مجله دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران (پیاورد سلامت) دوره ٤ شماره ٣ پاییز ١٣٨٩، ١٧- ٩

بررسی تاثیر مهار mir-150 بر بیان زنجیره آلفای هموگلوبین در رده سلولیK562

دکتر شعبان علیزاده[١]، دکتر سعید کاویانی[٢]، دکتر مسعود سلیمانی[٢]، دکتر علی اکبر پورفتح اله[٣]، دکتر ناصر امیری زاده[٤]، فاطمه کوهکن[٥]، دکتر سعید آبرون[٢]، دکتر مهرداد نوروزی نیا[٢]

چکیده

زمینه و هدف: *ریز RNA ها (microRNA)، مولکولهای RNA کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که توسط RNA POL II رونویسی شده و پس از پردازشهای مختلف توسط کمپلکسRISC عمل می‌کنند. نقش این مولکولها در پروسه‌های متعدد سلولی از قبیل پرولیفراسیون، تمایز، آپوپتوزیس و سرطان اثبات شده است. تمایز سلوهای خونی پروسه پیچیده‌ای است که فاکتورهای رونویسی مختلف و همچنین miRNA های متعدد درآن نقش دارند. مطالعات اخیر کاهش سطح mir-150 را در طی تمایز پیش سازهای خونی به رده اریتروئیدی نشان داده‌اند. از آنجایی که بیان هموگلوبین شاخص مهمی در تمایز اریتروئیدی می‌باشد دراین مطالعه تاثیر سرکوب mir-150 بر بیان زنجیر ه هموگلوبین آلفا (α) در رده سلولی اریترولوکمیک K562 بررسی شده است.*

روش بررسی: *رده سلولیK562 در شرایط استاندارد کشت داده شده و پس از بهینه نمودن شرایط miRCURY LNA™ microRNA150 Inhibitor انتقال داده شد. سرکوب mir-150 توسط روش miRNA real time-PCR تایید شده و سپس بیان زنجیره آلفا با روشRT-PCR نشان داده شد. در نهایت با استفاده ازQuantitative RT-PCR تغییرات بیان زنجیره مزبور نسبت به سلول کنترل مورد سنجش قرار گرفت.*

یافته ها: *مطابق انتظار کاهش دادن سطح mir-150 باعث افزایش بیان زنجیره آلفا گردیده بود به طوری که سطح این زنجیره هموگلوبینی در مقایسه با سلول کنترل و scramble بیش از 10 برابر افزایش نشان می داد. آنالیز داده ها نشان از معنی دار بودن تغییرات بیان زنجیره آلفا نسبت به سلول کنترل بود (P value <0.05).*

بحث و نتیجه گیری: *مطابق نتایج سرکوب mir-150 به طور چشم گیری سبب افزایش زنجیره الفا گردیده است بنابراین می‌تواند پس از مطالعات تکمیلی هدف مناسبی در زمینه تالاسمی آلفا باشد، 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، اریتروئید*

* نویسنده مسئول :
دکتر سعید کاویانی؛
دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
Email :
kavianis@modares.ac.ir

- دریافت مقاله : شهریور ٨٩ - پذیرش مقاله : آبان ٨٩

مقدمه

ریز RNAها (microRNA) اولین بار توسط Lee و همکارانش در آزمایشگاه Victror ambros در C.Elegans شناسایی شد. این واقعه در سال ١٩٩٣ روی داد با این وجود واژه miRNA اولین بار در سال ٢٠٠١ به کار گرفته شد .

[١] دکترای هماتولوژی و بانک خون گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[٢] استادیارگروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[٣] استاد ایمونولوژی گروه ایمنی شناسی دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس
[٤] استادیار هماتولوژی و بانک خون مرکز تحقیقات سازمان انتقال خون ایران
[٥] دانشجوی دکترای ژنتیک گروه ژنتیک دانشکده علوم پایه دانشگاه تربیت مدرس

Archive of SID
www.SID.ir

miRNA ها دسته‌ای از مکانیسم‌های اپی ژنتیکی را پیش می‌برند. تعداد این مولکولها در موجودات مختلف بین ۲۰۰-۱۰۰ 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(untranslated region) 3' UTR 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 بیانmiRNA ها در بافتهای مختلف متفاوت است بطوریکه mir-141, 181,223 به صورت عمده در بافت خونساز بیان داشته که از این میان برخیmiRNA ها مانند mir-17, 24, 146, 155, 128, 181 در خونسازی اولیه نقش دارند.

Mir-223 اصلی ترینmiRNA در طی تمایز گرانولوسیتی است که این کار را از طریق مهارNFIA و افزایشC/EBP-α انجام می‌دهد(۹-۸ و۱). بیش از ۱۹ مورد miRNA در روند مگاکاریوپوئز تنظیم کاهشی(downregulation) دارند از آن جمله می‌توان به mir-10a, 10b,30c,106,126,130a,32,143 اشاره کرد(۲).

لازم به ذکر است که در طی تمایز رده منوسیتی فاکتور رونویسیPU.1 باعث فعال شدنmir-424 می‌شود که این miRNA نقش اساسی در تمایز رده سلولیAML 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 جملهM-CSF-R باشد. همچنین در مطالعات دیگر نقش miRNA های mir-155, 222, 424, 503 نیز در تمایز رده منوسیتی مشخص شده است(۱۰و۲).

در حالیکه mir-150 بیان بالایی در بافتهای لنفوئیدی دارد که این امر نشان دهنده نقش اساسی آن در لنفوپوئز می‌باشد. در واقع این miRNA با کنترل بیان c-myb در یک روند وابسته به دوز در تمایز لنفوسیتB,T نقش دارد(۱۱).

در روند تمایز اریتروئیدی الگوی بیان بسیاری ازmiRNA 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 ۲۰۰و۲۰و۱۰ برابر کاهش می‌یابد در حالی که بیانmir-451 بیش از ۲۷۰ برابر افزایش می‌یابد(۱۲و۹و۷). بنظر می‌رسد که کاهش mir-221,222 با برداشن اثر مهاری از رویKIT باعث القای تمایز اریتروسیتی می‌شود(۲). در آزمایش دیگری نشان داده شده است که الگوی بیانی بیش از۱۰۰ مورد miRNA در طی تمایز اریتروسیتی تغییر یافته و بطوریکه بیانmir-451, 24 افزایش و بیان mir-16,221,222,155,150 کاهش می‌یابد(۱۵-۱۳).

یانگ و همکارانش پس از القاء اریتروپویز در رده سلولیK562 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-myb می‌تواند نقشmir-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 مستقیما myb را به عنوان

Archive of SID
www.SID.ir

فعال کنده مستقیم پروموتور اریتروسیتی و مهارگر مگاکاریوستی قرار می‌دهد(۱۷).

Mir-150 (MIMAT0004610) برای اولین بار درسال ۲۰۰۲ طی بررسی الگوی بیان miRNA های بافتهای 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 CUGGUACAGGCCUGGGGGACAG می‌باشد(۱۸و۳).

رده سلولی K562 یک رده برگرفته از لوسمی میلوئیدی مزمن بوده و دارای خصوصیات اولیه اریتروسیتی نیز می‌باشد . کلونهای مختلف این سلولها قابلیت بیان Hb Portland (ζ2γ2) , Gower1 (ζ2ε2) , Gower2 (α2ε2)و میزان اندکی Hb F (α2γ2) 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 گسترده‌ای با عنوان آلفا تالاسمی ها را شامل می‌شود بنابراین شناسایی عواملی که قادر به افزایش بیان زنجیره الفا و اصلاح این اختلالات شوند بسیار ارزشمند خواهد بود. بنابراین در این تحقیق رده سلولیK562 به عنوان مدلی برای بررسی تاثیر کاهشmir-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) حاوی۱۰٪ 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 شمارش4×10^5 در پلیت ٦ خانه و حاوی ۳ میلی لیتر محیط فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شدند.

به منظور مهار mir-150 از miRCURY LNA™ microRNA Inhibitor و اسکرامبل(Scramble) مربوطه استفاده شد(شرکت اگزیکنExiqon). این محصول از تکنولوژیLNA بهره می‌برد که ویژگی و پایداری آن را بالاتر برده است. اسیدهای نوکلئیک قفل شده((Locked nucleic acid(LNA^{TM}) دسته‌ای از آنالوگهای اسیدهای اسید نوکلئیک هستند که در آنها اتم O-'2و اتم C-'4 حلقه ریبوز با پل متیلنی قفل شده است .

اسیدهای نوکئیک 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 لیپوفکتامین۲۰۰۰(Invitrogen,USA) براساس دستورالعمل کیت صورت گرفت. بدین منظور روز قبل از انتقال، 4×10^5 سلول در پلیت ٦ خانه و حاوی ۳میلی لیتر محیط کشت فاقد آنتی بیوتیک کشت داده شدند. بطوریکه در یک لوله 100 pmol از مهارکننده mir-150 در ۲۵۰میکرولیتر 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

Archive of SID

www.SID.ir

انکوبه شده و به پلیت اضافه گردید. انتقال scramble نیز به طریق مشابهی صورت گرفت. به منظور نگهداشتن قدرت مهاری انتقال آنتی سنس هر ٤ روز یکبار تکرار شد(جدول ۱).

روز هفتم پس از انتقال نمونه‌های تست، کنترل و scramble تمامی سلولها جمع آوری گردیده و با استفاده از معرفBIOZOL از آنها RNA استخراج گردید. جهت استخراج RNA، پس از شستشوی سلولها باPBS، ۵۰۰ میکرولیتر معرفBiozol 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 حذفDNA و عدم تداخل، RNA استخراج شده باDNAseI (Fementas) مطابق دستورالعمل سازنده تیمار شدند.

جهت سنتز cDNA از کیت سنتز(cDNA(Bioer، 20ng از RNA در مخلوطی از ۱میکرولیتر پرایمر18 oligodt، 0.5 میکرولیتر آنزیمAMV، ٤ میکرولیتر بافر4x، 0.5 میکرولیتر مهارکننده‌RNAse، ۱ میکرولیترdNTP 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.

جدول ۱. شرایط انکوباسیون در انتقال آنتی سنس در سلول های K562

دما (درجه سانتی گراد)	زمان (دقیقه)
دمای اتاق (۲۵)	۱۰ دقیقه
٦۰-٤۲ درجه سانتی گراد	٤۵ دقیقه
۹۵ درجه سانتی گراد	۵ دقیقه
حمام یخ (٤ درجه)	۵ دقیقه

از نمونه روز سوم جهت بررسی میزانmir-150 متعاقب انتقال آنتی سنس استفاده گردید. بدین منظور از کیت miRNA QPCR(stratgene) استفاده شد، زیرا به دلیل طول کوتاهmiRNA ها ردیابی آنها با استفاده از real time PCR معمولی امکان پذیر نمی‌باشد.

در کیت حاضر ابتدا معرف سنتزcDNA تک رشته‌ای باعث طولانی کردن رشته در واکنش پلی آدنیلاسیون می‌شود و سپس از رشته حاضرcDNA ساخته می‌شود و در واکنش (Q-PCR=Quantitive polymerase chain reaction) مورد بهره برداری قرار می‌گیرد این کیت حاوی پرایمر reverse عمومی(universal) می‌باشد و اختصاصی بودن واکنش از طریق پرایمر forward تعیین می شود . پرایمر اخیر مورد استفاده برای ردیابیmir-150 عبارت بود از:

TTAATGCTAATCGTGATAGGGGT

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

جدول ۲. پرایمر واکنش Q-PCR

Gene	Primers	Annealing temperature	Product size
hemoglobinα	F: CCGACAAGACCAACGTCAAGG R: GGTATTTGGAGGTCAGCACG	58	407
GAPDH	F: GACAAGCTTCCCGTTCTCAG R: GAGTCAACGGATTTGGTCGT	58	160

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

Archive of SID
www.SID.ir

جدول ۳. برنامه ترموسیکلر

تکرار	زمان	دما [C□]
۱ سیکل	۲ دقیقه	۹٤
	۱۰ ثانیه	۹٤
٤۰ سیکل	۱۵ ثانیه	۵۸ (مرحله قرائت)
	۲۵ ثانیه	۷۲

بیان ژنGAPDH 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.

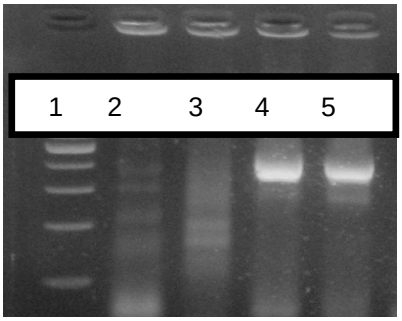
یافته ها

رده سلولیk562 در محیط RPMI 1640 + 10% FBS در شرایط استاندارد کشت داده شدند. سلولها در روز انتقال آنتی سنس شمارش شده وviability آنها اندازه گیری شد که حدود ۹۹٪ بود.

جهت انتقال بهینه از غلظت‌های 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 ٦۰٪ بود .

جهت بررسی سطحmir-150 پس از انتقال آنتی سنس مربوطه از کیت اندازه گیری miRNA (شرکت استراتاژن stratagene) fh استفاده از پرایمر U6 RNA به عنوان کنترل داخلی(normalize) استفاده شد. پس از گذشت ۳ روز از انتقال آنتی سنس، سطحmir-150در مقایسه با سلولهای کنترل و scramble بیش از ۲۳ مرتبه کاهش یافته بود. همانطور که ذکر شد جهت نگهداشتن حالت سرکوبیmir-150 انتقال آنتی سنس، در روز ٤ تکرار شد.

جهت بررسی بیان زنجیره آلفا و اطمینان از قطعیت واکنش کمی ابتدا با استفاده از پرایمرهای فوق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز 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 امیزی با اتیدیوم بروماید نشان می‌دهد. طول محصول تولید شده برای زنجیره آلفا ٤۰۷ جفت باز است.



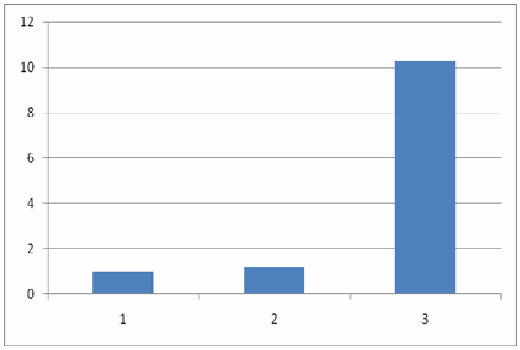
شکل ۱: نتایج الکتروفورزمحصولRT-PCRژن آلفا

از چپ به راست باندها مربوط هستند به :
۱- ladder 100bp ۲- نمونه کنترل منفی بدون رشته الگو(NTC) ۳- نمونه کنترل منفی بدون پرایمر (NPC)
٤-نمونه کنترل ۵- نمونه انتقال یافته باmir-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).

Archive of SID

www.SID.ir



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

نمودار شماره یک : نشانگر تاثیر سرکوبmir-150 بر میزان بیان زنجیره آلفا را نشان می‌دهد. پس از گذشت ۷روز از انتقال آنتی سنس وscamble به سلولها، بیان زنجیره الفای هموگلوبین با روشquantitative 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 الفا در نمونه کنترل و تست از جهت معنی دار بودن با روشstudent 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 .

miRNA ها مولکولهای کوچکی هستند که توسط RNA POl 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 نقشmiRNA های متعدد در آن به اثبات رسیده است این مولکولها معمولا از طریق برداشتن اثر مهاری از ژنهای اختصاصی اریتروئیدی و یا القائ اثر مهاری 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 از miRNA های کاهش یافته به mir-150, 155, 221, 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 مهاری از بیان زنجیره آلفا برداشته شده و بیان آن آغاز و تشدید می‌شود(۱٤).

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

Archive of SID
www.SID.ir

اریتروئید سازگارتر است و این فرضیه را که mir-150/MYB به عنوان روشن کننده پروموتور اریتروئیدی درMEP 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 اریتروئیدی را بیش از ۶۰٪ کاهش می‌دهد حال آنکه سرکوب-mir 150 با آنتی سنس نتیجه عکس داشته و باعث افزایش تمایز اریتروئیدی می‌شود آنها همچنین فاکتور رونویسیmyb را به عنوان هدف اصلیmir-150 در این قضیه معرفی نمودند(۲۲). که این امر با مطالعه اخیر ما که با کاهش سطحmir-150 موفق به افزایش بیان زنجیره آلفا شده ایم مطابقت دارد چرا که مطابق گزارشهای مختلف رده سلولیk562 قابلیت تمایز به هر دو رده اریتروئیدی و مگاکاریوسیتی را داراست.

طبق مطالعات Testa و همکارانش بیان هموگلوبین‌های مختلف در کلونهای مختلف رده سلولیK562 متفاوت و بسیار هتروژن می‌باشد در هر حال این سلوها هموگلوبین هایPortland , Gower را 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).

Yoon وPrchal نشان دادند که سطحmir-150 در پلی سیتمی ورا که یک نوع پرخونی بدخیم است کاهش دارد. در این بیماری سطح هموگلوبینA (α2ß2) که به بیش از ۱۶۰گرم در لیتر می‌رسد، یک یافته تشخیصی مهم محسوب می‌شود. کاهش سطحmir-150 در پلی سیتمی ورا با مطالعه حاضر ما که کاهش سطحmir-150 سبب افزایش بیان زنجیره هموگلوبین آلفا شده است همخوانی دارد و شاید بتوان در آینده از اینmiRNA به عنوان یک فاکتور تشخیصی و درمانی در پلی سیتمی‌ها و آنمی‌ها استفاده نمود(۲۳).

نتیجه گیری

پی بردن به مکانیسم های 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 اریتروئیدی را به صورت دقیق تر بررسی کرده و ژنهای هدف آنها را شناسایی نماید.

تعمیم این مطالعات بر روی سلولهای پایه‌ای خونساز (Hematopetic stem cell) می‌تواند اطلاعات دقیق تری در اختیار ما بگذارد. همچنین از آنجایی که انتقال آنتی سنس ها 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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. Micrornas: 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 elytroid 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.

Archive of SID

www.SID.ir

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, erythropoesis and iron status in children after major surgical stress. Eur J Pediatr 1995 Jun; 154(6): 458-61.

21. Kes P, Basic-Jukic N. Erythropoesis-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 [Monograph on the internet]. Availiable from: http:// www.hematology.org/ Publications/ Hematologist/ 2009/ 2160.aspx, Accessed at Jul, 2009.

Archive of SID

www.SID.ir