تایید انجام لیپوفکشن

وکتورهای کریسپری PX459-sgRNA1 و PX459-sgRNA2 به صورت توام به یک گروه از سلول‌های SK-OV-3 (گروه تیمار) و در شرایط یکسان وکتور PX459-GFP که بیان کننده پروتیین سبز فلورسنت یا GFP است، به گروه دیگری از سلول‌های SK-OV-3 (گروه وکتور خالی) به روش لیپوفکشن انتقال داده شدند. ۲۴ ساعت پس از ترانسفکشن، سلول‌های گروه GFP با میکروسکوپ فلورسانت مشاهده شدند. نتایج نشان دهنده موفقیت انتقال پلاسمیدها به سلول‌های سرطانی SK-OV-3 بود، به طوری که رنگ سبز درخشان در مشاهده میکروسکوپی

حذف این قطعه به نسبت بزرگ از ژن *UCAI* است (شکل ۲). از آن جا که این ناحیه حذف شده شامل بخش هایی از پروموتور تا اگزون شماره ۱ ژن *UCAI* است، از این رو، تخریب این ژن با موفقیت انجام شده است.

نتیجه بیان ژن در سلول‌های ویرایش ژن شده پس از تخریب ژن *UCAI* در رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 به روش کریسپر، تاثیر این ویرایش ژنی بر بیان ژن‌های مرتبط با سرطان و آپوپتوز به روش PCR مورد سنجش قرار گرفت.

نتیجه بیان ژن در سلول‌های ویرایش ژن شده

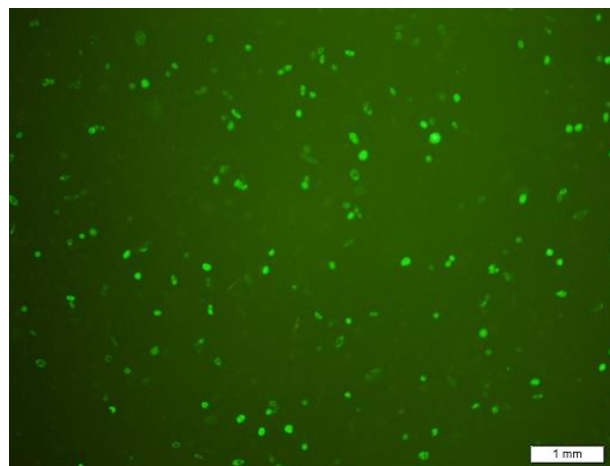
نتایج نشان داد که در گروه سلول های SK-OV-3 تیمار شده (*UCAI*⁻/*UCAI*⁻) در مقایسه با گروه سلول‌های کنترل (*UCAI*⁺/*UCAI*⁺)، بیان ژن‌های پروآپوپتوزی P53، BAX، BAK و FAS افزایش و بیان ژن‌های آنتی آپوپتوزی BCL2 و *survivin* کاهش داشته است. به طوری که ژن‌های پروآپوپتوزی P53 ($p=0.0108$)، BAX ($P=0.0116$)، BAK ($p=0.0066$) و FAS ($p=0.0068$) به صورت معنادار افزایش بیان را نشان داده اند. از طرفی دو ژن آنتی آپوپتوزی BCL2 ($p=0.0045$) و *survivin* ($p=0.0211$) کاهش معنادار در بیان ژن در مقایسه بین سلول‌های تحت تیمار (حذف ژن شده) و سلول‌های کنترل را دارند.

نتیجه زیستایی سلول‌های ویرایش ژن شده

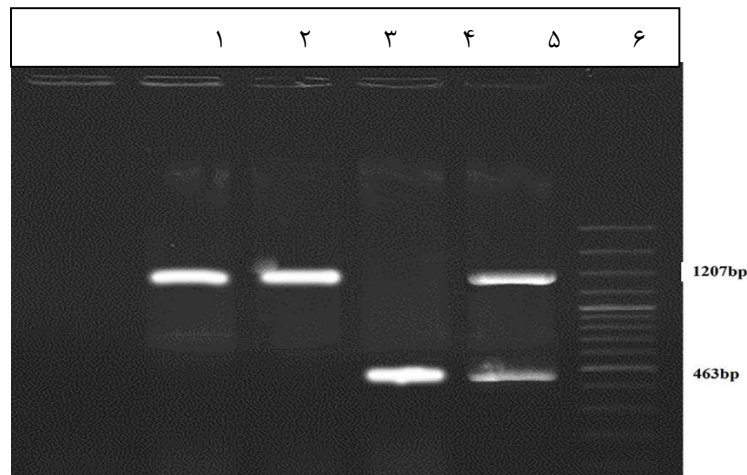
نتایج آزمون MTT نشان دهنده کاهش بقا و زیستایی سلول‌های فاقد ژن *UCAI* است. پایش سلول‌های SK-OV-3 تیمار شده

نتایج فلوسیتومتری

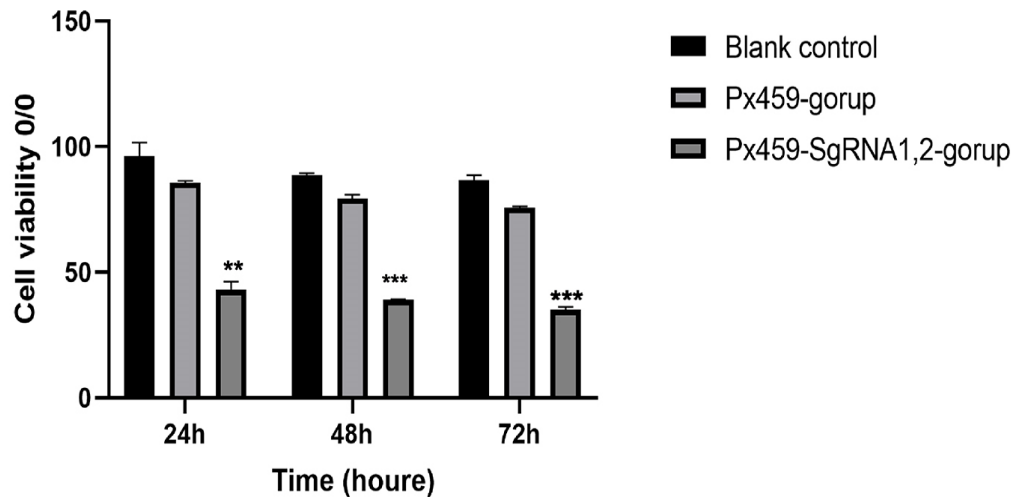
همانطور که در نمودارهای حاصل از آزمایش Annexin V-FITC مشاهده می‌شود، درصد آپوپتوز و نکروز در سلول‌های SK-OV-3 تحت تیمار در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داده شده است. درصد آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه، سلول‌های زنده و سلول‌های دچار نکروز در سلول‌های SK-OV-3 ویرایش ژن شده به ترتیب ۶۹/۸۷، ۹/۶۶، ۲۰/۳۸ و ۰/۰۸ است. از طرف دیگر ترتیب آپوپتوز اولیه، آپوپتوز ثانویه، سلول‌های زنده و سلول‌های دچار نکروز در سلول‌های گروه کنترل ۱/۵۹، ۰/۱۴، ۹۸/۲۲ و ۰/۰۵ درصد بود. نتایج این آزمایش به خوبی موید تاثیر حذف ژن *UCAI* در سلول‌های سرطانی در سوق دادن سلول‌ها به سمت مرگ برنامه ریزی شده سلولی است (شکل ۴).



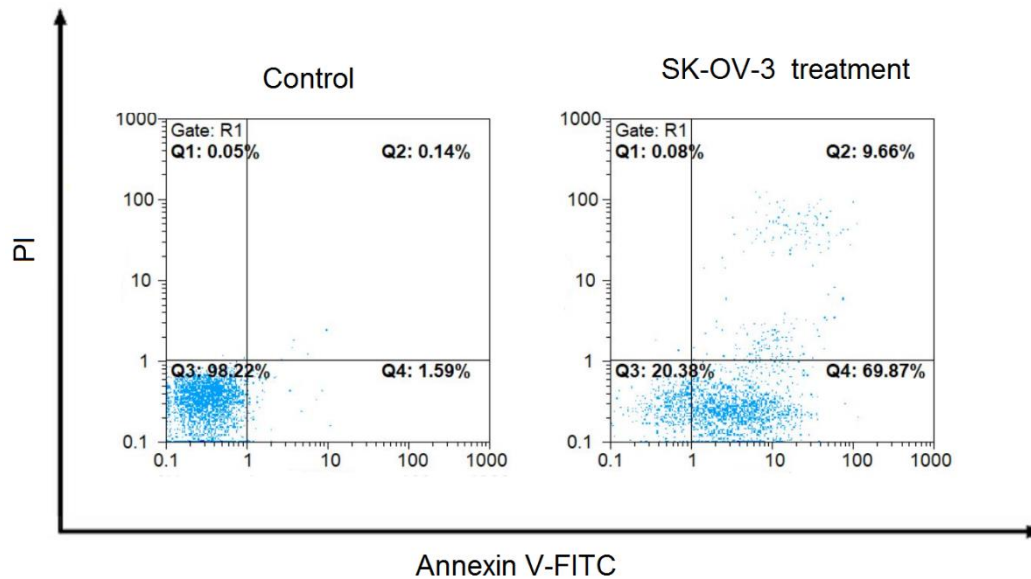
شکل ۱: نتیجه دستوری رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 با وکتور PX459-GFP. حضور رنگ سبز درخشان در مشاهده سلول‌ها با میکروسکوپ فلورسانت نشان دهنده انتقال موفق وکتورهای کریسپری به رده سلولی SK-OV-3 است.



شکل ۲: نتایج تخریب ژن *UCA1* در سلول های SK-OV-3. شماره ۱: کنترل منفی (بدون DNA)، شماره های ۲: سلول های گروه کنترل (پلاسمید خالی) بدون تخریب ژن که باند کامل ۱۲۰۷ جفت بازی را نشان می‌دهند. شماره ۳: سلول هایی که علی رقم دریافت وکتور کریسپری، هیچ گونه تخریب ژن در آنها صورت نگرفته و ژن *UCA1* سالم باقی مانده و باند کامل ۱۲۰۷ جفت بازی نشان می‌دهد ($UCA1^+/UCA1^+$). شماره ۴: سلول هایی که هر دو آلل ژن هدف در آنها تخریب شده است و باند کوتاه ۴۶۳ جفت بازی دارد ($UCA1^-/UCA1^-$). شماره ۵: سلول های هتروزیگوت که در یک آلل آنها ژن *UCA1* تخریب و در آلل دیگر تخریب نشده است و هر دو باند ۱۲۰۷ و ۴۶۳ تشکیل شده است ($UCA1^+/UCA1^-$). شماره ۶ مارکر 100 bp شرکت سیناکلون.



شکل ۳: بررسی میزان زیستایی سلول های ویرایش شده در مقایسه با سلول های گروه کنترل. با گذشت زمان و پس از گذشت ۷۲ ساعت میزان زنده مانی سلول های SK-OV-3 تیمار شده در مقایسه با سلول های گروه کنترل به صورت معناداری کاهش یافته است ($p=0/0002$).



شکل ۴: بررسی آپوپتوز سلولی توسط رنگ‌آمیزی Annexin V-FITC و فلوسیتومتری.

میزان آپوپتوز اولیه و ثانویه در سلول های SK-OV-3 که *UCA1* در آنها تخریب شده بود به ترتیب ۶۹٫۸۷٪ و ۹٫۶۶٪ است. در حالی که در سلول های گروه کنترل میزان آپوپتوز اولیه و ثانویه به ترتیب ۱٫۵۹٪، ۹۸٫۲۲٪ است.

Q1: درصد نکروز شده Q2: درصد آپوپتوز ثانویه Q3: درصد سلول زنده Q4: درصد آپوپتوز اولیه

بحث:

مختلف عمل می‌کند [۱۸ و ۱۹]. *UCA1* در سرطان‌های نظیر کارسینومای سلول‌های خونی، تومورهای بدخیم مغزی، سرطان مری، سرطان پانکراس و سرطان سینه تاثیر دارد. این lncRNA در تمامی این سرطان‌ها افزایش بیان دارد [۲۲-۲۰]. بیان بیش از حد *UCA1* در سرطان تخمدان مرتبط با متاستاز در این سرطان می‌باشد و می‌توان آن را به عنوان یک انکوژن در نظر گرفت [۲۳]. همچنین *UCA1* در مقاومت سلول‌های سرطانی تخمدان به داروهای شیمی درمانی نیز موثر است. نقش عملکردی *UCA1* در سلول‌های سرطان تخمدان مقاوم به داروی PTX1 مورد بررسی قرار گرفته است. تخریب *UCA1* به وسیله sponge miR-129 باعث افزایش حساسیت سلول‌های سرطانی تخمدان به PTX1 در سرطان شد. به نوبه خود یک هدف درمانی امیدوارکننده برای مقاومت دارویی ارائه داد [۲۴]. بیان بیش از حد *UCA1* با اندازه تومور، مرحله پیشرفته سرطان و متاستاز بستگی ندارد و با پیش‌آگهی ضعیف سرطان تخمدان مرتبط است. هرچه قدر اندازه تومور بزرگ‌تر و سرطان در مراحل پیشرفته‌تر باشد بیان آن بالاتر خواهد بود. از آن جایی که میزان بیان *UCA1* با پیشرفت سرطان تخمدان افزایش می‌یابد، بنابراین می‌تواند به عنوان یک انکوژن عمل کرده و باعث پیشرفت سرطان تخمدان شود. مطالعه اخیر نشان داد که بیان بیش از حد *UCA1* باعث تنظیم بیش از حد SRPK1 و پروتئین‌های ضد آپوپتوز در سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شود که منجر به مقاومت به سیس پلاتین می‌شود.

در این پژوهش، با استفاده از تکنیک نوین ویرایش ژنی به نام سیستم کریسپر نسبت به حذف ژن پیش برنده سرطان *UCA1*، در رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 اقدام شد. نتایج حذف این ژن با روش مذکور موفقیت‌آمیز بود. حذف ژن *UCA1* بر بیان ژن‌های پروآپوپتوزی P53، BAX، BAK و FAS تاثیر مثبت داشته و بر بیان ژن‌های آنتی آپوپتوزی BCL2 و *survivin* تاثیر معکوس داشت. شیوع سرطان با افزایش جمعیت و افزایش طول عمر رو به افزایش است. تخمین زده می‌شود در دهه ۲۰۴۰ در انگلیس ۵٫۳ میلیون نفر از بالغین به یک سرطان یا بیشتر از یک سرطان مبتلا شده باشند. این ابتلا به نسبت ۶٫۲٪ مردان و ۵٫۸٪ زنان در جمعیت خواهد بود [۱۶]. در سال ۲۰۱۸ تعداد مرگ و میر ناشی از سرطان در کل جهان ۹٫۶ میلیون نفر گزارش شده که نسبت به سال ۲۰۰۸ به میزان ۲۶٪ رشد داشته است. پیش‌بینی می‌شود که میزان مرگ و میر ناشی از سرطان در آسیا در سال ۲۰۳۰ نسبت به سال ۲۰۰۸ به میزان ۸۳٪ افزایش داشته باشد [۱۷]. مطالعات زیادی تأیید کرده‌اند که lncRNA به عنوان انکوژن یا سرکوبگر تومور نقش تنظیم‌کننده مهمی در پیشرفت تعداد زیادی از سرطان‌های انسانی دارد. آنها ممکن است به عنوان فعال‌کننده‌های یا سرکوبگر بیان ژن‌های پورتین‌های مختلف عمل کنند. در واقع در تقابل DNA، RNA و یا پروتئین در سرطان عمل کنند. در حال حاضر، مجموعه‌ای از شواهد نشان داده است که *UCA1* lncRNA به عنوان یک انکوژن در بدخیمی‌های

پروآپوپتوزی *BAX*، *BAK*، *P53* و *FAS* و آنتی‌آپوپتوزی *BCL2* و *survivin* در رده سلولی سرطان سینه SK-OV-3 پرداخته شده است. بررسی نتایج Real time PCR نشان داد که با تخریب ژن *UCA1* بیان ژن‌ها آپوپتوزی در سلول‌های ویرایش شده نسبت به سلول‌های کنترل به شدت افزایش یافته و برعکس بیان ژن‌های آنتی‌آپوپتوزی کاهش می‌یابد. نتایج آزمون MTT نیز تاثیرات مثبت حذف ژن *UCA1* را روی کاهش تکثیر سلول‌های سرطانی نمایان کرد. یافته‌های حاصل از MTT هم راستا با نتایج بررسی بیان ژن از طریق Real time PCR می‌باشد و همگی در راستای کنترل سلول‌های سرطانی است. علاوه بر آن، نتایج فلوسیتومتری حاصل از این پژوهش نیز روند مرگ برنامه ریزی شده سلولی در سلول‌های سرطانی تحت تیمار را در مقایسه با سلول‌های کنترل نشان داد.

نتیجه‌گیری:

تمام یافته‌های این پژوهش که حاصل از آزمایش‌های متعدد حذف ژن و تایید آن با آزمایش‌های مولکولی Real time PCR، MTT و فلوسیتومتری بود، موید تاثیر مثبت حذف ژن *UCA1* در کنترل رشد رده سلولی سرطان تخمدان SK-OV-3 است. هرچند پژوهش‌های گذشته نشان‌دهنده افزایش بیان ژن *UCA1* در سرطان‌های مختلف همچون سرطان دستگاه گوارش و سیستم ادراری و غیره است، اما در این پژوهش برای اولین بار اثرات ژن یاد شده روی سرطان تخمدان بررسی شده است. به نظر می‌رسد حذف این ژن به روش نوین CRISPR/Cas9 سازوکاری مناسب برای کنترل سلول‌های توموری است.

تشکر و قدردانی:

از معاونت محترم پژوهشی دانشگاه و کمیته اخلاق برای مساعدت در تصویب و اجرای این پژوهش تشکر می‌شود.

افزایش ROS ناشی از داروی شیمی درمانی ممکن است بیان *UCA1* را تعدیل کند و سپس باعث فعال شدن مسیرهای WNT و AKT/mTOR شود، که توانایی ضد آپوپتوز را افزایش می‌دهد. این خود باعث زنده ماندن سلول‌های سرطانی تخمدان می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که بیان بالای *UCA1* در سلول‌های سرطانی تخمدان موجب پیشرفت سریع، مقاومت به داروهای ضد سرطان و تهاجمی‌تر شدن سرطان تخمدان می‌شود. مشاهدات نشان داده که بیان بالای *UCA1* ارتباط نزدیکی با افزایش تهاجم، پاسخ ضعیف به شیمی درمانی و پیش آگاهی ضعیف در بیماران مبتلا به سرطان تخمدان دارد [۲۵]. در سرطان تخمدان *UCA1* در ایجاد مقاومت به داروی شیمی درمانی Tamoxifen نیز نقش دارد. همچنین ارتباط بین مراحل مختلف سرطان تخمدان با بیان *UCA1* مشخص شده است [۲۶]. در مطالعه‌ای نشان داده شد که *UCA1* در بافت‌های سرطانی تخمدان و سلول‌های رده مقاوم در برابر سیس پلاتین افزایش یافته است. بیان *UCA1* بر حساسیت سلول‌های سرطانی تخمدان به سیس پلاتین تاثیر می‌گذارد و تایید شده که بیان *UCA1*، مقاومت به سیس پلاتین را از مسیر miR-143 / FOSL2 در سرطان تخمدان تنظیم می‌کند [۲۷]. مشخص شده است که یکی از عوامل مقاومت سلول‌های سرطانی به داروی ضد سرطانی سیس پلاتین (CDDP) بیان بیش از حد *UCA1* است. تخریب *UCA1* در سلول‌های کارسینومای سنگفرشی دهان باعث افزایش فعالیت ۳ کاسپاز و افزایش حساسیت سلول‌ها به داروی CDDP می‌شود. *UCA1* باعث افزایش بیان SF1 می‌شود. *UCA1* نقش انکوژن خود را توسط محور *UCA1/miR184/SF1* در سلول‌های کارسینومای سنگفرشی دهان اعمال می‌کند که این باعث افزایش رشد تومور و مهار آپوپتوز می‌شود [۲۸].

مطالعاتی که تاکنون صورت گرفته، کمتر به نقش *UCA1* در بیان ژن‌های مرتبط به آپوپتوز پرداخته است. از این رو در مطالعه حاضر با تخریب ژن *UCA1* به روش CRISPR/Cas9 به بررسی بیان

References:

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(6):394-424.
2. Torre LA, Trabert B, DeSantis CE, Miller KD, Samimi G, Runowicz CD, Gaudet MM, Jemal A, Siegel RL. Ovarian cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018; 68(4):284-296.
3. Lheureux, S, Braunstein M, Oza AM. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA Cancer J Clin*. 2019; 69(4):280-304.
4. Grillone K, Riillo C, Scionti F, Rocca R, Tradigo G, Guzzi PH, Alcaro S, Di Martino MT, Tagliaferri P, Tassone P. Non-coding RNAs in cancer: platforms and strategies for investigating the genomic "dark matter". *J Exp Clin Cancer Res*. 2020; 39(1):117.
5. Wang WT, Han C, Sun YM, Chen TQ, Chen YQ. Noncoding RNAs in cancer therapy resistance and targeted drug development. *J Hematol Oncol*. 2019; 12(1):55.

6. Zhan L, Li J, Wei B. Long non-coding RNAs in ovarian cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2018; 37: 120.
7. Renganathan A, Felley-Bosco E. Long Noncoding RNAs in Cancer and Therapeutic Potential. *Adv Exp Med Biol*. 2017; 1008:199-222.
8. Saliminejad K, Khorram Khorshid HR, Soleymani Fard S, Ghaffari SH. An overview of microRNAs: Biology, functions, therapeutics, and analysis methods. *J Cell Physiol*. 2019; 234(5):5451-5465.
9. Zhang S, Dong X, Ji T, Chen G, Shan L. Long non-coding RNA UCA1 promotes cell progression by acting as a competing endogenous RNA of ATF2 in prostate cancer. *Am J Transl Res*. 2017;9(2):366-75.
10. Huang J, Zhou N, Watabe K, Lu Z, Wu F, Xu M, et al. Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis*. 2014;5(1):e1008-e1008.
11. Han Y, Yang YN, Yuan HH, Zhang TT, Sui H, Wei XL, et al. UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. *Pathology*. 2014;46(5):396-401.
12. Communications R. Downregulation of lncRNA uca1 as a diagnostic and prognostic biomarker for ovarian endometriosis. 2019;65(216):336-41.
13. Alberto-Aguilar DR, Hernández-Ramírez VI, Osorio-Trujillo JC, Gallardo-Rincón D, Toledo-Leyva A, Talamás-Rohana P. Ascites from Ovarian Cancer Induces Novel Fucosylated Proteins. *Cancer Microenviron*. 2019; 12(2-3):181-195.
14. Lu Y, Huang M, Deng T, Zhou X, Yu K, Liang M, Deng L, Xue J, Yi X, Ding Z, Gong Y, Zhu J, Wang Y, Wang Y, Song J, Tong R, Li L, Huang J, Na F, Zhao M, Chen C, Wei Y, Li W. Abstract CT133: a phase I trial of PD-1 deficient engineered T cells with CRISPR/Cas9 in patients with advanced non-small cell lung cancer with PD-L1 expression. *Cancer Res.*, 2018; 78 (13 Supplement): CT133-CT133.
15. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*. 2018; 9(1):1911.
16. Maddams J, Utley M, Møller H. Projections of cancer prevalence in the United Kingdom, 2010-2040. *Br J Cancer*. 2012;107(7):1195-202.
17. Yan Y, Chen Y, Jia H, Liu J, Ding Y, Wang H, et al. Patterns of life lost to cancers with high risk of death in China. *Int J Environ Res Public Health*. 2019;16(12):1-19.
18. Wang CJ, Zhu CC, Xu J, Wang M, Zhao WY, Liu Q, Zhao G, Zhang ZZ. The lncRNA UCA1 promotes proliferation, migration, immune escape and inhibits apoptosis in gastric cancer by sponging anti-tumor miRNAs. *Mol Cancer*. 2019 Jul 4;18(1):115. doi: 10.1186/s12943-019-1032-0.
19. Wang X, Peng F, Cheng L, Yang G, Zhang D, Liu J, et al. Prognostic and clinicopathological role of long non-coding RNA UCA1 in various carcinomas. *Oncotarget*. 2017;8(17):28373-84.
20. Chen P, Wan D, Zheng D, Zheng Q, Wu F, Zhi Q. Long non-coding RNA UCA1 promotes the tumorigenesis in pancreatic cancer. *Biomed Pharmacother [Internet]*. 2016;83:1220-6. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopha.2016.08.041>
21. Qin L ting, Tang R xue, Lin P, Li Q, Yang H, Luo D zhong, et al. Biological function of UCA1 in hepatocellular carcinoma and its clinical significance: Investigation with in vitro and meta-analysis. *Pathol Res Pract [Internet]*. 2018;214(9):1260-72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.03.025>
22. Jiao C, Song Z, Chen J, Zhong J, Cai W, Tian S, et al. LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation through functioning as a ceRNA of Sox4 in esophageal cancer. *Oncol Rep*. 2016;36(5):2960-6.
23. Yang Y, Jiang Y, Wan Y, Zhang L, Qiu J, Zhou S, et al. UCA1 functions as a competing endogenous RNA to suppress epithelial ovarian cancer metastasis. *Tumor Biol [Internet]*. 2016;37(8):10633-41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s13277-016-4917-1>
24. Wang J, Ye C, Liu J, Hu Y. UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABCBI axis. *Biochem Biophys Res Commun [Internet]*. 2018;501(4):1034-40. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.05.104>
25. Zhang L, Cao X, Zhang L, Zhang X, Sheng H, Tao K. UCA1 overexpression predicts clinical outcome of patients with ovarian cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2016;77(3):629-34.
26. Campos-Parra AD, López-Urrutia E, Moreno LTO, López-Camarillo C, Meza-Menchaca T, Figueroa González G, et al. Long non-coding RNAs as new master regulators of resistance to systemic treatments in breast cancer. *Int J Mol Sci*. 2018;19.(9)
27. Li Z, Niu H, Qin Q, Yang S, Wang Q, Yu C, et al. lncRNA UCA1 Mediates Resistance to Cisplatin by Regulating the miR-143/FOSL2-Signaling Pathway in Ovarian Cancer. *Mol Ther - Nucleic Acids [Internet]*. 2019;17(September):92-101. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2019.05.007>
28. Fang Z, Zhao J, Xie W, Sun Q, Wang H, Qiao B. LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by suppressing miR-184 expression. *Cancer Med*. 2017;6(12):2897-908.

Evaluation of the effects of *UCA1* gene knockout with a new CRISPR/Cas9 gene editing technique in ovarian cancer cell line

Behshad Montazeri-Najafabadi¹, Abbas Doosti^{2*}, Jafar Kiani³

Received: 2020.12.19

Revised: 2020.04.19

Accepted: 2021.05.05

1. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Biotechnology Research Center, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Department of Molecular Medicine, Faculty of Advanced Technologies in Medicine, Iran University of Medical Sciences (IUMS), Tehran, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

Pars J Med Sci 2021;19(1):10-20

Abstract:

Introduction:

lncRNAs play their roles in cell growth, transcription, translation, and apoptosis. *UCA1* is a type of lncRNA has a direct relationship with ovarian cancer. More than half of the women with ovarian cancer die within less than five years from the disease diagnosis. This study aims to knockout of *UCA1* gene using the CRISPR/Cas9 technique in SK-OV-3 cell and studying its effect on cell factors involved in cancer progress and apoptosis.

Materials and Methods:

Two types of sgRNAs for *UCA1* gene were designed. sgRNAs were cloned after synthesis in two vectors of PX459. The SK-OV-3 cell was transfected with two vectors carrying sgRNAs. The expression of *FAS*, *BAK*, *BAX*, and *P53* pro-apoptosis genes and *BCL2* and *SURVIVIN* anti-apoptosis genes were evaluated using the q-PCR. Besides, the cell proliferation rate and apoptosis induction were studied using MTT and flow cytometry.

Results:

The result showed the successful knockout of the *UCA1* gene in the SK-OV-3 cell line. The expression of *FAS*, *BAK*, *BAX*, and *P53* genes showed a meaningful increase related to the expression in manipulated cells compared to control cells ($p < 0.05$). Also, the expression decrease of *BCL2* and *SURVIVIN* genes was seen ($p < 0.05$). MTT and flow cytometry results confirmed the cell proliferation decrease and the apoptosis increase.

Conclusion:

UCA1 gene Knockout in the SK-OV-3 showed some positive effects in decreasing cancer cell proliferation and increasing the apoptosis rate can be said that inhibiting overexpression of the *UCA1* gene will play a positive role in controlling the growth of ovarian cancer cells.

Keywords: *UCA1*, Ovarian cancer, CRISPR/Cas9

* Corresponding author Email: