

## The evaluation of expression of genes, which are involved in gamma globin synthesis before and after differentiation of hematopoietic stem cells into erythroid lineage

Zahra Shamsi, Amir Atashi\*, Saeid Abroun, Kaveh Tari, Mahshid AkhavanRahnama, Azadeh Anbarlou, Masoud Soleimani, Saeid Kaviani

Department of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

(Received: 2016/04/14

Accept:: 2016/11/14)

### Abstract

**Backgroundm:** Induction of fetal hemoglobin (Hb-F) can improve the patients' symptoms of haemoglobinopathies. Several factors can induce gamma globin gene expression and increased Hb-F levels in patients. In this study, the expression of genes is involved in regulation of gamma globin synthesis such as PIPKII-alpha, BCL11a, and miR-30a during CD34+ hematopoietic stem cell differentiation into erythroid lineage was studied.

**Material and Methods:** In this study, CD34+ cells were isolated from umbilical cord blood. Then, CD34+ cells were cultured in differentiation medium. Erythroid colonies were harvested on days 8, 11, 14 and gene expression of gamma globin, PIPKII-alpha, BCL11a, and miR-30a were analyzed by quantitative RT-PCR.

**Results:** The results showed that gene expression of gamma-globin gradually at the 8th day after differentiation started and at 14th day reached to the highest level of its expression. In parallel with increasing the expression of gamma-globin (22-folds), the expression of PIPKII-alpha increased (2.5-folds), while the expression of BCL11a decreased (1.2-folds). Moreover, the expression of miR-30a increased during differentiation into erythroid lineage (2.3-folds) ( $P < 0.05$ ).

**Conclusion:** The results indicated that increased expression of PIPKII-alpha and decreased expression of BCL11a during CD34+ cells differentiation to erythroid lineage. According to expression pattern of miR-30a and its target genes, PIPKII-alpha and BCL11a, we cannot suppose the inhibitory effect of miR-30a on PIPKII-alpha expression, but due to inhibitory effect of miR-30a on BCL11a gene, we can introduce this microRNA as a regulatory molecule in the induction of Hb-F pathway. However, the further studies are needed to investigate this interaction.

**Keywords:** Hemoglobinopathy, Gamma globin, PIPKII-alpha, BCL11a, miR-30a

\* Corresponding author: Amir Atashi  
E-mail: atashia@modares.ac.ir

## بررسی بیان ژن‌های موثر در سنتز گاماگلوبین قبل و بعد از تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز به رده سلول‌های اریترئیدی

زهرا شمسی، امیر آتشی\*، سعید آبرون، کاوه طاری، مهشید اخوان رهنما، آزاده انبارلو، مسعود سلیمانی، سعید کویانی

گروه هماتولوژی، دانشکده علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت مقاله: ۹۵/۱/۲۶ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۸/۲۴

### چکیده:

**سابقه و هدف:** القا هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به هموگلوبینوپاتی علائم بیماری را بهبود می‌بخشد. عوامل متعددی می‌توانند بیان ژن گاماگلوبین را القا کرده و سبب افزایش میزان هموگلوبین جنینی در بیماران شوند. از آنجا که امروزه یکی از بهترین رویکردهای درمانی برای بیماران هموگلوبینوپاتی افزایش هموگلوبین جنینی است؛ در این مطالعه بیان ژن‌های دخیل در تنظیم سنتز گاماگلوبین نظیر *PIP2KII-alpha*، *BCL11a* و *miR-30a* در تمایز سلول‌های بنیادی خون‌ساز *CD34+* به رده اریترئیدی بررسی شد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه از نوع تجربی بود. در این مطالعه از سلول‌های *CD34+* جدا شده از خون بندناف نوزادان سالم استفاده شد. سلول‌های *CD34+* در محیط کشت تمایزی کشت داده شد. کلونی‌های اریترئیدی در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ جداسازی شدند و پس از تایید، بیان ژن‌های گاماگلوبین، *PIP2KII-alpha*، *BCL11a* و *miR-30a* با استفاده از تکنیک کمی *Real-Time PCR* ارزیابی شده و با استفاده از فرمول آماری *t-test* آنالیز قرار شدند. **یافته‌ها:** نتایج به دست آمده در این مطالعه نشان داد که در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ بعد از تمایز، بیان کمی ژن گاماگلوبین به تدریج در روز هشتم شروع شده و در روز ۱۴ تمایز به اوج خود می‌رسد. به موازات افزایش ۲۲ برابری بیان گاماگلوبین، ژن *PIP2KII-alpha* نیز روند افزایش ۲/۵ برابری از خود نشان داد؛ در حالی که بیان ژن *BCL11a* در طی تمایز، روند کاهشی تا حد ۱/۲ برابر داشت. علاوه بر این، بیان *miR-30a* در طی تمایز به سمت رده اریترئیدی با افزایش ۲/۳ برابری همراه بود ( $P < 0.05$ ).

**نتیجه‌گیری:** نتایج به دست آمده حاکی از افزایش بیان ژن *PIP2KII-alpha* و کاهش بیان *BCL11a* در روند تمایز اریترئیدی سلول‌های *CD34+* است. با توجه به الگوی بیان *miR-30a* و ژن‌های هدف آن یعنی *BCL11a* و *PIP2KII-alpha* نمی‌توان اثر مهارتی این *microRNA* را بر روی *PIP2KII-alpha* مطرح کرد، ولی به دلیل اثر مهارتی آن روی ژن *BCL11a* می‌توان این *microRNA* به عنوان یکی از مولکول‌های تنظیمی مسیر القای هموگلوبین *F* معرفی کرد. اگرچه مطالعه‌های بیشتری برای بررسی این ارتباط مورد نیاز است.

**واژگان کلیدی:** هموگلوبینوپاتی، گاماگلوبین، *PIP2KII-alpha*، *BCL11a*، *miR-30a*

### مقدمه:

از بیماری‌های ژنتیکی تک ژنی است (۱). کشور ایران یکی از مناطق جغرافیایی با میزان شیوع بالای بیماری تالاسمی است. تخمین زده شده است که حدود ۲ میلیون ناقل در کشور وجود دارد. بر اساس گزارش‌های سازمان انتقال خون، ۲۰ هزار نفر در ایران مبتلا به تالاسمی ماژور هستند (۲). نخستین گزارش این بیماری به سال ۱۹۷۹ برمی‌گردد و تا کنون ۳۷۱ نوع موتاسیون برای این بیماری گزارش شده است. با وجود تمامی درمان‌های مرسوم، کوشش‌ها در نهایت به فوت بیمار مبتلا به تالاسمی ماژور می‌انجامد (۳).

بیماری داسی شکل، یکی از اختلال‌های ژنتیکی و ارثی است که ناشی از

تالاسمی مهم‌ترین بیماری در اثر اختلال در زنجیره بتای هموگلوبین A است. وجود زنجیره‌های باند نشده آلفا دلیل اصلی پاتوفیزیولوژیک این بیماری محسوب می‌شود. بر حسب شدت علائم بالینی اشکال هموزیگوت آن به نام تالاسمی ماژور و هتروزیگوت آن به نام تالاسمی مینور نامیده می‌شوند. تالاسمی ماژور شکلی از آنمی شدید است که در دوره‌های ابتدایی زندگی بعد از کاهش سنتز زنجیره گاما خود را بروز داده و همراه با برخی علائم نظیر اسپنئومگالی و تغییرهای استخوانی است. این بیماری شایع‌ترین بیماری ژنتیکی در جهان و نمونه بارزی

نویسنده مسئول: امیر آتشی

پست الکترونیک: atashia@modares.ac.ir

جایگزینی اسید آمینه اسید گلوتامیک در موقعیت شماره ۶ زنجیره بتا به جای اسید آمینه والین است. در اثر این جایگزینی هموگلوبین در حالت داکسیژنه به صورت کریستاله در گلبول قرمز در می‌آید و گلبول قرمز به حالت داسی تغییر شکل می‌یابد. این بیماری با کم خونی همولیتیک مزمن، افزایش احتمال ابتلا به عفونت و انسداد عروقی همراه است. از مهم‌ترین عوارض ناشی از آن می‌توان به درگیری ریوی به صورت افزایش فشارخون ریوی و سندرم حاد تنفسی و عوارض مغزی و سکنه مغزی اشاره کرد. پیوند مغز استخوان، تزریق خون و استفاده از داروهایی نظیر هیدروکسی اوره و ۵-آزاسیتیدین از جمله راه‌های درمانی این بیماری است (۴-۶).

از مهم‌ترین راه‌های درمان هموگلوبینوپاتی‌ها می‌توان به افزایش هموگلوبین F اشاره کرد که عوامل مختلفی می‌توانند در افزایش آن نقش داشته باشند. داروهایی نظیر ۵-آزاسیتیدین، هیدروکسی اوره و بوتیرات به عنوان القا کننده هموگلوبین F استفاده شده است. با توجه به آثار نامطلوب داروها در افزایش هموگلوبین F راهکار درمانی جدیدی برای افزایش هموگلوبین F مشخص شده که شامل اهداف مولکولی برای القای هموگلوبین F است. در واقع در این نوع راهکار درمانی مولکول‌هایی که در مسیر تنظیم بیان هموگلوبین F و تعویض کلاس زنجیره گاما به بتا نقش دارند هدف می‌گیرند که مهم‌ترین آن‌ها، BCL11a، SOX، EKL1، ۶-DRED، IKaros، MYB و SSP هستند (۹-۷). یکی دیگر از روش‌های افزایش هموگلوبین F تغییر در بیان microRNA (miR) ها است. از مهم‌ترین آن‌ها می‌توان به miR-210، miR-221/222، miR-15a/16، miR-26b و miR-96 اشاره کرد (۱۳-۱۰). از دیگر عوامل دخیل در افزایش بیان هموگلوبین F می‌توان به فسفاتیدیل اینوزیتول فسفات کینازها اشاره کرد که مهم‌ترین زیر گروه آن PIPKIIa است (۱۴، ۱۵). PIPKII- alpha در فعالیت‌هایی نظیر تنظیم بیان ژن، پردازش pre-mRNA و خروج mRNA از هسته نقش دارد. همچنین خاموش شدن ژن alpha PIPKII- به افزایش گاما گلوبین، هموگلوبین F و کاهش عوارض بیماران مبتلا به تالاسمی و کم خونی داسی منجر می‌شود. خانواده miR-30 انسانی که از مهارکننده‌های BCL11a و PIPKII- alpha هستند، دارای ۵ عضو 30a، 30b، 30c، 30d، 30e است. همچنین آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داد که miR-30a هر دو ژن مورد مطالعه را هدف قرار می‌دهد و به این دلیل در این مطالعه این miR انتخاب شد. هدف از این مطالعه تجربی بررسی بیان ژن‌های دخیل در تنظیم بیان ژن گاماگلوبین طی اریتروپوئز سلول‌های بنیادی خونساز در محیط آزمایشگاهی است.

### مواد و روش‌ها:

مطالعه حاضر از نوع مطالعه‌های تجربی بود و طی سال ۱۳۹۴ در دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم پزشکی و گروه خون شناسی انجام شد.

### جداسازی سلول‌های بنیادی خون ساز CD34+

نمونه‌های خون بند ناف از مرکز انتقال خون تهران جمع‌آوری شد و بلافاصله برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای به آزمایشگاه انتقال یافت. برای جداسازی سلول‌های تک هسته‌ای از خون بند ناف ابتدا با استفاده از هیدروکسی اتیل استارچ به نسبت ۵ به ۱ رقیق شد. سپس مایع رویی روی فایکول (GE Healthcare) با غلظت ۷۷/۰۱ به نسبت ۲:۱ انتقال داده شد. سپس سلول‌های تک هسته‌ای با آنتی‌بادی ضد CD34 نشاندار شده (Miltenyi Biotec, USA) و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. در نهایت سلول‌های بنیادی خونساز CD34+ با استفاده از ستون MACS (Miltenyi Biotec, USA) جداسازی شدند (۱۲).

### فلوسایتومتری:

تعیین هویت سلول‌های بنیادی خون ساز جداسازی شده با روش MACS با استفاده از روش فلوسیتومتری (ABI Attune Flow cytometer) انجام شد. سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی مونوکلونال FITC anti-CD34

استفاده شد. برای تایید کلنی‌های اریتروئیدی نیز از روش فلوسایتومتری استفاده شد. به این منظور، ابتدا سوسپانسیون سلولی از کلنی‌های اریتروئیدی تهیه شد. سپس سلول‌ها به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با آنتی‌بادی مونوکلونال FITC anti-CD71 (eBiosciences, USA) انکوبه شدند. سپس سلول‌ها با بافر PBS شست‌وشو داده شدند و با آنتی‌بادی ثانویه به مدت ۴۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و در تاریکی انکوبه شدند.

### تمایز اریتروئیدی:

سلول‌ها در محیط کشت نیمه جامد متیل سلولز H4434 (Stem Cell Technology) حاوی محیط کشت (IMDM (Sigma) در انکوباتور با درصد رطوبت حداقل ۹۰ درصد، دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن ۵ درصد و بدون تعویض محیط کشت قرار گرفتند. پس از تشخیص ریخت‌شناسی کلونی‌های اریتروئیدی، این کلنی‌ها با کمک میکروپیپت در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ از محیط کشت نیمه جامد برداشته شدند. برای به دست آوردن سوسپانسیون تک سلولی، کلونی‌های جمع‌آوری شده در ۶ میلی‌لیتر بافر PBS سرد حاوی ۲ میلی مولار EDTA حل شدند. شمارش سلولی با استفاده از هموسیتومتر و بررسی درصد سلول‌های زنده با استفاده از رنگ‌آمیزی حیاتی تریپان بلو (Trypan Blue) انجام شد (۱۲).

### تایید کلنی‌های اریتروئیدی:

تایید کلنی‌های اریتروئیدی با استفاده از رنگ‌آمیزی گیمسا و فلوسیتومتری انجام شد. برای رنگ‌آمیزی گیمسا، لام با روش سیتواسپین تهیه شد و رنگ‌آمیزی گیمسا انجام شد. در فلوسیتومتری بیان CD71 به عنوان شاخص تمایزی رده اریتروئیدی با استفاده از آنتی‌بادی FITC anti-CD71 (eBiosciences, USA) بررسی شد.

### Real-Time PCR:

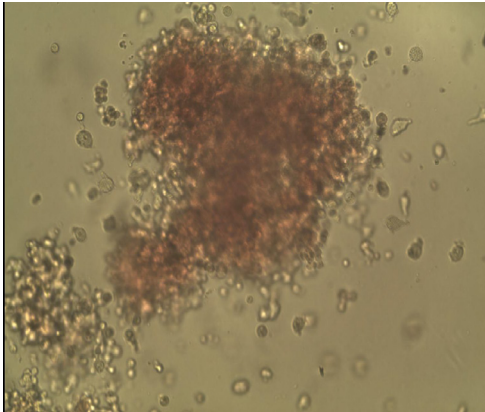
ابتدا با استفاده از RNx plus و روش فنل کلروفرم، RNA از سلول‌های کشت داده شده استخراج شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز cDNA خاص miRNA (Stratagene) و کیت Cinnagen برای ژن‌های گاماگلوبین و PIPKII-alpha و BCL11a انجام شد. PCR با استفاده از PCR (Cinnagen) 2X Mastermix انجام شد. در پایان محصولات PCR درون چاهک‌های ژل ۲درصد آگارز ریخته شده و ارزیابی شدند. سپس (Applied Biosystem) Real Time PCR (inc. RealQ PCR Master Mix) برای بیان کمی ژن‌های مورد نظر با استفاده از GAPDH و U6 به عنوان ژن Housekeeping انجام شد. توالی پرایمرها در جدول‌های زیر آمده است.

توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن‌های PIP-، Gamma globin ، BCL11a، KII-alpha و GAPDH

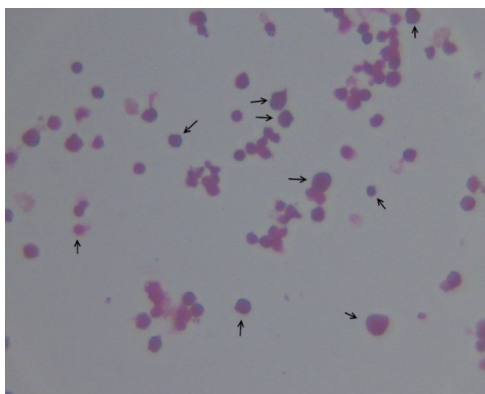
پرایمر	توالی پرایمر	دمای annealing	طول محصول (bp)
Gamma globin-F	TGTGGAAGATGCTGGAGGAGA	۶۰ °C	۷۱
Gamma globin-R	CAAAGAACCTCTGGTCCATG		
PIPKII-alpha-F	CCACCGTTTGTCTGTATAGGA	۶۲ °C	۹۹
PIPKII-alpha-R	TTCAGAGTTGGCAGTTCTTTGG		
BCL11a-F	CGCAGCGACACCTTGTCTTC	۶۱ °C	۸۹
BCL11a-R	GCTTCCATCCATCCGAAAACCTGCC		
GAPDH-F	CGCTGAGTACGTCGTGGAGTC	۶۰ °C	۱۸۴
GAPDH-R	GCAGGAGCATTGCTGATGA		

## توالی پرایمرهای مورد استفاده برای ژن های miR-30a و U6

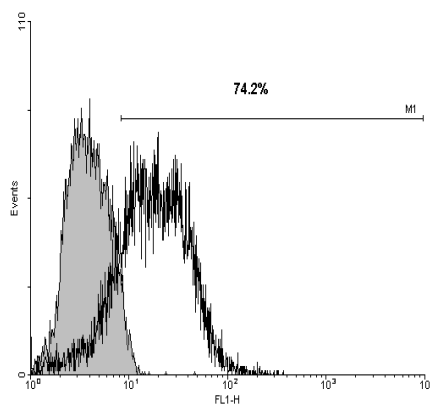
پرایمر	توالی پرایمر	دمای annealing	طول محصول (bp)
hsa-miR-30a-F	TGTAACATCCTCGACTGGAAG	۶۰°C	۷۵
U6-F	AAATTGGAACGATACAGAGAAGG	۶۰°C	۷۸



شکل ۲. کلنی اریترئوئیدی را پس از ۱۴ روز در محیط کشت القا کننده تمایز نشان می دهد. بزرگنمایی  $\times 400$



شکل ۳. سلول های اریترئوئیدی حاصل از تمایز و رنگ آمیزی شده با رایت گیمسا که با نشانگر نشان داده شده است. بزرگنمایی اولیه  $\times 1000$



شکل ۴. نتیجه مربوط به درصد بیان مارکر CD71 در روز ۱۴ تمایز. ۷۴ درصد سلول ها مارکر CD71 را بیان می کنند.

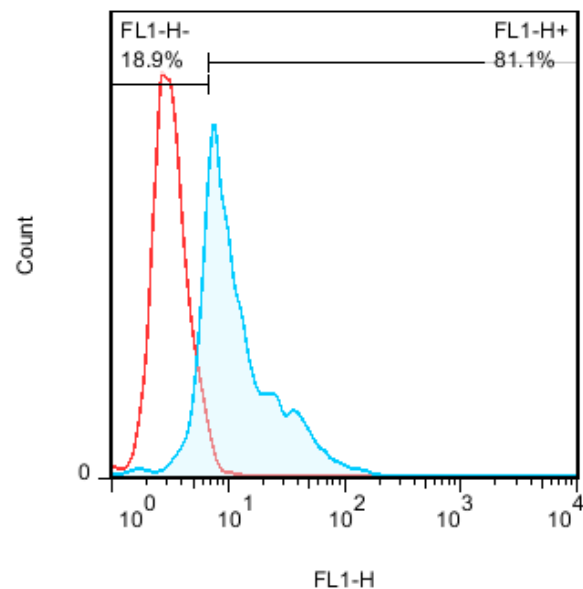
## آنالیز آماری:

تمامی تست ها به صورت سه بار تکرار انجام شدند. آنالیز آماری با استفاده از نرم افزار SPSS 18.0 و T-test برای آنالیز آماری انجام شد. معناداری آماری کمتر از  $0.05 (P \text{ value} < 0.05)$  در نظر گرفته شد.

## یافته ها:

**بررسی خلوص سلول های بنیادی خون ساز جدا شده از خون بند ناف:** تعداد سه نمونه خون بند ناف برای جداسازی سلول های بنیادی خونساز استفاده شد. نتایج فلوسیتومتری با آنتی CD34-FITC به طور میانگین خلوص ۸۱/۱ درصد را برای سلول های جداسازی شده نشان دادند که گراف فلوسیتومتری آن در شکل ۱ آورده شده است.

نتایج بررسی فلوسیتومتری سلول های بنیادی خون ساز جدا شده به روش MACS از نظر درصد مارکر CD34+ قبل از تمایز. نتایج حاصل خلوص ۸۱/۱ درصد را نشان می دهند.



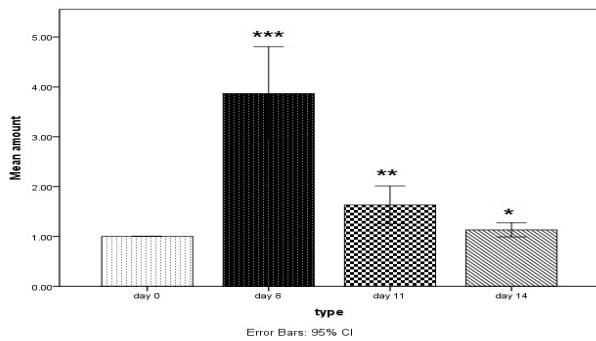
شکل ۱. ارزیابی خلوص سلول های بنیادی CD34+ (CD34-FITC).

**ارزیابی مورفولوژیک کلنی، رنگ آمیزی و فلوسیتومتری بعد از تمایز به رده اریترئوئیدی**

مورفولوژی کلنی ها نشان دهنده تمایز سلول های خون ساز به سمت رده اریترئوئیدی بودند (شکل ۲). همچنین رنگ آمیزی گیمسا نشان دهنده تمایز بود (شکل ۳). فلوسیتومتری کلنی های اریترئوئیدی نشان داد که حدود ۷۰ درصد سلول ها مارکر CD71 بیان می کنند (شکل ۴).

**بررسی بیان PIPKII-alpha، miR-30a، گاما گلوبین و BCL11a بعد از تمایز به رده اریترئوئیدی**

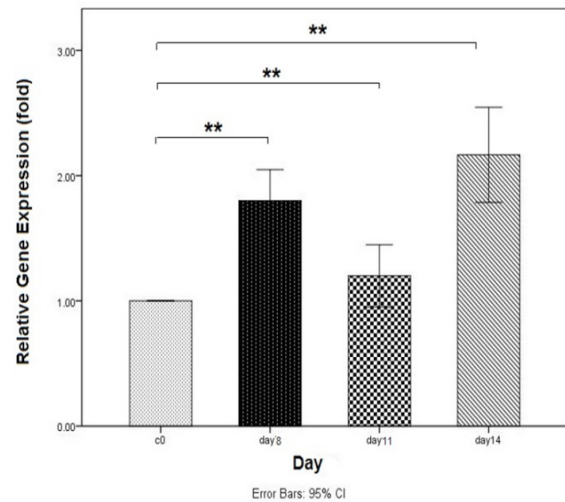
بیان miR-30a در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ به ترتیب افزایش ۱/۹، ۱/۳ و ۲/۳ را نشان داد که نسبت به گروه کنترل معنادار بود ( $P \text{ value} < 0.05$ ) (شکل ۵). همچنین ژن های PIPKII-alpha (به ترتیب ۰/۹، ۱/۸ و ۲/۵ برابر) و گاما گلوبین (به ترتیب



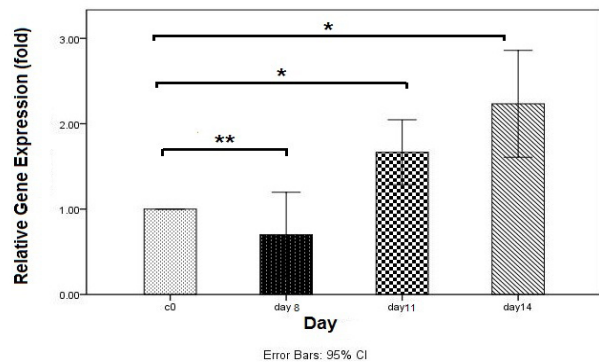
شکل ۴. کاهش بیان ژن BCL11a طی روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ تمایز (P-value <0.05 \*, P-value <0.01 \*\*, P-value <0.001 \*\*\*)

از هموگلوبین جنینی در بیماران مبتلا به کم خونی داسی یا مبتلا به تالاسمی می‌تواند عوارض بالینی را تا حد زیادی تخفیف دهد (۱۶)alpha. امروزه مسیرهای درمانی جدیدی برای القای هموگلوبین F مورد توجه قرار گرفته است که از جمله آن‌ها می‌توان به هدف قرار دادن مولکول‌های تنظیم کننده بیان هموگلوبین F و مولکول‌هایی که در مسیر هموگلوبین سوئیچینگ (تعویض کلاس زنجیره گاما به بتا) نقش دارند و همچنین مولکول‌هایی که در مکانیسم‌های تنظیمی به واسطه داروها نقش دارند اشاره کرد. یکی از مهم‌ترین ژن‌های دخیل در هموگلوبین سوئیچینگ می‌توان به BCL11a اشاره کرد. BCL11a یک فاکتور رونویسی است که موجب سوئیچ زنجیره گاما به بتا و افزایش آن باعث کاهش تولید F-Hb می‌شود (۱۷). در این مطالعه بیان ژن گاما گلوبین در مراحل اولیه اریتروپوئز بیان پایینی داشت و به تدریج با تمایز بالا رفت. در نتیجه بیان ژن BCL11a باید هنگام اریتروپوئز کاهش یابد که در مطالعه حاضر نیز این کاهش بیان هنگام تمایز به سمت رده اریتروئیدی مشاهده شد. از طرفی دیگر مطالعه‌های اندکی به نقش احتمالی PIPKII-alpha در سنتز گلوبین‌ها اشاره کرده‌اند (۱۸، ۱۹). ویتو و همکارانش (۲۰۱۴) همچنین نشان دادند که بیان ژن PIPKII-alpha طی تمایز اریتروئیدی افزایش می‌یابد (۱۸). نتایج این مطالعه نشان داد که در طول تمایز اریتروئیدی بیان PIPKII-alpha در روزهای مورد مطالعه نسبت به نمونه کنترل افزایش می‌یابد که با مطالعه ویتو و همکارانش (۲۰۱۴) تطابق دارد.

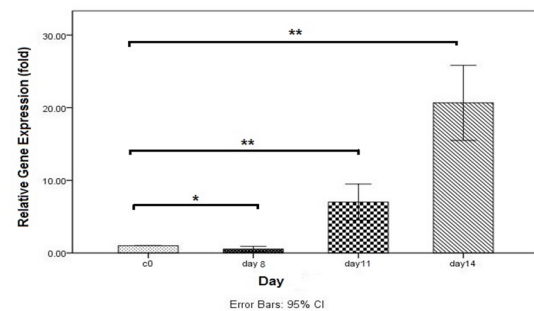
یکی از عوامل تنظیمی بیان پروتئین‌ها از جمله پروتئین هموگلوبین miRNA هستند. برای مشخص شدن بهتر مولکول‌های دخیل در تنظیم بیان هموگلوبین و نقش miRNAs در کنترل بیان ژن‌ها آنالیز بیوانفورماتیک انجام شد. آنالیزهای بیوانفورماتیک نشان داد که miR-30a هر دو ژن مورد مطالعه را هدف قرار می‌دهد. چونگ (Choong) و همکارانش (۲۰۰۷) نشان دادند که این miR طی تمایز اریتروئیدی افزایش بیان دارد (۲۰) که با نتایج مطالعه حاضر تطابق دارد. از طرف دیگر جیانگ (Jiang) و همکارانش نشان دادند که BCL11a یکی از ژن‌های هدف miR-30a است (۲۱). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان استنباط کرد که افزایش بیان miR-30a به کاهش بیان ژن BCL11a طی اریتروپوئز منجر می‌شود که با برداشته شدن اثر مهاري این فاکتور رونویسی بیان گاما گلوبین طی تمایز به سمت رده اریتروئیدی افزایش می‌یابد. همان‌طور که نتایج نشان داد، افزایش بیان miR-30a با کاهش بیان ژن PIPKII-alpha همراه نبود و می‌توان عنوان کرد که به احتمال ارتباط مستقیمی بین آن‌ها وجود ندارد. البته این احتمال نیز وجود دارد که miR-30a کنترل PIPKII-alpha را تا حدودی بر عهده داشته باشد، ولی وجود القاگرهای قوی‌تر احتمالی دیگری اجازه نمی‌دهند اثر مهاري miR-30a نمود پیدا کند. به هر حال مطالعه‌های بیشتری لازم است تا مکانیسم دقیق این ارتباط بین ژن‌های دخیل در سنتز هموگلوبین و بیان miR-30a مشخص شود. در مجموع می‌توان گفت که نتایج به دست آمده حاکی از افزایش بیان PIPKII-alpha و کاهش بیان BCL11a در روند تمایز اریتروئیدی سلول‌های CD34+ است. با توجه به الگوی بیان miR-30a و ژن‌های هدف آن یعنی PIPKII-alpha و BCL11a نمی‌توان اثر مهاري این microRNA را روی PIPKII-alpha مطرح کرد، ولی به دلیل اثر مهاري آن روی ژن BCL11a می‌توان این microRNA به عنوان یکی از مولکول‌های تنظیمی مسیر القای هموگلوبین F معرفی کرد؛ اگرچه مطالعه‌های بیشتری برای بررسی این ارتباط مورد نیاز است.



شکل ۵. افزایش بیان ژن miR-30a در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ تمایز (P-value <0.01 \*\*, P-value <0.001 \*\*\*)



شکل ۶. افزایش بیان ژن PIPKII-alpha در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ تمایز (P-value <0.05 \*, P-value <0.01 \*\*, P-value <0.001 \*\*\*)



شکل ۷. افزایش بیان ژن گاما گلوبین در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ تمایز (P-value <0.05 \*, P-value <0.01 \*\*, P-value <0.001 \*\*\*)

۰/۷، ۸ و ۲۲ برابر افزایش بیان معناداری را به ترتیب در روزهای ۸، ۱۱ و ۱۴ نشان دادند (P-value <0.05) (شکل ۶ و ۷). درحالی که بیان ژن BCL11a کاهش معناداری را نشان داد (P-value <0.05) (شکل ۴).

### بحث:

جست‌وجو برای پیدا کردن استراتژی‌های نو برای درمان اختلال‌های زنجیره بتا از دهه ۸۰ رونق گرفت. این جست‌وجو در بسیاری از موارد به خصوص معطوف به درمان بیماری شایع تالاسمی شد. نشان داده شده است که حتی مقادیر کمی

## منابع:

- Liaska A, Petrou P, Georgakopoulos CD, Diamanti R, Papaconstantinou D, Kanakis MG, et al.  $\beta$ -Thalassemia and ocular implications: a systematic review. *BMC Ophthalmol*. 2016;16(1):102.
- Najmabadi H, Karimi-Nejad R, Sahebjam S, Pourfarzad F, Teimourian S, Sahebjam F, et al. The  $\beta$ -thalassemia mutation spectrum in the Iranian population. *Hemoglobin*. 2001;25(3):285–96.
- Sankaran VG, Nathan DG. Thalassemia: an overview of 50 years of clinical research. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2010;24(6):1005–20.
- Stuart MJ, Nagel RL. Sickle-cell disease. *Lancet*. 2004;364(9442):1343–60.
- Meier ER, Rampersad A. Pediatric Sickle Cell Disease - Past Successes and Future Challenges. *Pediatr Res*. 2016; [Epub ahead of print].
- Steven A, Raghavan P, Rath TJ, Gandhi D. Neurologic and Head and Neck Manifestations of Sickle Cell Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*. 2016;30(4):779–98.
- Zhou D, Liu K, Sun C-W, Pawlik KM, Townes TM. KLF1 regulates BCL11A expression and gamma-to beta-globin gene switching. *Nat Genet*. 2010;42(9):742–4.
- Sankaran VG, Menne TF, Xu J, Akie TE, Lettre G, Van Handel B, et al. Human fetal hemoglobin expression is regulated by the developmental stage-specific repressor BCL11A. *Science*. 2008;322(5909):1839–42.
- Jiang J, Best S, Menzel S, Silver N, Lai MI, Surdulescu GL, et al. cMYB is involved in the regulation of fetal hemoglobin production in adults. *Blood*. 2006;108(3):1077–83.
- Zhang Z, Sun H, Dai H, Walsh R, Imakura M, Schelter J, et al. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell cycle*. 2009;8(17):2756–68.
- Sankaran VG, Menne TF, Šćepanović D, Vergilio J-A, Ji P, Kim J, et al. MicroRNA-15a and -16-1 act via MYB to elevate fetal hemoglobin expression in human trisomy 13. *Proc Natl Acad Sci*. 2011;108(4):1519–24.
- Gabbianelli M, Tešta U, Morsilli O, Pelosi E, Saulle E, Petrucci E, et al. Mechanism of human Hb switching: a possible role of the kit receptor/miR-221-222 complex. *Haematologica*. 2010;95(8):1253–60.
- Azzouzi I, Moeš H, Winkler J, Fauchère J-C, Gerber AP, Wollscheid B, et al. MicroRNA-96 directly inhibits  $\gamma$ -globin expression in human erythropoiesis. *PLoS One*. 2011;6(7):e22838.
- Zaccariotto TR, Lanaro C, Albuquerque DM, Santos MN, Bezerra MA, Cunha FG, et al. Expression profiles of phosphatidylinositol phosphate kinase genes during normal human in vitro erythropoiesis. *Genet Mol Res GMR*. 2012;11(4):3861.
- Tang DC, Zhu J, Liu W, Chin K, Sun J, Chen L, et al. The hydroxyurea-induced small GTP-binding protein SAR modulates gamma-globin gene expression in human erythroid cells. *Blood*. 2005;106(9):3256–63.
- Thein SL, Menzel S, Lathrop M, Garner C. Control of fetal hemoglobin: new insights emerging from genomics and clinical implications. *Hum Mol Genet*. 2009;18(2):216–23.
- Xu J, Peng C, Sankaran VG, Shao Z, Esrick EB, Chong BG, et al. Correction of sickle cell disease in adult mice by interference with fetal hemoglobin silencing. *Science*. 2011;334(6058):993–6.
- de Albuquerque Wobeto VP, Machado-Neto JA, Zaccariotto TR, Ribeiro DM, Duarte A da SS, Saad STO, et al. PIPKII $\alpha$  is widely expressed in hematopoietic-derived cells and may play a role in the expression of alpha- and gamma-globins in K562 cells. *Mol Cell Biochem*. 2014;393(1–2):145–53.
- Wenning MRSC, Mello MP, Andrade TG, Lanaro C, Albuquerque DM, Saad STO, et al. PIP4KIIA and  $\beta$ -globin: Transcripts differentially expressed in reticulocytes and associated with high levels of Hb H in two siblings with Hb H disease. *Eur J Haematol*. 2009;83(5):490–3.
- Choong ML, Yang HH, McNiece I. MicroRNA expression profiling during human cord blood-derived CD34 cell erythropoiesis. *Exp Hematol*. 2007;35(4):551–64.
- Jiang B, Zhang X, Su J, Meng W, Yang X, Yang J, et al. BCL11A overexpression predicts survival and relapse in non-small cell lung cancer and is modulated by microRNA-30a and gene amplification. *Mol Cancer*. 2013;12(1):1.