

بررسی تاثیر مهار mir-150 بر بیان زنجیره آلفای هموگلوبین در رده سلولی K562

دکتر شعبان علیزاده^۱، دکتر سعید کاویانی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳، دکتر علی اکبر پورفتح اله^۴،
دکتر ناصر امیری زاده^۵، فاطمه کوهکن^۵، دکتر سعید آبرون^۲، دکتر مهرداد نوروزی نیا^۲

چکیده

زمینه و هدف: ریز RNA ها، مولکولهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که در پروسه‌های متعدد سلولی از قبیل پرولیفراسیون، تمایز، آپوپتوزیس و سرطان شرکت دارند. مطالعات اخیر کاهش سطح mir-150 را در تمایز پیش سازهای خونی به رده اریتروئیدی نشان داده‌اند. از آنجایی که بیان هموگلوبین شاخص مهمی در تمایز اریتروئیدی می‌باشد، در این مطالعه تاثیر سرکوب mir-150 بر بیان زنجیره هموگلوبین آلفا در رده سلولی اریترولوکمیک K562 بررسی شده است.

روش بررسی: رده سلولی K562 در شرایط استاندارد کشت داده شده و پس از بهینه نمودن شرایط انتقال داده شد. سرکوب mir-150 توسط روش miRNA real time-PCR تایید شد و سپس بیان زنجیره آلفا با روش RT-PCR نشان داده شد. در نهایت، با استفاده از RT-PCR کمی، تغییرات بیان زنجیره مزبور نسبت به سلول کنترل مورد سنجش قرار گرفت. **یافته‌ها:** مطابق انتظار، کاهش دادن سطح mir-150 باعث افزایش بیان زنجیره آلفا گردید، به طوری که سطح این زنجیره هموگلوبینی در مقایسه با سلول کنترل و scramble بیش از 10 برابر افزایش نشان می‌داد. آنالیز داده‌ها نشان از معنی دار بودن تغییرات بیان زنجیره آلفا نسبت به سلول کنترل بود ($P < 0.05$).

نتیجه گیری: سرکوب mir-150 به طور چشم گیری سبب افزایش زنجیره آلفا گردید که در نتیجه پس از مطالعات تکمیلی هدف مناسبی در زمینه تالاسمی آلفا می‌باشد. همچنین با مطالعات بیشتر و شناسایی ژنهای هدف miRNA های دخیل در روندهای تمایز اریتروئیدی، می‌توان در آینده از پتانسیل‌های تشخیصی و درمانی آنها بخصوص در ژن درمانی و پزشکی ترمیمی بهره برد.

واژه های کلیدی: ریز RNAها، mir-150، زنجیره آلفا هموگلوبین

* نویسنده مسئول :

دکتر سعید کاویانی؛
دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت
مدرس

Email :
kavianis@modares.ac.ir

- دریافت مقاله : شهریور ۸۹ - پذیرش مقاله : آبان ۸۹

مقدمه

این واقعه در سال ۱۹۹۳ روی داد با این وجود واژه miRNA اولین بار در سال ۲۰۰۱ به کار گرفته شد. miRNA ها دسته‌ای از مکانیسم‌های اپی ژنتیکی را پیش می‌برند. تعداد این مولکولها در موجودات مختلف بین ۲۰۰-۱۰۰۰ در موجودات پست تا ۱۰۰۰ عدد در موجودات تکامل یافته تر متغیر می‌باشند. این مولکولهای حفاظت شده ۲۳-۱۹ نوکلئوتیدی بوده و با اتصال به قسمت 3' UTR(untranslated region)

ریز RNAها (microRNA) اولین بار توسط Lee و همکارانش در آزمایشگاه Victor ambros در C.Elegans شناسایی شدند.

^۱ دکترای هماتولوژی و بانک خون گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
^۲ استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
^۳ استاد گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
^۴ استادیار هماتولوژی و بانک خون مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
^۵ کارشناس ارشد ژنتیک گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

لنفوپوئز می‌باشد. در واقع این miRNA با کنترل بیان c-myc در یک روند وابسته به دوز در تمایز لنفوسیت B,T نقش دارد(۱۱).

در روند تمایز اریتروئیدی الگوی بیان بسیاری از miRNA ها تغییر می‌یابد که برخی از آنها محدود به تمایز مرحله خاصی می‌باشند. به عنوان مثال در طی تمایز اریتروسیتی بیان mir-155,221,222 به ترتیب ۲۰۰ و ۱۰ برابر کاهش می‌یابد در حالی که بیان mir-451 بیش از ۲۷۰ برابر افزایش می‌یابد(۹ و ۷). بنظر می‌رسد که کاهش mir-221,222 با برداشتن اثر مهاری از روی KIT باعث القای تمایز اریتروسیتی می‌شود(۲). در آزمایش دیگری نشان داده شده است که الگوی بیانی بیش از ۱۰۰ مورد miRNA در طی تمایز اریتروسیتی تغییر یافته و بطوریکه بیان mir-451, 24 افزایش و بیان mir-16,221,222,155,150 کاهش می‌یابد(۱۵-۱۳).

یانگ و همکارانش پس از القاء اریتروپوئیز در رده سلولی K562 با ترکیب همین (Hemin) و بررسی آرایه miRNA دریافتند که بیان mir-126 افزایش و بیان miRNA های mir-103,130a,210,18b کاهش دارند(۱۶).

کنترل بیان c-myc می‌تواند نقش mir-150 را در پیش ساز مگاکاریوسیتی - اریتروسیتی (megakaryocyte-erythroid progenitors (MEP)) مشخص کند هرچند که گزارشهای متناقضی در مطالعات مختلف نشان می‌دهد که miR-150/MYB مستقیماً myb را به عنوان فعال کننده مستقیم پروموتور اریتروسیتی و مهارگر مگاکاریوسیتی قرار می‌دهد(۱۷).

Mir-150 (MIMAT0004610) برای اولین بار در سال ۲۰۰۲ طی بررسی الگوی بیان miRNA های بافتی مختلف موش معرفی گردید و متعاقب آن در سال ۲۰۰۷ در انسان نیز شناسایی و تایید شد این miRNA در کروموزوم ۱۹ قرار گرفته و توالی آن به صورت

سبب تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی می‌شوند(۵-۱).

این مولکولها در فرایندهای متعددی مانند تکامل، پرولیفراسیون سلولی، مرگ سلولی، آپوپتوز، متابولیسم چربیها و تمایز سلولی نقش دارند و به همین دلیل در موجودات تکامل یافته، در سطح مولکولی شبکه miRNA با فاکتورهای رونویسی (Transcription Factors) تاثیر اساسی در تنظیم بیان ژنها داشته و بنظر می‌رسد مسئول تنظیم ۱۰ تا ۳۰٪ از ژنها باشند(۷-۶).

الگوی بیان miRNA ها در بافتهای مختلف متفاوت است بطوریکه 181, 223, 141-mir به صورت عمده در بافت خونساز بیان داشته که از این میان برخی miRNA ها مانند 128, 155, 146, 24, 17-mir در خونسازی اولیه نقش دارند.

Mir-223 اصلی ترین miRNA در طی تمایز گرانولوسیتی است که این کار را از طریق مهار NFIA و افزایش C/EBP- α انجام می‌دهد(۹-۸ و ۱). بیش از ۱۹ مورد miRNA در روند مگاکاریوپوئز تنظیم کاهشی (downregulation) دارند از آن جمله می‌توان به 10a, 10b, 30c, 106, 126, 130a, 32, 143-mir اشاره کرد(۲).

لازم به ذکر است که در طی تمایز رده منوسیتی فاکتور رونویسی PU.1 باعث فعال شدن mir-424 می‌شود که این miRNA نقش اساسی در تمایز رده سلولی AML و همچنین سلولهای CD34⁺ به سمت رده منوسیتی/ماکروفاژی بازی می‌کند. تصور می‌شود مکانیسم اصلی این روند فعال کردن ژنهای اختصاصی رده منوسیتی و از جمله M-CSF-R باشد. همچنین در مطالعات دیگر نقش miRNA های 222, 155-mir و 503, 424 نیز در تمایز رده منوسیتی مشخص شده است(۱۰ و ۲).

در حالیکه mir-150 بیان بالایی در بافتهای لنفوئیدی دارد که این امر نشان دهنده نقش اساسی آن در

شمارش 4×10^5 در پلیت ۶ خانه و حاوی ۳ میلی لیتر محیط فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شدند. به منظور مهار mir-150 از miRCURY LNA™ و microRNA Inhibitor (Scramble) و اسکرامل (Scramble) مربوطه استفاده شد (شرکت اگزیکون Exiqon). این محصول از تکنولوژی LNA بهره می برد که ویژگی و پایداری آن را بالاتر برده است. اسیدهای نوکلئیک قفل شده (Locked nucleic acid (LNA™)) دسته ای از آنالوگهای اسیدهای نوکلئیک هستند که در آنها اتم 2'-O و اتم 4'-C حلقه ریبوز با پل متیلنی قفل شده است.

اسیدهای نوکلئیک LNA قادرند همانند سایر بازهای اسید نوکلئیکی به سادگی بر اساس قانون واتسون کریک جفت باز تشکیل دهند. در این مطالعه از scramble به منظور جلوگیری از گزارش تاثیر غیراختصاصی احتمالی استفاده گردید.

انتقال (Transfection) آنتی سنس در سلولهای K562 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) براساس دستورالعمل کیت صورت گرفت. بدین منظور روز قبل از انتقال، 4×10^5 سلول در پلیت ۶ خانه و حاوی ۳ میلی لیتر محیط فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شدند. بطوریکه در یک لوله 100 pmol از مهارکننده mir-150 در ۲۵۰ میکرولیتر OPTIMEM (Gibco, USA) رقیق شدند و در لوله دیگر همزمان ۵ میکرولیتر لیپوفکتامین در ۲۵۰ میکرولیتر اپتی مم رقیق شد. پس از ۵ دقیقه انکوباسیون دو لوله مخلوط و به مدت ۲۰ دقیقه دیگر انکوبه شده و به پلیت اضافه گردید. انتقال scramble نیز به طریق مشابهی صورت گرفت. به منظور نگهداشتن قدرت مهارتی انتقال آنتی سنس هر ۴ روز یکبار تکرار شد (جدول ۱).

روز هفتم پس از انتقال نمونه های تست، کنترل و scramble تمامی سلولها جمع آوری گردیده و با

CUGGUACAGGCCUGGGGACAG

می باشد (۳ و ۸).

رده سلولی K562 یک رده برگرفته از لوسمی میلوئیدی مزمن بوده و دارای خصوصیات اولیه اریتروسیستی نیز می باشد. کلونهای مختلف این سلولها قابلیت بیان Gower1 ($\zeta 2\epsilon 2$)، Hb Portland ($\zeta 2\gamma 2$) و Gower2 ($\alpha 2\epsilon 2$) و میزان اندکی Hb F ($\alpha 2\gamma 2$) را دارا هستند به هرحال با اطلاعات ما تحت هیچ شرایطی بیان زنجیره بتا در این سلولها گزارش نشده است (۱۹).

از آنجایی که تغییرات میزان بیان زنجیره آلفا به عنوان شایع ترین اختلال تک ژنی انسان بوده و بیماری گسترده ای با عنوان آلفا تالاسمی ها را شامل می شود بنابراین شناسایی عواملی که قادر به افزایش بیان زنجیره آلفا و اصلاح این اختلالات شوند بسیار ارزشمند خواهد بود. بنابراین در این تحقیق رده سلولی K562 به عنوان مدلی برای بررسی تاثیر کاهش mir-150 در میزان بیان زنجیره α انتخاب گردید تا در صورت کسب نتایج رضایت بخش مطالعات تکمیلی بعدی طراحی و اجرا شود.

روش بررسی

جامعه مورد مطالعه در این تحقیق رده سلولی اریترولوکمیک K562 بود که از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه گردید. این سلولها در محیط RPMI 1640 (Gibco, USA) حاوی ۱۰٪ FBS (fetal bovine serum) (Gibco-USA)، آنتی بیوتیک پنی سیلین-اسرپتومایسین (1x) و 2mM گلوتامین در شرایط استاندارد (37 C, 95% O2, 5% CO2) کشت داده شد. روز قبل از انتقال آنتی سنس سلولها شمارش شده و زنده مانی (Viability) آنها با تریپان بلو مشخص گردید. سپس سلولها در فاز لگاریتمی با

ردیابی آنها با استفاده از real time PCR معمولی امکان پذیر نمی باشد.

مدول ۱. شرایط انکوباسیون در انتقال آنتی سنس

در سلول های K562

زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)
۱۰ دقیقه	دمای اتاق (۲۵)
۴۵ دقیقه	۶۰-۴۲ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	حمام یخ (۴ درجه)

در کیت حاضر ابتدا معرف سنتز cDNA تک رشته ای باعث طولانی کردن رشته در واکنش پلی آدنیلایسیون می شود و سپس از رشته حاضر cDNA ساخته می شود و در واکنش (Q-PCR=Quantitive polymerase chain reaction) مورد بهره برداری قرار می گیرد این کیت حاوی پرایمر reverse عمومی (universal) می باشد و اختصاصی بودن واکنش از طریق پرایمر forward تعیین می شود. پرایمر اخیر مورد استفاده برای ردیابی mir-150 عبارت بود از:

TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT

واکنش PCR کمی با استفاده از معرف سایبرگرین (Bioer) با پرایمرهای زیر انجام شد (جدول ۲).

استفاده از معرف BIOZOL از آنها RNA استخراج گردید. جهت استخراج RNA، پس از شستشوی سلولها با PBS، ۵۰۰ میکرولیتر معرف Biozol اضافه شده و با رسوب دادن بواسطه فنل/کلروفرم مطابق دستورالعمل مربوطه پیگیری گردید.

سپس جهت اطمینان از کمیت و کیفیت RNA استخراج شده در OD 260/280 قرائت و ژل الکتروفورز انجام شد.

جهت اطمینان از حذف DNA و عدم تداخل، RNA استخراج شده با (Fementas) DNaseI مطابق دستورالعمل سازنده تیمار شدند.

جهت سنتز cDNA از کیت سنتز (Bioer) cDNA، 20ng از RNA در مخلوطی از ۱ میکرولیتر پرایمر 18 oligodt، 0.5 میکرولیتر آنزیم AMV، ۴ میکرولیتر بافر 4x، 0.5 میکرولیتر مهارکننده RNase، ۱ میکرولیتر dNTP mix اضافه شده و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس با برنامه زیر در دستگاه ترموسیکلر قرار گرفت.

از نمونه روز سوم جهت بررسی میزان mir-150 متعاقب انتقال آنتی سنس استفاده گردید.

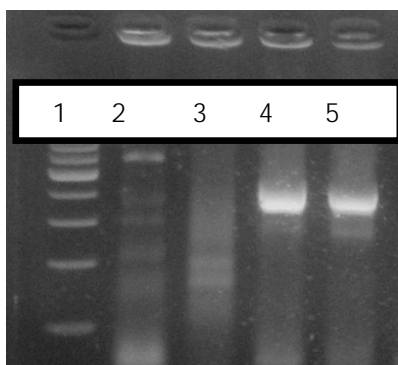
بدین منظور از کیت (miRNA QPCR(stratgene)) استفاده شد، زیرا به دلیل طول کوتاه miRNA ها

مدول ۲. پرایمر واکنش Q-PCR

Gene	Primers	Annealing temperature	Product size
hemoglobina	F: CCGACAAGACCAACGTCAAGG R: GGTATTTGGAGGTCAGCACG	58	407
GAPDH	F: GACAAGCTTCCC GTTCTCAG R: GAGTCAACGGATTTGGTCGT	58	160

برنامه ترموسیکلر بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به صورت زیر تنظیم گردید (جدول ۳):

جهت بررسی بیان زنجیره آلفا و اطمینان از قطعیت واکنش کمی ابتدا با استفاده از پرایمرهای فوق واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه برداری معکوس (RT-PCR) بر روی نمونه‌های cDNA کنترل و تست انجام شد که در هر دو نمونه بیان زنجیره آلفا مشهود بود. شکل ۱ محصول واکنش را پس از الکتروفورز در ژل آگاروز ۲٪ و رنگ آمیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. طول محصول تولید شده برای زنجیره آلفا ۴۰۷ جفت باز است.



شکل ۱: نتایج الکتروفورز (محصول RT-PCR ژن آلفا)

از چپ به راست باندها مربوط هستند به:
 ۱- ladder 100bp -۲- نمونه کنترل منفی بدون رشته الگو (NPC) -۳- نمونه کنترل منفی بدون پرایمر (NTC) -۴- نمونه کنترل ۵- نمونه انتقال یافته با mir-150 antisense از آنجایی که بیان زنجیره آلفا در هر سه نمونه کنترل، scramble و تست مثبت بود بنابراین بررسی کمی بیان زنجیره آلفا ضروری به نظر می‌رسید. بررسی با واکنش real Time PCR نشان داد که بیان زنجیره آلفا در نمونه انتقال یافته با آنتی سنس ۱۵۰ در مقایسه با نمونه کنترل بیش از ۱۰ مرتبه افزایش قابل توجهی را نشان می‌دهد که این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار می‌باشد ($P < 0.05$) (نمودار ۱).

جدول ۳. برنامه ترموسیکلر

تکرار	زمان	دما [C]
۱ سیکل	۲ دقیقه	۹۴
۴۰ سیکل	۱۰ ثانیه	۹۴
	۱۵ ثانیه	۵۸ (مرحله قرائت)
	۲۵ ثانیه	۷۲

بیان ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی بررسی شد و بیان نسبی ژن آلفا در نمونه های کنترل و تست با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ محاسبه گردید.

یافته ها

رده سلولی k562 در محیط RPMI 1640 + 10% FBS در شرایط استاندارد کشت داده شدند. سلولها در روز انتقال آنتی سنس شمارش شده و viability آنها اندازه گیری شد که حدود ۹۹٪ بود.

جهت انتقال بهینه از غلظت های مختلف اسکرامبل (scramble) استفاده گردید تا غلظت اپتیمم که بیشترین کارایی و کمترین سمیت را داشته باشد انتخاب شود. پایش با استفاده از فلوسیتومتری و میکروسکوپ معکوس فلورسانس صورت گرفت و درصد موفقیت انتقال آنتی سنس با معرف مورد استفاده حدود ۶۰٪ بود.

جهت بررسی سطح mir-150 پس از انتقال آنتی سنس مربوطه از کیت اندازه گیری miRNA (شرکت استراتاژن fh) استفاده از پرایمر U6 RNA به عنوان کنترل داخلی (normalize) استفاده شد.

پس از گذشت ۳ روز از انتقال آنتی سنس، سطح mir-150 در مقایسه با سلولهای کنترل و scramble بیش از ۲۳ مرتبه کاهش یافته بود.

همانطور که ذکر شد جهت نگهداشتن حالت سرکوبی mir-150 انتقال آنتی سنس، در روز ۴ تکرار شد.

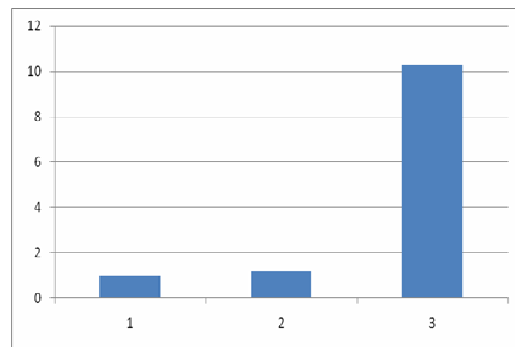
miRNA ها مولکولهای کوچکی هستند که توسط RNA POI II رونویسی شده و باعث تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی می‌شوند. نقش این مولکولها در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی از قبیل پرولیفراسیون، تمایز، آپوپتوزیس و بدخیمی ها به اثبات رسیده است.

تمایز اریتروئیدی روند پیچیده‌ای است که نقش miRNA های متعدد در آن به اثبات رسیده است این مولکولها معمولا از طریق برداشتن اثر مهارى بر ژنهای اختصاصی اریتروئیدی و یا القای اثر مهارى بر روی ژنهای سایر رده ها عمل می‌کنند.

از جمله miRNA های افزایش یافته در طی تمایز رده اریتروئیدی می‌توان به mir-451, 144, 210, 21 و mir-150, 155, 221, به کاهش یافته به 222, 223, 24 اشاره نمود.

مطالعه اخیر با مطالعه گروه Bruchova که کاهش mir-150 را طی تمایز اریتروئیدی نشان داده بودند همخوانی کامل دارد و نشان می‌دهد کاهش این miRNA علاوه بر تمایز رده اریتروئیدی در بیان زنجیره آلفا نیز تاثیر قابل توجهی دارد. شاید بتوان عنوان کرد که با کاهش سطح mir-150 در طی تمایز رده اریتروئیدی فاکتورهای مهارى از بیان زنجیره آلفا برداشته شده و بیان آن آغاز و تشدید می‌شود (۱۴).

Mir-150 یک miRNA با نقش‌های متعدد است که در تمایز لنفوئیدی نقش آن به اثبات رسیده است و این مولکول در تمایز و بلوغ لنفوسیت های B نیز نقش مهمی دارد. همچنین نقش کاهش این مولکول در تمایز اریتروئیدی طی مطالعات اندکی گزارش شده است که مطالعه حاضر این نقش را تایید کرده و با این دسته از مطالعات تطابق دارد. از طرفی درباره نقش سرکوب این miRNA درباره تعیین سمت تمایزی در پیش سازهای مگاکاریوسیتی اریتروئیدی (MEP) این مطالعه با تمایز به سمت رده



نمودار ۱: تاثیر سرکوب mir-150 بر میزان بیان زنجیره آلفا

نمودار شماره یک: نشانگر تاثیر سرکوب mir-150 بر میزان بیان زنجیره آلفا را نشان می‌دهد. پس از گذشت ۷ روز از انتقال آنتی سنس و scramble به سلولها، بیان زنجیره آلفای هموگلوبین با روش quantitative real time PCR مورد بررسی قرار گرفت میزان تغییرات بیان ژن با استفاده از رابطه $2^{-\Delta\Delta CT}$ محاسبه شد. نتایج نشان داده شده میانگین ۳ بار آزمایش مستقل می‌باشند تفاوت بیان زنجیره آلفا در نمونه کنترل و تست از جهت معنی دار بودن با روش student t-test بررسی شد ($P < 0.05$).

بحث

گلبولهای قرمز فراوان ترین نوع سلولها در بدن انسان هستند محل تولید این سلولها در بزرگسالان، مغز استخوان می‌باشد که طی یک روند تمایزی با گذر از مراحل پرونورموبلاست تا گلبول قرمز بالغ وارد خون می‌شوند. اصلی ترین سیتوکین دخیل در اریتروپوئز فاکتور مترسحه‌ای از کلیه بنام اریتروپویتین می‌باشد و فاکتورهای رونویسی مهم در این روند نیز شامل GATA-1, SCL, EKLf-4 می‌باشد (۲۱-۲۰).

اخیرا miRNA ها در درون گلبولهای قرمز یافته شده اند و این فرضیه که این مولکولها با تنظیم منفی برخی از ژنها در روند تمایز سلولهای خونی دخالت دارند قوت گرفته است.

در این بیماری سطح هموگلوبین A ($\alpha 2\beta 2$) که به بیش از ۱۶۰ گرم در لیتر می‌رسد، یک یافته تشخیصی مهم محسوب می‌شود. کاهش سطح mir-150 در پلی سیتی ورا با مطالعه حاضر ما که کاهش سطح mir-150 سبب افزایش بیان زنجیره هموگلوبین آلفا شده است همخوانی دارد و شاید بتوان در آینده از این miRNA به عنوان یک فاکتور تشخیصی و درمانی در پلی سیتی‌ها و آنمی‌ها استفاده نمود (۲۳).

نتیجه گیری

پی بردن به مکانیسم‌های دقیق ژنتیکی و اپی ژنتیکی که سبب تنظیم بیان ژن در رویان، جنین و بزرگسالان می‌شوند سبب توسعه آگاهی ما در تشخیص، درمان و مدیریت بیماریهای مختلف خونی و از جمله تالاسمی‌ها و هموگلوبینوپاتی‌ها خواهد شد.

توانایی miRNA ها در القاء تمایز به سمت یک رده خاص و یا توانایی آنها در بیان ژنهای خاصی مانند ژنهای هموگلوبین‌ها نقش بالقوه آنها را در ژن درمانی یاد آور می‌سازد شاید در آینده بتوان از نقش این مولکولهای کوچک توانمند در پزشکی ترمیمی و مهندسی بافت استفاده نمود.

مطالعات تکمیلی متعددی لازم است تا نقش این miRNA و سایر miRNA های دخیل در تمایز رده اریترئیدی را به صورت دقیق تر بررسی کرده و ژنهای هدف آنها را شناسایی نماید.

تعمیم این مطالعات بر روی سلولهای پایه‌ای خونساز (Hematopoietic stem cell) می‌تواند اطلاعات دقیق تری در اختیار ما بگذارد.

همچنین از آنجایی که انتقال آنتی سنس‌ها به درون موجود زنده با مشکلات فراوانی همراه است طراحی روشی که بتوان مطالعه را به صورت *in vivo* و در مدل‌های حیوانی انجام داد ارزشمند خواهد بود.

اریترئوئید سازگارتر است و این فرضیه را که mir-150/MYB به عنوان روشن کننده پروموتور اریترئوئیدی در MEP روشن را تایید می‌کند (۱۷).

تعهد پیش سازهای خونی به سمت یک رده خاص با روشن و خاموش شدن بسیاری از ژنها همراه است. از آنجایی که miRNA ها با اتصال به ژنها سبب تنظیم بیان آنها می‌شوند بدیهی است که در تمایز نقش اساسی داشته باشند. در همین راستا Lu و همکارانش با افزایش بیان mir150 (افزایش با استفاده از وکتور لنتی ویروسی) و سرکوب نمودن آن (با آنتی سنس) نشان دادند که افزایش mir-150 سبب تعهد به سمت رده مگاکاریوسیتی شده و رده اریترئوئیدی را بیش از ۶۰٪ کاهش می‌دهد حال آنکه سرکوب mir-150 با آنتی سنس نتیجه عکس داشته و باعث افزایش تمایز اریترئوئیدی می‌شود آنها همچنین فاکتور رونویسی myb را به عنوان هدف اصلی mir-150 در این قضیه معرفی نمودند (۲۲). که این امر با مطالعه اخیر ما که با کاهش سطح mir-150 موفق به افزایش بیان زنجیره آلفا شده ایم مطابقت دارد چرا که مطابق گزارشهای مختلف رده سلولی k562 قابلیت تمایز به هر دو رده اریترئوئیدی و مگاکاریوسیتی را داراست.

طبق مطالعات Testa و همکارانش بیان هموگلوبین‌های مختلف در کلونهای مختلف رده سلولی K562 متفاوت و بسیار هتروژن می‌باشد در هر حال این سلوها هموگلوبین‌های Portland, Gower, سنتز می‌نمایند ولی سنتز زنجیره الفا به میزان بسیار اندک در این سلوها صورت می‌گیرد و حال آنکه مطالعه ما نشان داد که مهار mir-150 با آنتی سنس می‌تواند این قابلیت را بارها افزایش دهد (۱۹).

Prchal و Yoon نشان دادند که سطح mir-150 در پلی سیتی ورا که یک نوع پرخونی بدخیم است کاهش دارد.

منابع

1. Bhagavathi S, Czader M. MicroRNAs in benign and malignant hematopoiesis. Arch Pathol Lab Med 2010 Sep; 134(9): 1276-81.
2. Havelange V, Garzon R. Micronas: Emerging key regulators of hematopoiesis. Am J Hematol 2010 Dec; 85(12): 935-42.
3. Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, et al. A Mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. Cell 2007 Jun; 129(7): 1401-14.
4. Lawrie CH. MicroRNA expression in erythropoiesis and elyroid disorders. Br J Haematol 2010 Jul; 150(2): 144-51.
5. Lawrie CH. MicroRNAs and hematology: small molecules, big function. Br J Haematol 2007 Jun; 137(6): 503-12.
6. Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. BMB Rep 2009 Aug; 42(8): 493-9.
7. Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Muta K, Umemura T. Expression patterns of microRNAs 155 and 451 during normal human erythropoiesis. Biochem Biophys Res Commun 2007 Dec; 364(3): 509-14.
8. Fazi F, Rosa A, Fatica A, Gelmetti V, De Marchis ML, Nervi C, et al. A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBPalpha regulates human granulopoiesis. Cell 2005 Dec; 123(5): 819-31.
9. Georgantas RW, Hildreth R, Morisot S, Alder J, Liu CG, Heimfeld S, et al. CD34+ hematopoietic stem-progenitor cell microRNA expression and function: a circuit diagram of differentiation control. Proc Natl Acad Sci USA 2007 Feb; 104(8): 2750-5.
10. Forrest AR, Kanamori-Katayama M, Tomaru Y, Lassmann T, Ninomiya N, Takahashi Y, et al. Induction of microRNAs, mir-155, mir-222, mir-424 and mir-503, promotes monocytic differentiation through combinatorial regulation. Leukemia 2010 Feb; 24(2): 460-6.
11. Xiao C, Calado DP, Galler G, Thai TH, Patterson HC, Wang J, et al. MiR-150 controls B cell differentiation by targeting the transcription factor c-Myb. Cell 2007 Oct; 131(1): 146-59.
12. Masaki S, Ohtsuka R, Abe Y, Umemura T. Expression analysis of microRNAs in erythropoiesis. Rinsho Byori 2008 Dec; 56(12): 1086-92.
13. Zhan M, Miller CP, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. Exp Hematol 2007 Jul ; 35(7): 1015-25.
14. Bruchova H, Yoon D, Agarwal AM, Mendell J, Prchal JT. Regulated expression of microRNAs in normal and polycythemia vera erythropoiesis. Exp Hematol 2007 Nov; 35(11): 1657-67.
15. Vasilatou D, Papageorgiou S, Pappa V, Papageorgiou E, Dervenoulas J. The role of microRNAs in normal and malignant hematopoiesis. Eur J Haematol 2010 Jan; 84(1): 1-16.
16. Yang GH, Wang F, Yu J, Wang XS, Yuan JY, Zhang JW. MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. J Cell Biochem 2009 Jun; 107(3): 548-56.
17. Garcia P, Frampton J. Hematopoietic lineage commitment: miRNAs add specificity to a widely expressed transcription factor. Dev Cell 2008 Jun; 14(6): 815-6.

18. Weber MJ. New human and mouse microRNA genes found by homology search. *FEBS J* 2005 Jan; 272(1): 59-73.
19. Testa U, Vainchenker W, Beuzard Y, Rouyer-Fessard P, Guerrasio A, Titeux M, et al. Hemoglobin expression in clones of K562 cell line. *Eur J Biochem* 1982 Jan; 121(3): 649-55.
20. Aufricht C, Ties M, Salzer-Muhar U, Wimmer M, Herkner K, Haschke F. Erythropoietin, erythropoiesis and iron status in children after major surgical stress. *Eur J Pediatr* 1995 Jun; 154(6): 458-61.
21. Kes P, Basic-Jukic N. Erythropoiesis-stimulating agents: past, present and future. *Acta Med Croatica* 2009 Sep; 63(1): 3-6.
22. Lu J, Guo S, Ebert BL, Zhang H, Peng X, Bosco J, et al. MicroRNA-mediated control of cell fate in megakaryocyte-erythrocyte progenitors. *Dev Cell* 2008 Jun; 14(6): 843-53.
23. Yoon D, Prchal J. Does MicroRNA-150 Determine Commitment to Blood Cell Lineages. 2009. Available at [http:// www.hematology.org/ Publications/ Hematologist/ 2009/ 2160.aspx](http://www.hematology.org/Publications/Hematologist/2009/2160.aspx). Jul, 2009.

Effect On Alpha Hemoglobin Chain Expression In K562 Cell Line

Alizadeh Sh¹(PHD) - Kaviani S²(PHD) - Soleimani M²(PHD) - Pourfathollah AA³(PHD)
Amirizadeh N⁴(PHD) - Kouhkan F⁵(MSc.) - Abroun S²(PHD) - Noruzinia M²(PHD)

1 PhD in Hematology, Hematology Department, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

2 Assistant Professor, Hematology Department, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

3 Professor of Immunology Department, School of Medicine, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

4 Assistant Professor in Hematology, Research Center of Iranian Blood Transfusion Organization (IBTO), Tehran, Iran

5 Master of Sciences in Genetics, Genetics Department, School of Basic Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Abstract

Received : Sep 2010
Accepted : Oct 2010

Background and Aim: MicroRNAs (miRNA) are small noncoding RNA molecules that transcribed by RNA polymerase II. After biogenesis, these molecules act by incorporation into the RNA-induced silencing complex (RISC). MiRNAs are involved in multiple physiological and pathological processes such as proliferation, differentiation, apoptosis and cancer.

Recently several studies reported down regulation of mir-150 during erythropoiesis. Since hemoglobin expression is valuable indicator of erythroid differentiation we evaluated the mir-150 downregulation effect on alpha chain expression by Quantitative RT-PCR.

Materials and Methods: K562 cells were grown in RPMI1640 in standard condition. K562 cells were transfected by microRNA 150 Inhibitor using transfection kit. Mir-150 downregulation was confirmed by miRNA Real time PCR, followed by Q-RT-PCR to investigate the alpha chain expression changes.

Results: By relative QRT-PCR the alpha chain expression was increased 10 folds in comparison to untransfected and scramble cells. Furthermore, the differences were statistically significant ($P < 0.05$)

Conclusion: Elevation of alpha chain expression in our study showed that mir-150 downregulation has a crucial role in erythroid differentiation and can introduce as a novel marker in alpha thalassemia. Further researches to find out the detail mechanism and miRNAs genes target could improve our knowledge about miRNAs potential in management of diseases and their applications in gene therapy and regenerative medicine.

Key Words: MiRNA, Mir-150, Erythrocid, Alpha Chain

* Corresponding author:
Kaviani S;
E-mail :
Kavianis@modares.ac.ir