

Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells

Maryam Khani^{1,2}, Arash Javeri¹, Arezoo Bazargani¹, Gilda Karimi², Masoumeh Fakhr Taha^{1*}

1. Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute for Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.

2. Department of Cell and Molecular Biology, Faculty of Biological Sciences, Kharazmi University, Tehran, Iran.

Received: August 23, 2023; Accepted: December 10, 2023

Abstract

Background and Aim: The miR-302/367 cluster plays a critical role in reprogramming of somatic cells into pluripotent stem cells and maintaining pluripotency. While, several studies have been conducted on the mechanism of miR-302/367 cluster in reprogramming, little research has been done specifically on the effect of this cluster on mTOR signaling pathway. The mTOR pathway not only controls various cellular processes, such as proliferation, differentiation and autophagy, but also plays a significant role in the reprogramming process. Therefore, the present study aimed to investigate the effect of miR-302/367 cluster on the mTOR pathway in adipose tissue-derived stem cells (ADSCs).

Methods: In this experimental study, the third to fifth-passaged ADSCs were transfected with TDH101PA-GP vector expressing mir-302/367 cluster and the mock vector using a Neon Transfection Kit and Neon Transfection System. One week after transfection, the expression of some mTOR signaling molecules in the ADSCs was assessed by comparative Real-Time PCR. Relative gene expression between the miR-302/367 and mock groups (4 replicates) was calculated by REST 2009 software based on Pair Wise Reallocation Randomization Test. Also, the expression of some mTOR pathway proteins was assessed by western blot analysis.

Results: The overexpression of miR-302/367 cluster significantly reduced the expression of *AKT*, *MTOR*, *RAPTOR*, and *RICTOR* genes; the expression of these genes in the miR-302/367 transfection group compared to the mock group decreased to 0.44, 0.51, 0.56 and 0.6, respectively ($P < 0.05$). The expression of genes in the mock group was assumed as one. Also, as revealed by western blot analysis, the expression of phosphorylated AKT and phosphorylated MTOR proteins decreased in the ADSCs transfected with miR-302/367 cluster compared to the mock group.

Conclusion: Overexpression of the miR-302/367 cluster appears to inhibit the activity of the mTOR signaling pathway in ADSCs affecting the cell reprogramming through this mechanism.

Keywords: miR-302/367 cluster; Transfection; mTOR pathway; ADSC; *AKT* gene; *MTOR* gene; *RICTOR* gene; *RAPTOR* gene; Phosphorylated AKT; Phosphorylated MTOR

Please cite this article as: Khani M, Javeri A, Bazargani A, Karimi G, Fakhr Taha M. Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue-Derived Stem Cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):28-37.

*Corresponding Author: Masoumeh Fakhr Taha; Email: mftaha@nigeb.ac.ir

Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Institute for Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology (NIGEB), Tehran, Iran.



بررسی تأثیر بیش بیان کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی انسانی

مرویم خانی^{۱*}، آرش جاوری^۱، آرزو بازرگانی^۱، گیلدا کریمی^۲، معصومه فخرطه^۱

۱- گروه سلول های بنیادی و پژوهشی بازساختی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.

۲- گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۹/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۰۱

چکیده

سابقه و هدف: کلاستر miR-302/367 نقش مهمی در باز برنامه ریزی سلول های سوماتیک به سلول های بنیادی پرتوان و حفظ پرتوانی ایفا می کند. تا به حال، مطالعه های متعددی در زمینه مکانیسم عمل کلاستر miR-302/367 در باز برنامه ریزی انجام شده، اما یافته چندانی درباره تأثیر اختصاصی این کلاستر بر مسیر پیام رسان mTOR وجود ندارد. مسیر mTOR علاوه بر کنترل روندهای سلولی مختلف، نظری تکثیر، تمایز و اتو فاژی، نقش مهمی را در فرآیند باز برنامه ریزی بر عهده دارد. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف شناسایی تأثیر کلاستر miR-302/367 روی مسیر mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی طراحی شد.

روش کار: در این مطالعه تجربی، سلول های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساز سوم تا پنجم با استفاده از کیت و سیستم ترنسفکشن نئون با وکتور TDH101PA-GP تبیان کننده کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock ترنسفکت شدند. یک هفته پس از ترنسفکشن، بیان برخی از ژن های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی با روش Real-Time PCR مقایسه ای بررسی شد. نسبت بیان ژن ها در گروه های Mock و miR-302/367 (۴ تکرار)، با استفاده از نرم افزار REST 2009 و آزمون Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test بین دو گروه مقایسه شد. همچنین، بیان برخی از پروتئین های مسیر mTOR با روش وسترن بلات ارزیابی شد.

یافته ها: بیش بیان کلاستر miR-302/367 سبب کاهش معنادار در بیان ژن های AKT RICTOR MTOR RAPTOR شد، به طوری که بیان این ژن ها در گروه miR-302/367 نسبت به گروه Mock به ترتیب به ۰/۴۴، ۰/۵۱، ۰/۵۶ و ۰/۱۶ کاهش یافت ($P<0.05$). بیان ژن ها در گروه Mock یک در نظر گرفته شد. همچنین، طبق بررسی وسترن بلات بیان پروتئین های AKT MTOR فسفریله و فسفریله در سلول های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با کلاستر miR-302/367 کمتر از گروه Mock بود.

نتیجه گیری: به نظر می رسد که بیش بیان خوش miR-302/367 می تواند فعالیت مسیر پیام رسان mTOR را در سلول های بنیادی بافت چربی مهار کند و با این مکانیسم باز برنامه ریزی سلول ها را تحت تأثیر قرار دهد.

وازگان کلیدی: کلاستر miR-302/367، ترنسفکشن، مسیر mTOR، سلول های بنیادی بافت چربی، ژن AKT، ژن RAPTOR، ژن MTOR، ژن RICTOR

فسفریله، فسفریله MTOR

به این مقاله، به صورت زیر استناد کنید:

Khani M, Javeri A, Bazargani A, Karimi G, Fakhr Taha M. Investigating the Effect of miR-302/367 Cluster Overexpression on the Expression of mTOR Signaling Pathway Genes in Human Adipose Tissue- Derived Stem Cells. Pejouhesh dar Pezeshki. 2024;48(1):28-37.

*نویسنده مسئول مکاتبات: معصومه فخرطه؛ آدرس پست الکترونیکی: mftaha@nigeb.ac.ir

گروه سلول های بنیادی و پژوهشی بازساختی، پژوهشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، بلوار پژوهش، تهران، ایران.



مقدمه

مختلف مانند مسیر TGF- β تسهیل می کند (۱۲، ۱۱). همچنین، miR-302 سبب مهار مرگ سلولی ناشی از اکسیدان در سلول های بنیادی مزانشیمی انسانی می شود (۱۳).

با وجود مطالعه های متعددی که پیشتر به بررسی مکانیسم عمل کلاستر miR-302/367 در القای باز برنامه ریزی و تولید سلول های بنیادی پرتوان القا شده پرداخته است (۱۱، ۱۲، ۱۴)، یافته چندانی در زمینه تأثیر اختصاصی این کلاستر بر مسیر پیام رسان mTOR در طی باز برنامه ریزی وجود ندارد.

پروتئین هدف را پامایسین MTOR یک سرین ترئونین کیناز داخل سلولی با وزن مولکولی ۲۸۹ کیلو دالتون است که در سال ۱۹۹۴ در طی مطالعه مکانیسم اثر آن کشف شد. mTOR بخشی از دو مجموعه مجزا به نام mTORC1 (شامل mTORC2 و PRAS40) و mTORC2 (شامل Raptor و mLST8) است و در کل عملکردهای Rictor mLST8 و mSIN1 است. نقش متعددی را در سلول ها کنترل می کند که بیان ژن ها، ترجمه پروتئین، بیوژنر ریبو zoom، رشد سلولی، تکثیر، متابولیسم سلولی، بقا و انواع مرگ سلولی، شامل آپوپتوز، اتونفازی و نکروپتوز، از آن جمله اند (۱۵). اختلال در تنظیم مسیر پیام رسان با بیماری های مختلف، از جمله سرطان، مرتبط است. به علاوه، مسیر mTOR با مکانیسم های مختلف، از جمله تنظیم اتونفازی، پیری، تبدیل مزانشیمی به اپیتلیال (MET) و تکثیر، نقش مهمی در فرآیند باز برنامه ریزی سلول های سوماتیک به سلول های بنیادی پرتوان القایی ایفا می کند (۱۵-۲۰).

در مطالعه های پیشین، AKT1 به عنوان یک هدف مستقیم miR-302 شناسایی شده (۲۱) و بیش از ۱۰۰ سوبسٹرای احتمالی برای AKT گزارش شده است (۳۰). یکی از سوبسٹراهای مهم AKT مجموعه پروتئینی TSC1/TSC2 است که در بالادرست mTORC1 عمل می کند (۲۲) و نقش احتمالی کلاستر miR-302/367 را در تنظیم مسیر پیام رسانی mTOR در طی باز برنامه ریزی مطرح می کند. بر این اساس، مطالعه حاضر با هدف تعیین تأثیر کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی طراحی شد. این پژوهش در سال ۱۴۰۱ در آزمایشگاه گروه

MicroRNAs (miRNAs) یک گروه از RNA های غیر کد کننده (ncRNAs) با طول حدود ۲۲-۱۸ نوکلئوتید هستند که به عنوان تنظیم کننده اصلی بیان ژن در سطح پس از رونویسی عمل می کنند (۱). miRNA ها به ناحیه ۳'UTR منطقه کد کننده mRNA هدف متصل می شوند و سبب مهار ترجمه یا تخریب mRNA می شوند (۲). microRNA ها در فرآیندهای زیست شناختی مختلف، از جمله باز برنامه ریزی سلول های سوماتیک و تولید سلول های بنیادی پرتوان القا شده، نقش دارند. مطالعه های پیشین نشان داده است که چندین گروه miRNA، از جمله کلاسترها miR-302/367 و miR-371، به طور اختصاصی در سلول های بنیادی پرتوان بیان می شوند و بیان آنها با تمایز کاهش می یابد و در بافت های بالغ خاموش می شود (۳). این miRNA ها کارایی باز برنامه ریزی C-MYC و KLF4، SOX2، OCT4 و LARP7 را افزایش می دهند یا می توانند جایگزین یک یا چند فاکتور توسط فاکتور های یامانا کا (Yamanaka factors) باشند. این نسخه برداری ضروری برای تولید سلول های بنیادی پرتوان القا شده شوند (۴).

کلاستر miR-302/367 شامل پنج عضو miR-302a، miR-302b، miR-302c، miR-302d و miR-367 است. این کلاستر در یک اینtron از ژن LARP7 روی کروموزوم ۴ انسانی قرار دارد. کلاستر miR-302/367 در سلول های بنیادی جنینی و سلول های بنیادی پرتوان القا شده (iPSC) بیان بالای دارد و بیان آن در طول تمایز کاهش می یابد (۵). مطالعه های پیشین نشان داده است که بیان کلاستر miR-302/367 توسط فاکتور های نسخه برداری خاص پرتوانی القا می شود (۶) و به حفظ پرتوانی در سلول های بنیادی جنینی کمک می کند (۷-۹). همچنین، کلاستر miR-302/367 نقش مهمی در باز برنامه ریزی سلول های سوماتیک به سلول های بنیادی پرتوان القایی (iPSCs) ایفا می کند (۱۰-۱۲). طبق یافته های موجود، بیش بیان کلاستر miR-302/367 تولید سلول های بنیادی پرتوان القایی را با مهار انتقال اپیتلیال به مزانشیمی (EMT)، القای تکثیر، تغییر های اپی ژنتیک و هدف قرار دادن مسیرهای

نکرده بودند، ۴۸ ساعت پس از الکتروپوریشن، محیط سلول ها تعویض و آنتی بیوتیک پورومایسین (Puromycin dihydrochloride , Bio Basic) با غلظت $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ به محیط کشت اضافه شد.

بررسی بیان ژن ها در سلول های بنیادی بافت چربی Real-time PCR تنسفکت شده با miR-302/367 با روش استخراج RNA از سلول های تنسفکت شده با استفاده از کیت RNX Plus شرکت سیناکلون و مطابق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد. پس از استخراج RNA و تعیین غلظت آن با دستگاه نانودرآپ، مقادیر مساوی RNA از گروه های تنسفکشن با وکتور حاوی خوشه miR-302/367 و وکتور Mock (۴ تکرار Sinaclon First Strand cDNA بیولوژیک) به وسیله کیت Synthesis Kit شرکت سیناکلون به cDNA تبدیل شد. برای بررسی کمی بیان ژن ها از Quantitative real-time PCR و آنالیز داده ها بر مبنای روش مقایسه ای استفاده شد. واکنش به وسیله کیت SYBR Green qPCR Master Mix از شرکت Ampliqon و با استفاده از cDNA سنتز شده و پرایمر های اختصاصی برای ژن های مورد بررسی (جدول ۱) انجام شد. از ژن های B2M و GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. Rotor Gene-6000 Real-Time analyzer (Corbett Research, Australia) بیان ژن ها با استفاده از نرم افزار REST 2009 (Relative Expression Software Tool, Qiagen) و با آزمون ®Pair Wise Fixed Reallocation Randomization Test بین گروه ها مقایسه شد (۲۵). نمودار نهایی با استفاده از نرم افزار Microsoft Excel رسم شد.

سلول های بنیادی و پزشکی بازساختی پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری انجام شد.

روش کار

سلول های بنیادی بافت چربی مورد استفاده در این پژوهش تجربی پیشتر با استفاده از آنزیم کلائزناز از بافت چربی شکمی چهار خانم ۴۰ تا ۵۰ ساله، که در بیمارستان عرفان تهران تحت عمل جراحی ابdominoپلاستی انتخابی قرار گرفتند، جداسازی و شناسایی شده بود (۲۴، ۲۳). مطالعه فوق توسط کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری (IR.NIGEB.EC.1400.2.26.B) تأیید شد.

سلول های بنیادی بافت چربی در ظروف کشت حاوی محیط DMEM, Gibco, Life Technologies,) DMEM کشت (FBS, Gibco (USA) با ۲۰ درصد سرم جنین گاوی (GIBCO) با استفاده شدند. سلول ها پس از رسیدن به تراکم ۸۰-۹۰ درصد با استفاده از Trypsin-EDTA (۰/۲۵ درصد، شرکت GIBCO) پاسازداده شدند. سلول های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساز ۳ تا ۵ برای تنسفکشن با وکتور TDH101PA-GP بیان کننده کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock استفاده شدند. میزان تراکم سلول ها در روز تنسفکشن حدود ۷۰-۸۰ درصد بود. تنسفکشن با استفاده از Neon Transfection kit (شرکت Invitrogen) و طبق روش پیشنهادی شرکت سازنده با استفاده از دستگاه Neon transfection system (Invitrogen) انجام گرفت. کارایی تنسفکشن با میکروسکوپ فلوروستت بررسی شد. با توجه به اینکه وکتور TDH101PA-GP دارای ژن مقاومت به پورومایسین است، برای حذف سلول هایی که وکتور را دریافت

جدول ۱- پرایمر های مورد استفاده برای بررسی بیان ژن ها با Real- time PCR

Target	Accession	Forward	Reverse	Size
B2M	NM_004048	5'-TCCAGCGTACTCCAAAGATTCA-3'	5'-GTCAACTTCAATGTCGGATGGAT-3'	113
GAPDH	NM_002046	5'-TCACCATCTTCCAGGAGCGA-3'	5'-CAAATGAGCCCCAGCCTTCT-3'	116
RPTOR	NM_020761	5'-ATGAAGGATCGGATGAAGACAG-3'	5'-CTTCTGAGGACCCATCGAC-3'	142
MTOR	NM_004958	5'-GAAATTGATCAGGTGTGCCAG-3'	5'-ATACTGGGTATCTGTGAAGGCA-3'	133
AKT	NM_005163.2	5'-ACAAACGAGGGAGTACATCAA-3'	5'-TCTTCATCAGCTGGCACTGC-3'	156
RICTOR	NM_152756	5'-ACTAGCACTTCAGAACATCCAGAG-3'	5'-TCTACATCAGCTCGCACATACT-3'	168

(SantaCruz Biotechnology; sc-47778) و آنتی بادی ثانویه (SantaCruz) mouse anti-rabbit IgG-HRP (Biotechnology; sc-2357) انجام گرفت. برای مشاهده باندها از ECL Western Blotting kit شرکت سیتو متین ژن و فیلم رادیولوژی استفاده شد.

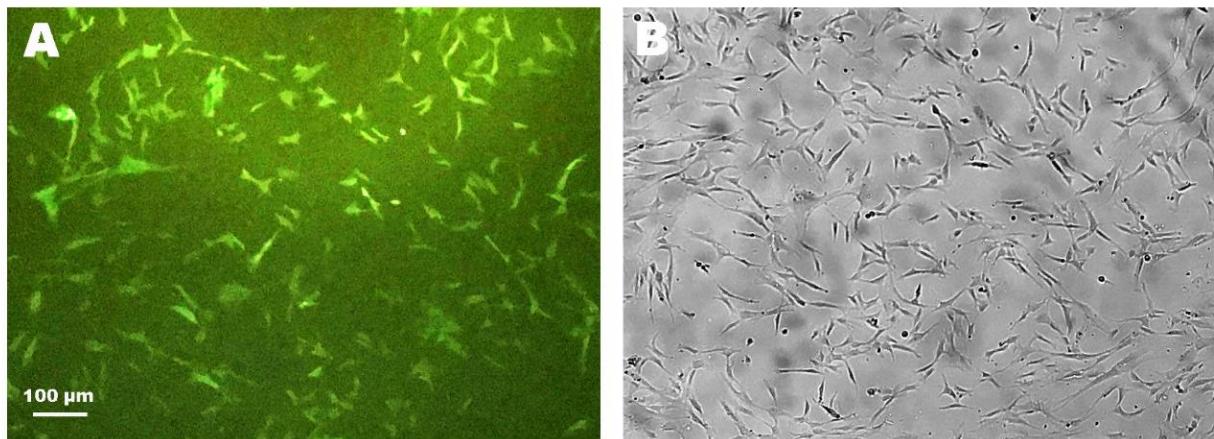
یافته ها

کشت و ترنسفکشن سلول های بنیادی بافت چربی انسانی (hADSCs)

سلول های بنیادی بافت چربی در مرحله پاساز سوم تا پنجم با وکتور بیان کننده کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock ترنسفکت شدند. شکل ۱، بیان GFP را در سلول های ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 یک هفته پس از ترنسفکشن و انتخاب با آنتی بیوتیک پورومایسین نشان می دهد.

بررسی بیان پروتئین ها با وسترن بلات

در این مطالعه بررسی بیان پروتئین های AKT، MTOR، AKT-P و MTOR-P با وسترن بلات انجام شد. پروتئین سلول های تمایز یافته با استفاده از بافر RIPA حاوی مهار کننده های پروتئاز (Sigma) استخراج شد. غلظت پروتئین ها با روش Bradford اندازه گیری شد. از BSA به عنوان پروتئین استاندارد برای اندازه گیری غلظت پروتئین ها استفاده شد. ۵۰ میکرو گرم پروتئین از هر گروه روی ژل پلی اکریلامید ۱۰ درصد الکتروفورز شد. انتقال پروتئین از ژل به غشای PVDF با استفاده از سیستم ترانسفر BIO-RAD انجام شد. بلوکه کردن پروتئین های غیر اختصاصی با Skim milk ۵ درصد به مدت یک ساعت انجام گرفت. رنگ آمیزی با آنتی بادی های اولیه SantaCruz (mTOR، Elabscience; E-AB-30471) AKT Phospho-Akt (Ser473)، (Biotechnology; sc-517464 p-mTOR (59.Ser2448)، (Cell Signaling; 9271) β -actin و (SantaCruz Biotechnology; sc-293133)

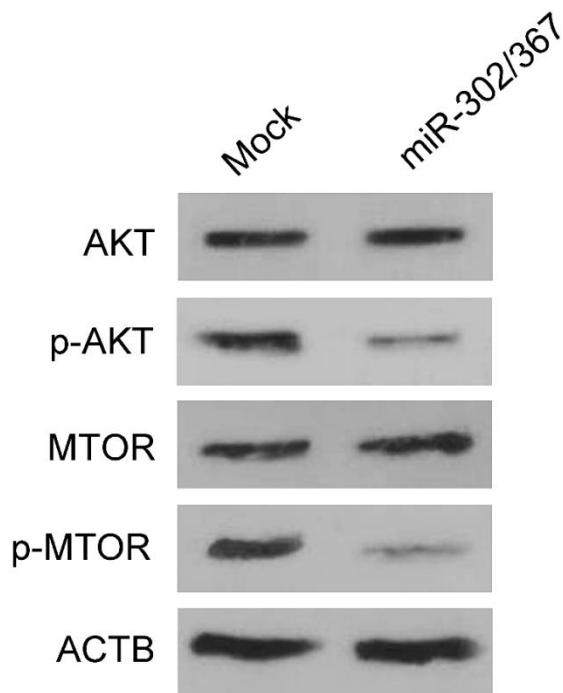


شکل ۱- بیان پروتئین GFP در سلول های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور بیان کننده خوش خواسته (A) و تصویر فاز کنترست آن (B)، یک هفته پس از ترنسفکشن و انتخاب با آنتی بیوتیک پورومایسین.

بررسی شد. طبق یافته های به دست آمده، در سلول های ترنسفکت شده با وکتور بیان کننده کلاستر miR-302/367 نسبت به گروه Mock، بیان ژن *AKT1* به $0/14 \pm 0/06$ ، بیان ژن ژن *MTOR* به $0/13 \pm 0/061$ ، بیان ژن *RPTOR* به $0/12 \pm 0/058$ و بیان ژن *RICTOR* به $0/08 \pm 0/048$ کاهش یافت

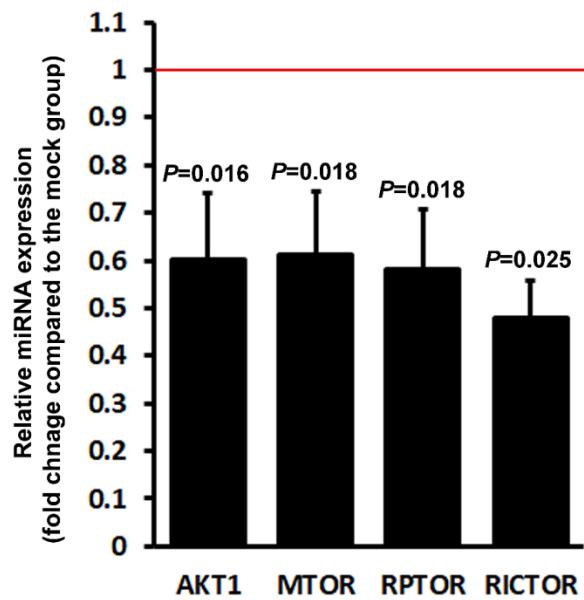
مقایسه بیان ژن های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-302/367 و وکتور Mock

تأثیر بیش بیان کلاستر miR-302/367 بر بیان ژن های مسیر Real-time PCR در سلول های بنیادی بافت چربی با



شکل ۲- بررسی بیان پروتئین های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock با روش وسترن بلات، یک هفته پس از ترنسفکشن.

(P -value<0.05). بیان ژن ها در گروه کنترل ۱ در نظر گرفته شد (نمودار ۱).



نمودار ۱- مقایسه کمی بیان ژن های درگیر در مسیر پیام رسان mTOR در سلول های ترنسفکت شده با وکتور حاوی کلاستر miR-302/367 و وکتور Mock با روش qPCR یک هفته پس از ترنسفکشن. بیان ژن ها در گروه کنترل ۱ در نظر گرفته شده و با خط قرمز نشان داده شده است. بیان ژن ها در گروه miR-302/367 با Mean + SD و سطوح معناداری با P -value داده شده است. مقادیر P -value کمتر از <0.05 معنادار است.

بحث

در مطالعه حاضر، بیش بیان کلاستر miR-302/367 باعث کاهش بیان برخی از ژن های مسیر پیام رسانی mTOR، شامل AKT1, mTOR, RPTOR, RICTOR و MTOR می شوند. این تغییرها نشان دهنده نقش قابل توجه کلاستر miR-302/367 در تنظیم مسیر پیام رسانی mTOR است و اهمیت مسیر mTOR را به عنوان یکی از مکانیسم های عمل کلاستر miR-302/367 در بازبرنامه ریزی سلول های سوماتیک به سلول های بنیادی پرتوان مطرح می کند. مطالعه های پیشین AKT1 را به عنوان یک هدف مستقیم miR-302 شناسایی کرده است. بیان بالای 3'UTR سلول های بنیادی پرتوان با هدف قرار دادن مستقیم

بررسی بیان پروتئین های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های ترنسفکت شده با وکتور حاوی miR-302/367 و وکتور Mock

بررسی بیان پروتئین های مسیر پیام رسان mTOR با وسترن بلات نشان داد که بیان MTOR در سلول های بنیادی بافت چربی ترنسفکت شده با miR-302/367 نسبت به گروه Mock تغییر مشخصی ندارد، در حالی که بیان AKT فسفو ریله MTOR نسبت به گروه کنترل کاهش نشان داد (شکل ۲).

mLST8 و mSIN1 را تشکیل می دهد. mTORC1 به راپامایسین حساس است و سنتز و ترجمه پروتئین را حداقل تا حدی از طریق تأثیر بر دو جزء مهم ماشین سنتز پروتئین، شامل 4E-BP1 و p70S6 کیناز، افزایش می دهد (۱۵). این فرایند در نهایت mTORC1 را قادر می سازد تا بر تکثیر، رشد سلولی و اتوفرازی تأثیر بگذارد (۲۷). در مطالعه حاضر، یکی از ژن هایی که بیان آن در نتیجه بیش بیان کلاستر RAPTOR با miR-302/367 کاهش یافت RAPTOR بود. با عمل کردن به عنوان داربستی برای فراخواندن سوبستراهای TORC1 عملکرد mTORC1 را تنظیم می کند (۲۸).

mTORC2 مانند mTORC1 حاوی پروتئین mLST8 است، اما به جای RAPTOR از پروتئین های RICTOR (همراه غیر حساس به راپامایسین mTOR) و SIN1 (پروتئین تعاملی پروتئین کیناز فعل شده با استرس) تشکیل شده است. به نظر می رسد که RICTOR و SIN1 از طریق اتصال یکدیگر را تثبیت می کنند و شالوده ساختاری mTORC2 را می سازند. mTORC2 کیناز انکوژنی AKT را در S473 فسفریله می کند، چیزی که همراه با فسفوریله شدن با واسطه PDK1 پروتئین AKT در T308 سبب فعل شدن کامل AKT می شود (۲۹). تا به حال بیش از ۱۰۰ سوبسترا احتمالی برای AKT گزارش شده است، با این حال بسیاری از آنها با جزئیات بیشتر مشخص نشده اند (۳۰). یکی از سوبستراهای مهم AKT یعنی مجموعه پروتئینی TSC1/TSC2 در بالادست mTORC1 عمل می کند. همچنین نشان داده شده است که RHEB بیان mTOR را از طریق FKBP38، عضوی از خانواده پروتئین اتصال دهنده FK506 (FKBP)، تنظیم می کند. در واقع، FKBP38 به mTOR متصل می شود و فعالیت آن را مهار می کند، درحالی که تعامل مستقیم FKBP38 با RHEB از ارتباط FKBP38 با mTOR جلوگیری می کند (۲۹، ۳۱-۳۳). این یافته ها می توانند مبین یکی دیگر از دلایل کاهش MTOR در اثر بیش بیان کلاستر miR-302/367 در مطالعه حاضر باشد. به عبارتی، کاهش RHEB در اثر بیش بیان کلاستر miR-302/367 سبب

رونوشت AKT1 این ژن را سرکوب می کند و متعاقباً فاکتور پرتوانی OCT4 را در سطح بالایی حفظ می کند (۲۱). یک سرین ترئونین کیناز مهم در پایین دست PIP3 است. AKT از طریق اتصال قلمرو PH خود به غشاء جذب می شود و به دنبال فسفریله شدن توسط PDK1 (کیناز وابسته به ۳-phosphoinositide)، کمپلکس راپامایسین حساس به mTORC2 (mTOR) یا کیناز های دیگر فعال می شود. در این مطالعه ژن AKT1 در نتیجه بیش بیان کلاستر miR-302/367 کاهش یافت که منطبق بر مطالعه های پیشین است (۲۱). به علاوه، اگرچه به نظر می رسد که بیش بیان کلاستر miR-302/367 تأثیری بر بیان پروتئین AKT غیر فسفریله نداشت، پروتئین AKT فسفریله را به میزان مشخصی کاهش داد. بنابراین، به نظر می رسد که کلاستر miR-302/367 از فسفریله و فعل شدن پروتئین AKT جلوگیری می کند (۲۲).

TSC2 و FOXO (کمپلکس توبروس اسکلروزیس ۲) دو هدف اصلی AKT هستند. TSC1 (هامارتین) و TSC2 (توبرین) مجموعه ای را تشکیل می دهند که فعالیت پروتئین G کوچک RHEB را مهار می کند (۲۲). در سال ۲۰۰۵، Long و همکارانش نشان دادند که ۱ TOR complex هدف مستقیم RHEB-GTP است که اتصال آن سبب فعل شدن TOR کیناز می شود. در واقع، RHEB از طریق میانکنش با هر دوی قلمرو کاتالیتیک mTOR و mLST8 به مجموعه TOR متصل می شود. اتصال mTOR به سبب فعل شدن فعالیت کینازی PRAS40 mTOR می شود (۲۶). علاوه بر این، AKT پروتئین 40 را فسفریله می کند و در نتیجه اثر بازدارندگی PRAS40 را روی mTORC1 کاهش می دهد (۲۶). با توجه به کاهش AKT در سلول های بنیادی بافت چربی ترانسفکت شده با وکتور بیان کننده کلاستر miR-302/367، به نظر می رسد که کاهش رونوشت های MTOR و نیز کاهش فرم فسفریله پروتئین MTOR در مطالعه ما قابل توجیه است.

mTOR بخشی از دو مجموعه مجزا به نام mTORC1 (شامل mTORC2 و PRAS40) و mTORC2 (Raptor، mLST8، Raptor، mTOR)

می شود که ارتباط FKBP38 با MTOR با افزایش یابد و در نتیجه کاهش MTOR اتفاق بیفت.

نتیجه گیری

در مطالعه حاضر، بیش بیان کلاستر miR-302/367 سبب کاهش بیان یا کاهش فسفریله شدن برخی از مولکول های مسیر پیام رسان mTOR در سلول های بنیادی بافت چربی شد که نقش کلاستر miR-302/367 را در تنظیم این مسیر پیام رسانی نشان می دهد. از آنجاکه مسیر mTOR از یک طرف در فرایند باز برنامه ریزی سلول های سوماتیک به سلول های بنیادی پرتوان القایی نقش دارد و از طرف دیگر، اختلال در تنظیم این مسیر با بیماری های مختلف، از جمله سرطان، مرتبط است، انجام مطالعه های تکمیلی برای بررسی دقیق تر نقش کلاستر miR-302/367 در تنظیم محور AKT/mTOR و تأثیر آن بر ویژگی های بنیادینگی، مهاجرت، تکثیر، تمایز و توانایی ترمیمی سلول های بنیادی بافت چربی ضروری به نظر می رسد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه، در کمیته اخلاق پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری بررسی و با کد اخلاق IR.NIGEB.EC.1400.2.26.B ثبت شده است.

تشکر و قدردانی

از مشارکت کنندگان محترم و تمامی بزرگوارانی که در اجرای پژوهش حاضر ما را یاری کردند، سپاسگزاریم.

تعارض منافع

نویسندها، تعارض منافعی را گزارش نکرده اند.

References

1. Ambros V. The functions of animal microRNAs. *Nature*. 2004;431(7006):350-5.
2. Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(23):9667-72.
3. Lee MR, Prasain N, Chae HD, Kim YJ, Mantel C, Yoder MC, et al. Epigenetic regulation of NANOG by miR-302 cluster-MBD2 completes induced pluripotent stem cell reprogramming. *Stem Cells*. 2013;31(4):666-81.
4. Moradi S, Asgari S, Baharvand H. Concise review: harmonies played by microRNAs in cell fate reprogramming. *Stem Cells*. 2014;32(1):3-15.
5. Simerman AA, Dumesic DA, Chazenbalk GD. Pluripotent muse cells derived from human adipose tissue: a new perspective on regenerative medicine and cell therapy. *Clinical and Translational Medicine*. 2014;3(1):1-8.
6. Marson A, Levine SS, Cole MF, Frampton GM, Brambrink T, Johnstone S, et al. Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells .cell. 2008;134(3):521-33.
7. Liao B, Bao X, Liu L, Feng S, Zovoilis A, Liu W, et al. MicroRNA cluster 302–367 enhances somatic cell reprogramming by accelerating a mesenchymal-to-epithelial transition. *Journal of Biological Chemistry*. 2011;286(19):17359-64.
8. Miyoshi N, Ishii H, Nagano H, Haraguchi N, Dewi DL, Kano Y, et al. Reprogramming of mouse and human cells to pluripotency using mature microRNAs. *Cell stem cell*. 2011;8(6):633-8.
9. Sugawara T, Kawamoto Y, Kawasaki T, Umezawa A, Akutsu H. A single allele of the hsa-miR-302/367 cluster maintains human pluripotent stem cells. *Regen Ther*. 2022;21:37-45.
10. Zhao Y, Cui Y, Luan J, Wang J, Shi L, Han Z, et al. Development and identification of a induced pluripotent stem cells line (SMBCi013-A) derived from urine cells of a patient with Wilson's disease. *Stem Cell Res*. 2022;59:102650.
11. Lipchina I, Elkabetz Y, Hafner M, Sheridan R, Mihailovic A, Tuschl T, et al. Genome-wide identification of microRNA targets in human ES cells reveals a role for miR-302 in modulating BMP response. *Genes & development*. 2011;25(20):2173-86.
12. Subramanyam D, Lamouille S, Judson RL, Liu JY, Bucay N, Deryck R, et al. Multiple targets of miR-302 and miR-372 promote reprogramming of human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 2011;29(5):443-8.
13. Magenta A, Cencioni C, Fasanaro P, Zaccagnini G, Greco S, Sarra-Ferraris G, et al. miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death & Differentiation*. 2011;18(10):1628-39.
14. Guo M, Gan L, Si J, Zhang J, Liu Z, Zhao J, et al. Role of miR-302/367 cluster in human physiology and pathophysiology. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*. 2020;52(8):791-800.
15. Brotelle T, Bay J-O. PI3K-AKT-mTOR pathway: Description, therapeutic development, resistance, predictive/prognostic biomarkers and therapeutic applications for cancer. *Bulletin du cancer*. 2015;103(1):18-29.
16. Menendez JA, Vellon L, Oliveras-Ferraro C, Cufi S, Vazquez-Martin A. mTOR-regulated senescence and autophagy during reprogramming of somatic cells to pluripotency: a roadmap from energy metabolism to stem cell renewal and aging. *Cell Cycle*. 2011;10(21):3658-77.
17. He J, Kang L, Wu T, Zhang J, Wang H, Gao H, et al. An elaborate regulation of Mammalian target of rapamycin activity is required for somatic cell reprogramming induced by defined transcription factors. *Stem Cells Dev*. 2012;21(14):2630-41.
18. Lee SJ, Kang KW, Kim JH, Lee BH, Jung JH, Park Y, et al. CXCR2 Ligands and mTOR Activation Enhance Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotent Stem Cells. *Stem Cells Dev*. 2020;29(3):119-32.
19. Aarts M, Georgilis A, Beniazza M, Beolchi P, Banito A, Carroll T, et al. Coupling shRNA screens with single-cell RNA-seq identifies a dual role for

- mTOR in reprogramming-induced senescence. *Genes Dev.* 2017;31(20):2085-98.
20. Karimi Roshan M, Soltani A, Soleimani A, Rezaie Kakhiae K, Afshari AR, Soukhtanloo M. Role of AKT and mTOR signaling pathways in the induction of epithelial-mesenchymal transition (EMT) process. *Biochimie.* 2019;165:229-34.
21. Li H, Wei J, Fan L, Wang S, Zhu L, Li T, et al. miR-302 regulates pluripotency, teratoma formation and differentiation in stem cells via an AKT1/OCT4-dependent manner .*Cell death & disease.* 2016;7(1):e2078-e.
22. Chalhoub N, Baker SJ. PTEN and the PI3-kinase pathway in cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease.* 2009;4:127-50.
23. Faghih H, Javeri A, Amini H, Taha MF. Directed differentiation of human adipose tissue-derived stem cells to dopaminergic neurons in low-serum and serum-free conditions. *Neuroscience letters.* 2019;708:134353.
24. Soheilifar MH, Javeri A, Amini H, Taha MF. Generation of dopamine-secreting cells from human adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Rejuvenation research.* 2018;21(4):360-8.
25. Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res.* 2002;30(9):e36.
26. Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J. Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Current biology.* 2005;15(8):702-13.
27. Fantus D, Rogers NM, Grahammer F, Huber TB, Thomson AW. Roles of mTOR complexes in the kidney: implications for renal disease and transplantation. *Nature Reviews Nephrology.* 2016;12(10):587-609.
28. Rosner M, Hanneder M, Siegel N, Valli A, Fuchs C, Hengstschläger M. The mTOR pathway and its role in human genetic diseases. *Mutation Research/reviews in Mutation Research.* 2008;659(3):284-92.
29. Yang Q, Guan K-L. Expanding mTOR signaling. *Cell research.* 2007;17(8):666-81.
30. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74.
31. Bai X, Ma D, Liu A, Shen X, Wang QJ, Liu Y, et al. Rheb activates mTOR by antagonizing its endogenous inhibitor, FKBP38. *Science.* 2007;318(5852):977-80.
32. Dann SG, Selvaraj A, Thomas G. mTOR Complex1-S6K1 signaling: at the crossroads of obesity, diabetes and cancer. *Trends in molecular medicine.* 2007;13(6):252-9.
33. Guertin DA, Sabatini DM. Defining the role of mTOR in cancer. *Cancer cell.* 2007;12(1):9-22.