

بررسی بیان RNA ی غیر کد کننده ی بلند (*Hottip* (lncRNA) در رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی

لاله شبیری سیپجانی^۱، مجتبی عمادی بایگی^۱، مجدالدین رضایی^۲، حسین خان احمد^۲، پروانه نیک پور^{۲*}
گروه ژنتیک، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شهرکرد، شهرکرد، ایران؛ گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی، مرکز تحقیقات بیماری های ارثی
کودکان، پژوهشکده پیشگیری اولیه از بیماری های غیر واگیر، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران.
تاریخ دریافت: ۹۴/۱۱/۲۸ تاریخ پذیرش: ۹۵/۵/۴

چکیده:

زمینه و هدف: ملانوما یکی از انواع سرطان پوست است که نسبت به سایر سرطان های پوست خطرناک تر می باشد. یکی از عوامل موثر در ایجاد سرطان ها، گروهی از RNA های غیر کد کننده اند که به نام lncRNA (long noncoding RNA) شناخته می شوند. این مولکول های غیر کد کننده بیش از ۲۰۰ باز طول دارند و به عنوان یک تنظیم کننده در پیشرفت سرطان عمل می کنند *Hottip* (HOXA transcript at the distal tip) یک lncRNA ی بین ژنی است که از انتهای ۵' لوکوس *Hoxa* رونویسی می شود و ژن های انتهایی ۵' این لوکوس را فعال می کند. هدف از این مطالعه، بررسی میزان بیان این مولکول RNA در رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی بود.

روش بررسی: در این مطالعه بیان ژن *Hottip* با انجام تکنیک RT-PCR به صورت کیفی روی رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی بررسی شد. بدین منظور، از رده ی سلولی، RNA کل استخراج و سنتز cDNA انجام گرفت. با استفاده از پرایمرهای اختصاصی طراحی شده، ژن های *Hottip* و $\beta 2m$ تکثیر گردیدند. یافته ها: نتیجه مطالعه حاضر نشان دهنده ی عدم بیان ژن *Hottip* موشی در رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی است.

نتیجه گیری: در حالی که بر اساس مطالعات صورت گرفته در سرطان های انسانی انتظار می رفت *Hottip* افزایش بیان داشته باشد، *Hottip* موشی در رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی بیانی نشان نداد.

واژه های کلیدی: ملانوما، LncRNA، HOTTIP، رده ی سلولی B16F10.

مقدمه:

از ملانوسیت ها- سلول های تولید کننده ی ملانین- که در لایه ی تحتانی اپیدرم پوست وجود دارند، منشا می گیرد (۴). ملانوما نسبت به سایر سرطان های پوست رواج کمتری دارد و اگر در مراحل ابتدایی تشخیص داده نشود، خطرناک تر می باشد و عامل اکثر مرگ های وابسته به سرطان پوست است (۵).

یکی از عوامل مهم در به وجود آمدن سرطان ها و همچنین ملانوما lncRNA ها (long noncoding RNA)

سرطان پوست یکی از انواع سرطان هاست که شامل تغییرات غیر عادی در لایه ی بیرونی پوست است و به سه نوع اصلی ملانوما، سرطان سلول پایه و سرطان سنگفرشی تقسیم می شود (۱). این سرطان در انسان های با رنگ پوست روشن بسیار رایج تر است (۲). حدود ۸۰٪ سرطان های پوست غیرملانومایی سرطان سلول های پایه و حدود ۲۰٪ سرطان سلول های سنگفرشی می باشد. این دو سرطان به ندرت منجر به مرگ می شوند (۳). ملانوما

*نویسنده مسئول: اصفهان- دانشگاه علوم پزشکی اصفهان- گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی- مرکز تحقیقات بیماری های ارثی کودکان- پژوهشکده پیشگیری اولیه از بیماری های غیر واگیر- تلفن: ۰۳۱۳۷۹۲۹۱۴۳، E-mail: pnikpour@med.mui.ac.ir

سرطان و آتاکسی مخچه ای - نخاعی نوع ۸ در ارتباط است (۱۵).

HOTTIP یک RNA ی غیر کد کننده ی بلند بین ژنی است که از انتهای ۵ لوکوس (*HOXA (Homebox A)*) رونویسی می شود و ژن های چندگانه ی انتهای ۵ *HOXA* را فعال می کند. در مهره داران ۳۹ ژن *HOX* در ۴ خوشه ی ژنی وجود دارد که در ۴ لوکوس کروموزومی پراکنده شده اند (۱۶). ژن های *HOX* دسته ای از فاکتورهای رونویسی را کد می کنند که تنظیم کننده ی تکوین رویان و سرنوشت سلول هستند (۱۷). *HOTTIP* به طور مستقیم به پروتئین آداپتور WDR5 متصل می شود. این پروتئین کوفاکتور آنزیم هیستون متیل ترانسفراز (*KMT2A (lysine methyltransferase 2A)*) می باشد. این آنزیم لیزین ۴ هیستون ۳ را تری متیل می کند و در نتیجه، این متیلاسیون موجب فعال شدن ژن می شود (۱۶). متیلاسیون چهارمین لیزین در هیستون ۳ لوکوس های *HOX* توسط کمپلکس های خانوادگی MLL صورت می پذیرد. در پستانداران حداقل ۶ عضو از خانواده ی MLL وجود دارد (۱۸). به طور خلاصه *HOTTIP* یک عنصر کلیدی برای کنترل لوکوس ژن های *HOXA* است و لوپ شدن کروموزومی، *HOTTIP* را نزدیک انتهای ۵ ژن های *HOXA* می برد (۱۹). *HOTTIP*، در سرطان های ریه، کولون و پروستات در نقش آنکوژن فعالیت می کند و در هپاتوسلولار کارسینوما ی انسانی دچار افزایش بیان می شود (۱۷، ۲۰).

با توجه به نقش ژن *HOTTIP* در سرطان های مختلف و از آنجا که تاکنون مطالعه ای در زمینه سنجش بیان *HOTTIP* در ملانوما به انجام نرسیده است؛ هدف از انجام این مطالعه بررسی بیان ژن *Hottip* در رده ی سلولی B16F10 ملانوما ی موشی است.

روش بررسی:

یک جفت پرایمر برای ژن *Hottip* موشی و یک جفت پرایمر نیز برای ژن سرای گردان $\beta 2m$ موشی به

هستند (۶). ژنوم انسان دارای ۲۰۰۰۰ ژن کد کننده ی پروتئین است که این تعداد کمتر از ۲٪ توالی کل ژنوم انسان است. بسیار جالب است که ۹۰٪ ژنوم به طور فعالی رونویسی می شوند، اما فاقد پتانسیل کد کردن پروتئین هستند (۷). این رونوشت های غیر کد کننده می توانند به دو دسته RNA تقسیم شوند: ۱- RNA های غیر کد کننده ی بلند یا همان lncRNA ها که طولی بیش از ۲۰۰ باز دارند و حتی می توانند دارای طولی بیش از ۱۰۰ kb نیز باشند؛ ۲- RNA های غیر کد کننده ی کوتاه که شامل tRNA ها، microRNA ها و RNA های کوچک هسته ای (snRNA) می باشند و کمتر از ۲۰۰ باز طول دارند (۸). هشتاد درصد کل رونوشت های تهیه شده در سلول lncRNA ها هستند (۷). این RNA ها از این لحاظ که پردازش می شوند و دارای سیگنال های پلی آدنیلایون هستند، بسیار مشابه mRNA ها هستند (۹). lncRNA ها در ژنوم پستانداران بیان می شوند و تنظیم کننده های اصلی پرتوانی رویانی (Embryonic Pluripotency)، تمایز (Differentiation)، الگوسازی محورهای بدنی (Body Axis Patterning)، جلوگیری از مراحل تکوینی (Developmental Transitions) و تغییرات هیستونی (Histone Modification) هستند. تغییرات هیستونی به گونه ای است که برنامه های اپی ژنتیکی ترنسکرپتوم را متأثر می کند (۹-۱۱). مطالعات جدید نشان داده است که lncRNA ها به عنوان یک تنظیم کننده در ایجاد و توسعه ی سرطان عمل می کنند. آن ها این کار را با تقویت کردن تکثیر سلول توموری، القای آنژیوژنز، متاستاز، حمله و جلوگیری از سرکوب رشد انجام می دهند (۹، ۱۲، ۱۳). در یوکاریوت ها lncRNA ها در بسیاری از فرایندهای زیستی نقش دارند و اعمال متفاوتی انجام می دهند. مثلاً در غیر فعال سازی کروموزوم X، نشانه گذاری ژنومی (Imprinting)، سازماندهی ساختارهای درون سلولی، سازماندهی تلومر و سانترومر و رفت و آمدها به درون هسته شرکت می کنند (۱۴). تغییر در بیان این نوع RNA ها با چند نوع بیماری مانند آلزایمر،

دارای مرز آگرون- آگرون مشترک نبودند و برای همین امکان طراحی پرایمرها در مرز آگرون- آگرون نبود. بنابراین، یک جفت پرایمر بر روی آگرون دوم مشترک بین دو واریانت این ژن توسط نرم افزار Gene Runner ورژن ۶۷،۹،۴،۰ طراحی شد و در سایت NCBI بلست توالی انجام گرفت. طول و توالی پرایمرها در جدول شماره ۱ آورده شده است.

عنوان کنترل داخلی در روند آزمایش طراحی شد. توالی رونوشت حاصل از ژن *Hottip* موشی از پایگاه اطلاعاتی NCBI به دست آمد. این رونوشت دارای دو آگرون و یک اینترون بسیار بزرگ می باشد. رونوشت حاصل از این ژن دارای دو واریانت با شماره های دسترسی NR_110441 و NR_110442 می باشد که آگرون دوم این دو واریانت کاملاً یکسان ولی دارای آگرون اول متفاوت بودند. بنابراین

جدول شماره ۱: توالی و خصوصیات پرایمرهای طراحی شده

نام الیگو	توالی	طول توالی تکثیر شده (bp)	Tm (°C)
FHTIP	5'-GTTTGCCTAAGTCTGGTG-3'	۱۴۷	۵۹/۵
RHTIP	5'-CTCCCTCTGTTGCTTTGTC-3'		۵۸/۶
BMF	5'-GGAAGCCGAACATACTGAAC-3'	۲۴۷	۶۱/۲
BMR	5'-CACATGTCTCGATCCCAGTAG-3'		۶۱/۵

سلول های زنده رنگ به خود نگرفته و شفاف بودند، اما سلول های مرده به رنگ آبی تیره مشاهده شدند. با استفاده از کیت دیاتوم (ساخت شرکت گردیز- کشور روسیه) DNA و با استفاده از تریزول (ساخت شرکت اینویترژن آمریکا) RNA کل از رده ی سلولی مذکور طبق پروتکل استخراج شدند. همچنین با استفاده از پرایمرهای رندوم هگزامر و کیت سنتز cDNA (ساخت شرکت فرمتناز- کشور لیتوانی) سنتز cDNA انجام گرفت. برای حذف DNA ژنومی هضم با آنزیم DNase عاری از RNase (ساخت شرکت کیاژن- کشور آلمان) صورت پذیرفت. در این مطالعه PCR بر روی DNA و RNA استخراج شده از رده ی سلولی مذکور و همچنین cDNA سنتز شده از RNA استخراج شده صورت پذیرفت. این

رده ی سلولی کشت داده شده در این آزمایش رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی بود که از انستیتو پاستور تهران خریداری شد. محیط کشت مورد استفاده برای کشت این رده ی سلولی حاوی ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) (ساخت شرکت BIO Idia- کشور ایران)، ۹۰٪ محیط کشت DMEM با غلظت پایین گلوکز (ساخت شرکت BIO Idia- کشور ایران) و ۱٪ آنتی بیوتیک های پنی سیلین و استرپتومایسین (ساخت شرکت BIO Idia- کشور ایران) بود. سلول ها در فلاسک فیلتردار در انکوباتور ۳۷ درجه سانتیگراد رشد داده شدند. برای شمارش سلول ها از لام نئوبار و برای بررسی میزان زنده بودن سلول ها از رنگ تریپان بلو (ساخت شرکت سیگما آلدریج- کشور آمریکا) استفاده شد. بدین صورت که

واکنش در حجم ۲۵ میکرولیتر شامل ۲/۵ میکرولیتر بافر واکنش ۱۰X، ۰/۷۵ میکرولیتر $MgCl_2$ (۵۰ میلی مول)، ۱ میکرولیتر dNTP، ۱ میکرولیتر از هر پرایمر (۱۰pM)، ۰/۲۵ میکرولیتر Taq DNA Polymerase و ۵ میکرولیتر DNA یا RNA الگو و با برنامه ی زمانی داده شده طبق جدول شماره ۲ و ۳ صورت پذیرفت.

جدول شماره ۲: برنامه ی زمانی صورت گرفته برای انجام PCR برای ژن *Hottip* موشی

تعداد سیکل	مدت زمان	دمای واکنش (°C)	مراحل انجام واکنش
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	دنا تورا سیون اولیه
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا تورا سیون
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۵	اتصال پرایمر
۳۵	۳۰ ثانیه	۷۲	تکثیر توالی
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	تکثیر نهایی

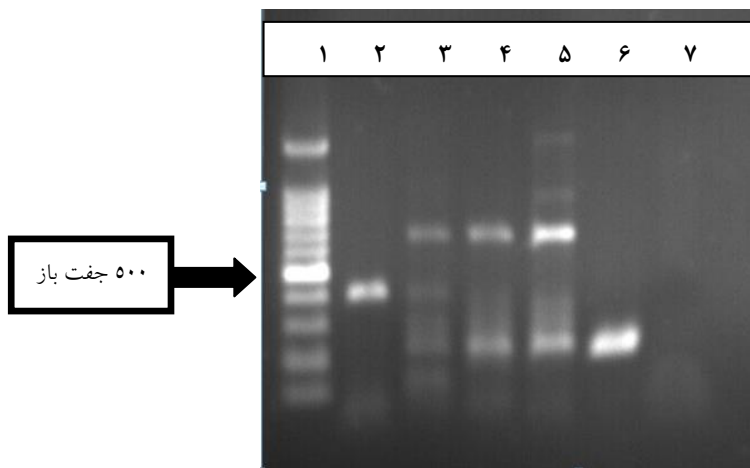
جدول شماره ۳: برنامه ی زمانی صورت گرفته برای انجام PCR برای ژن سرای گردان $\beta 2m$

تعداد سیکل	مدت زمان	دمای واکنش (°C)	مراحل انجام واکنش
۱	۱۰ دقیقه	۹۵	دنا تورا سیون اولیه
۳۵	۳۰ ثانیه	۹۵	دنا تورا سیون
۳۵	۳۰ ثانیه	۵۸	اتصال پرایمر
۳۵	۳۰ ثانیه	۷۲	تکثیر توالی
۱	۱۰ دقیقه	۷۲	تکثیر نهایی

یافته ها:

قرار گرفت تا تمامی DNA اضافی محتمل موجود از بین برود. سپس این مخلوط به دو ویال اضافه شد. در ویال اول از RNA موجود سنتز cDNA صورت گرفت و در ویال دوم RNA به همان صورت باقی ماند. سپس بر روی هر دو ویال PCR صورت گرفت.

برای بهینه سازی شرایط PCR، بر روی سه ژن مختلف NIS انسانی، *Hottip* و $\beta 2m$ موشی در یک PCR، گرادیان دمایی بین ۵۴ تا ۶۰ درجه سانتیگراد گذاشته شد (تصویر شماره ۱). ابتدا RNA کل استخراج شد. RNA استخراج شده با آنزیم DNase I مورد تیمار

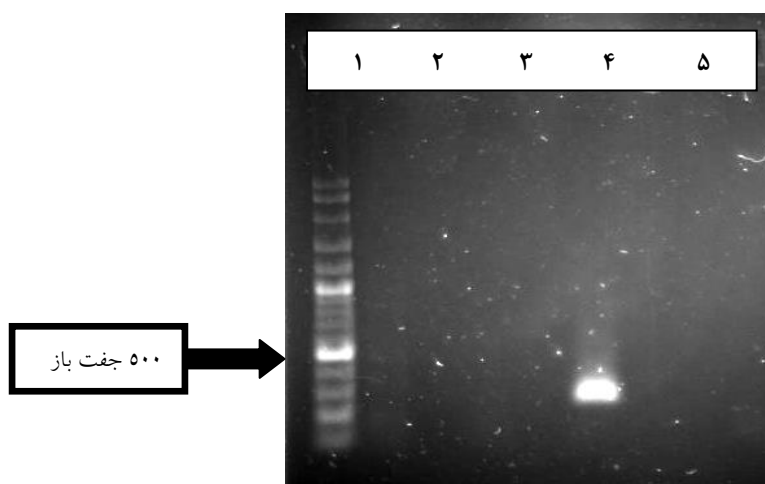


تصویر شماره ۱: نتایج ژل آگارز بهینه سازی شرایط PCR

(۱) مارکر 100 bp ؛ (۲) PCR بر روی ژن *NIS* انسانی در دمای اتصال 60°C درجه سانتیگراد به عنوان کنترل مثبت برای بررسی صحت فرآیند PCR؛ (۳) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی *cDNA* سنتز شده از *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال $55/3^\circ\text{C}$ ؛ (۴) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال $55/3^\circ\text{C}$ ؛ (۵) کنترل منفی برای ژن *Hottip* موشی در دمای اتصال $55/3^\circ\text{C}$ ؛ (۶) PCR با پرایمرهای بتامیکروگلوبولین موشی بر روی *cDNA* سنتز شده از *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال $58/1^\circ\text{C}$ ؛ (۷) کنترل منفی برای ژن بتامیکروگلوبولین موشی در دمای اتصال $58/1^\circ\text{C}$ درجه سانتیگراد

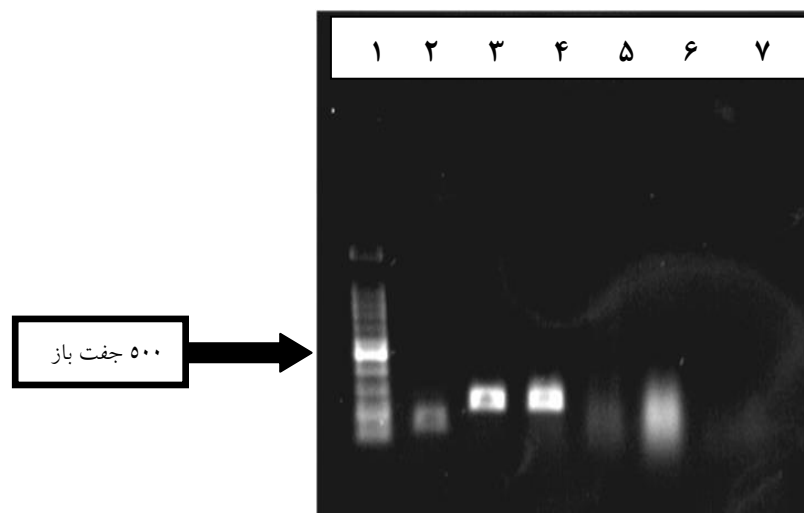
مشخص گردید که ژن *Hottip* موشی در رده ی سلولی B16F10 ملانومای موشی بیان نمی شود.

با دو PCR صورت گرفته که نتایج ژل آگارز آن به ترتیب در تصاویر شماره ۲ و ۳ نشان داده شده است



تصویر شماره ۲: نتایج ژل آگارز PCR

(۱) مارکر 100 bp ؛ (۲) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی *cDNA* سنتز شده از *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال 55°C ؛ (۳) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال 55°C ؛ (۴) PCR با پرایمرهای بتامیکروگلوبولین موشی بر روی *cDNA* سنتز شده از *RNA* تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال 58°C ؛ (۵) کنترل منفی برای ژن *Hottip* موشی در دمای اتصال 55°C درجه سانتیگراد



تصویر شماره ۳: نتایج ژل آگارز PCR

(۱) مارکر 1000 bp (۲) با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی DNA استخراج شده از رده ی سلولی به عنوان کنترل مثبت؛ (۳) PCR با پرایمرهای بتامیکروگلوبولین موشی بر روی cDNA ای که قبلاً سنتز شده از RNA تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال ۵۸؛ (درجه سانتیگراد) (۴) PCR با پرایمرهای بتامیکروگلوبولین موشی بر روی cDNA ای که جدیداً از RNA تیمار شده با *DNase I* سنتز شده در دمای اتصال ۵۸؛ (درجه سانتیگراد) (۵) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی cDNA سنتز شده از RNA تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال ۵۵؛ (درجه سانتیگراد) (۶) PCR با پرایمرهای *Hottip* موشی بر روی RNA تیمار شده با *DNase I* در دمای اتصال ۵۵؛ (درجه سانتیگراد) (۷) کنترل منفی برای ژن *Hottip* موشی در دمای اتصال ۵۵. (درجه سانتیگراد)

بحث:

همکاران گزارش کردند که *HOTTIP* در نمونه های هیپاتوسلولار کارسینومای انسانی به شدت دچار افزایش بیان می شود (۱۷). Jiang و Bickle برای فهمیدن نقش lncRNA ها در محافظت رسپتور ویتامین D در برابر ایجاد سرطان پوست سطح بیان نود *lncRNA* را که بیش از بقیه در موش مطالعه شده اند در کراتینوسیت های موشی که رسپتور ویتامین D شان حذف شده بود مقایسه کردند و دریافتند که چند آنکوژن بسیار شناخته شده مانند *H19* و *Hottip* و *Nespas* در این کراتینوسیت ها به طور قابل توجهی افزایش بیان پیدا کرده اند (۱۹). در هر حال، تاکنون در هیچ پژوهشی بیان *HOTTIP* در بیماری ملانوما که در آن ملانوسیت ها وارد فرآیند تومورزایی می شود گزارش نشده است و مطالعه حاضر، اولین مطالعه در این زمینه می باشد. بازیابی اطلاعات بیان

و همکاران با آنالیزهای مختلفی، *lncRNA* های دخیل در ملانوما انسانی را شناسایی کردند. آن ها آزمایش های خود را بر روی ۸ رده ی سلولی ملانوما انسانی مختلف شامل *LOX-IMV1*، *WM1552C*، *A375*، *HT144*، *RPMI-7951*، *K-MEL-2*، *G361*، *WM793B* و ملانوسیت و کراتینوسیت انجام دادند و به این نتیجه رسیدند که *lncRNA* ای به نام *SPRY-IT1* در ملانوما دچار افزایش بیان می شود که این افزایش بیان در تهاجم و جلوگیری از آپوپتوز در سرطان نقش دارد (۲۰). از طرف دیگر، اخیراً ارتباط بین افزایش بیان *HOTTIP* و سرطان های ریه، زبان و پانکراس مشخص شده است (۲۱-۲۳). در این سرطان ها افزایش بیان ژن *HOTTIP* با رشد تومور، جلوگیری از مرگ سلولی و افزایش حیات و مهاجرت سلولی ارتباط دارد. همچنین، *Quagliata* و

سرطان پوست، شش، کلون و پروستات نقش آنکوژن دارد (۱۹).

IncRNA از پایگاه داده ای IncRNA نیز بیانگر آن است که این مولکول در ملانوسیت ها بیان نمی شود.

تشکر و قدردانی:

از خانم ها الهام قاسمپور و لیلا درزی که در انجام بخشی از مطالعه همکاری داشته اند سپاسگزاری می گردد. این پژوهش به عنوان بخشی از پایان نامه ی کارشناسی ارشد خانم لاله شیرینی در دانشکده ی علوم پایه ی دانشگاه شهرکرد در تاریخ ۱۳۹۳/۱۲/۱۷ با کد ۱۶۱/۴۱۳ به تصویب رسید.

نتیجه گیری:

مطالعه حاضر حاکی از عدم بیان *Hottip* در رده ی سلولی ملانومایی B16F10 موشی است، هر چند که تصور می شد این ژن در این رده سلولی دچار افزایش بیان گردد زیرا *Hottip* در کراتینوسیت های موشی فاقد رسپتور ویتامین D افزایش بیان داشت و از طرفی در سرطان های زیادی مانند هیاتوسلولار کارسینوما،

منابع:

1. Cakir BO, Adamson P, Cingi C. Epidemiology and economic burden of nonmelanoma skin cancer. *Facial Plast Surg Clin North Am.* 2012; 20(4): 419-22.
2. Leiter U, Garbe C. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer: The role of sunlight. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 624: 89-103.
3. Marsden J, Rajpar S. ABC of skin cancer. *Dermatol Surg.* 2009; 35(7):1136.
4. George Liddell H, Scott R. Drugs in clinical development for melanoma. *Pharmaceut Med.* 2012; 26: 171-183.
5. Jerant AF, Johnson JT, Sheridan CD, Caffrey TJ. Early detection and treatment of skin cancer. *Am Fam Physician.* 2000; 62(2): 357-68.
6. Maruyama R, Suzuki H. Long non-coding RNA involvement in cancer. *BMB Reports.* 2012; 45: 604-11.
7. Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS. Long non-coding RNAs: Insights into functions. *Nat Rev Genet.* 2009; 10(3): 155-9.
8. Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, et al. Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25915.
9. Mattick JS. Long noncoding RNAs in cell and developmental biology. *Semin Cell Dev Biol.* 2011; 22(4): 327.
10. Batista PJ, Chang HY. Long noncoding RNAs: Cellular address codes in development and disease. *Cell.* 2013; 152(6): 1298-307.
11. Spitale RC, Crisalli P, Flynn RA, Torre EA, Kool ET, Chang HY. RNA SHAPE analysis in living cells. *Nat Chem Biol.* 2013; 9(1): 18-20.
12. Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 2012; 9(6): 703-19.
13. Li X, Wu Z, Fu X, Han W. Long noncoding RNAs: Insights from biological features and functions to diseases. *Med Res Rev.* 2013; 33(3): 517-53.
14. Baldassarre A, Masotti A. Long non-coding RNAs and p53 regulation. *Int J Mol Sci.* 2012; 13(12): 16708-17.
15. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet.* 2011; 12(12): 861-74.
16. Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, et al. Long noncoding RNA programs active chromatin domain to coordinate homeotic gene activation. *Nature.* 2011; 472(7341): 120-4.

17. Quagliata L, Matter MS, Piscuoglio S, Arabi L, Ruiz C, Procino A, et al. Long noncoding RNA HOTTIP/HOXA13 expression is associated with disease progression and predicts outcome in hepatocellular carcinoma patients. *Hepatology*. 2014; 59(3): 911-23.
18. Ruthenburg AJ, Allis CD, Wysocka J. Methylation of lysine 4 on histone H3: Intricacy of writing and reading a single epigenetic mark. *Mol Cell*. 2007; 25(1): 15-30.
19. Jiang YJ, Bikle DD. LncRNA profiling reveals new mechanism for VDR protection against skin cancer formation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2014; 144(2): 87-90.
20. Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, Crawford J, Smith MA, Mattick JS, et al. The melanorna-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res*. 2011; 71: 3852-62.
21. Deng HP, Chen L, Fan T, Zhang B, Xu Y, Geng Q. Long non-coding RNA HOTTIP promotes tumor growth and inhibits cell apoptosis in lung cancer. *Cell Mol Biol*. 2015; 61(4): 34-40.
22. Zhang H, Zhao L, Wang YX, Xi M, Liu SL, Luo LL. Long non-coding RNA HOTTIP is correlated with progression and prognosis in tongue squamous cell carcinoma. *Tumour Biol*. 2015; 36(11): 8805-9.
23. Cheng Y, Jutooru I, Chadalapaka G, Corton JC, Safe S. The long non-coding RNA HOTTIP enhances pancreatic cancer cell proliferation, survival and migration. *Oncotarget*. 2015; 6(13): 10840-52.

Evaluation of the expression of *Hottip* long noncoding RNA in the B16F10 murine melanoma cell line

Shiri Sichani L¹, Emadi- Baygi M¹, Rezaei M², Khanahmad H², Nikpour P^{2*}

¹Genetics Dept., Research Institute of Biotechnology, University of Shahrekord, Shahrekord, I.R. Iran; ²Genetics and Molecular Biology Dept., Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran.

Received: 17/Feb/2016 Accepted: 25/Jul/2016

Background and aims: Melanoma is the most dangerous form of skin cancer. One of the remarkable cancer- causing factors is non-coding RNAs including lncRNAs (long noncoding RNA). lncRNAs have more than 200 bases and act as a key regulator of cancer progression. *HOTTIP* (HOXA transcript at the distal tip) is an intergenic lncRNA that is transcribed from the 5' end of the *HOXA* locus and activates the genes of the 5' end of this locus. The aim of this study was to evaluate the expression of this lncRNA in the B16F10 murine melanoma cell line.

Methods: In this study, the expression of *Hottip* gene was studied on B16F10 murine melanoma cell line using qualitative RT-PCR. Total RNA was extracted and cDNA was synthesized. *Hottip* and $\beta 2m$ genes were amplified using designed specific primers.

Results: The result showed that *Hottip* did not express in the B16F10 murine melanoma cell line.

Conclusion: In contrast to the previous studies revealing increased expression of *HOTTIP* in human cancers, murine *Hottip* does not express in the B16F10 murine melanoma cell line.

Keywords: Melanoma, lncRNA, *HOTTIP*, B16F10 cell line.

Cite this article as: Shiri Sichani L, Emadi- Baygi M, Rezaei M, Khanahmad H, Nikpour P. Evaluation of the expression of *Hottip* long noncoding RNA in the B16F10 murine melanoma cell line. J Shahrekord Univ Med Sci. 2017; 19(2): 51-59.

***Corresponding author:**

Genetics and Molecular Biology Dept., Pediatric Inherited Diseases Research Center, Research Institute for Primordial Prevention of Non-communicable Disease, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, I.R. Iran. Tel: 00983137929143, E-mail: pnikpour@med.mui.ac.ir