

## بررسی میزان القا ژن $\gamma$ -گلوبین با غلظت‌های مختلف هیدروکسی اوره در رده سلولی K562 با هدف درمان بتا تالاسمی

زهرا دیلمی خیابانی<sup>۱</sup>، مهدی بنان<sup>۲</sup>، علی محمد اصغریان<sup>۳</sup>، جلال قره سوران<sup>۴</sup>، غلامرضا جوادی<sup>۵</sup>،  
کیما کهریزی<sup>۶</sup>، حسین نجم آبادی<sup>۷</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی دکترای سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران  
<sup>۲</sup> استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران  
<sup>۳</sup> مربی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن، تنکابن، ایران  
<sup>۴</sup> مربی، کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران  
<sup>۵</sup> دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران  
<sup>۶</sup> دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران  
<sup>۷</sup> استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

### چکیده

**سابقه و هدف:** هیدروکسی اوره (HU) دارویی است که می‌تواند منجر به القای ژن  $\gamma$ -گلوبین به منظور درمان  $\beta$ -تالاسمی گردد. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف این دارو بر میزان القای ژن  $\gamma$ -گلوبین در سلول‌های K562 بررسی و غلظت بهینه جهت القا ژن  $\gamma$ -گلوبین در این سلول‌ها تعیین و هم‌چنین اثر مهاري siRNA بر ژن کاندیدای مسیر سیگنالی HU در سلول‌های K562 بررسی شد. **روش بررسی:** در این مطالعه تجربی، سلول‌های K562 با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره تیمار شدند. جهت مطالعه میزان مهار ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره، siRNA هدف طراحی و به سلول‌های K562 با روش Lipofection وارد شدند. میزان القای ژن  $\gamma$ -گلوبین و میزان مهاري siRNA هدف طراحی و به سلول‌های K562 با روش Lipofection وارد شدند. **یافته‌ها:** تیمار سلول‌های K562 با هیدروکسی اوره، بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در غلظت ۵۰ میکرومولار ۱/۷۵ برابر و در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار تا ۲/۵ برابر افزایش یافت. یافته‌های حاصل از تاثیر siRNA بر روی سلول‌های K562، مهار ۷۹ درصدی را نشان داد. **نتیجه‌گیری:** این مطالعه نشان داد که القا  $\gamma$ -گلوبین در غلظت ۱۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره مشابه غلظت ۲۰۰ میکرومولار است. هم‌چنین میزان مهار با siRNA با کارایی بالا در مورد ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره در سلول‌های K562 مشاهده گردید. **واژگان کلیدی:** ژن  $\gamma$ -گلوبین، هیدروکسی اوره، سلول‌های K562، Real time PCR، siRNA

### مقدمه

نامتعادل زنجیره  $\alpha$ -گلوبین منجر به رسوب آن و در نهایت القا مرگ سلولی در اریتروبلاست‌ها می‌شود (۳-۶). در انسان در مرحله قبل از تولد، هموگلوبین جنینی (HbF) که متشکل از دو جفت زنجیره به صورت  $\alpha_2\gamma_2$  می‌باشد، هموگلوبین عمده را تشکیل می‌دهد (۱-۸). بعد از تولد در اثر سوئیچینگ ژن  $\gamma$ -گلوبین خاموش شده و بیان ژن  $\beta$ -گلوبین صورت می‌گیرد (۳-۸). در افراد مبتلا به  $\beta$ -تالاسمی قبل از تولد به دلیل حضور

بتا-تالاسمی از بیماری‌های ژنتیکی است که می‌تواند توسط بیش از ۲۰۰-۱۷۵ نوع جهش نقطه‌ای بروز کند (۴-۱). در اثر این جهش‌ها نسبت زنجیره  $\alpha$  به  $\beta$  گلوبین به هم خورده و افزایش

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، مرکز تحقیقات ژنتیک، زهرا دیلمی  
خیابانی (email: zdelami@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۸۷/۹/۲۶

تاریخ پذیرش مقاله: ۸۸/۲/۱۵

باشد. با توجه به اینکه پروتئین CREB (cAMP response element binding protein) یک پروتئین مهم در اکثر مسیرهای سیگنالی به شمار می‌رود (۲۷)، در این قسمت از تحقیق اثر مهار کننده CREB siRNA در سلول‌های K562 مورد بررسی قرار گرفت.

### مواد و روشها

در این پژوهش تجربی سلول‌های K562 در محیط RPMI (Biosera) با FBS (Fetal Bovine Serum-Biosera) ۱۰ درصد و یک درصد از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استرپتومایسین (Biosera) در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، CO<sub>2</sub> ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند تا سلول‌ها به  $5 \times 10^5$  در هر میلی‌لیتر برسند (۵،۹،۱۱،۱۶). کشت سلول‌ها در پلیت‌های استریل ۱۲ چاهکی انجام گرفت.

سلول‌های K562 کشت داده شده در سه چاهک مختلف پلیت ۶ چاهکی به طور جداگانه تحت تاثیر هیدروکسی اوره (Sigma) با غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار قرار گرفته و در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، CO<sub>2</sub> ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. بعد از ۲۴ ساعت، سلول‌ها رسوب داده شده و ۱ میلی‌لیتر محیط جدید به آنها اضافه شده و دوباره با هیدروکسی اوره تیمار شدند. این عمل برای سه روز متوالی تکرار شد. لازم به ذکر است که یک چاهک سلولی به عنوان کنترل آزمایش، بدون اضافه کردن هیدروکسی اوره انتخاب شد.

siRNA ژن CREB، با استفاده روش Lipofection به داخل سلول‌های K562 ترانسفکت شدند. توالی siRNA مورد استفاده در این تحقیق به صورت 5' GGUGGAAA AUGGACUGGCU tt3' بود. طراحی این siRNA بر اساس معیارهای Reynolds و همکاران صورت گرفت (۲۴). جهت مطالعات siRNA علاوه بر siRNA هدف نیاز به siRNA منفی (Negative siRNA) نیز می‌باشد که این siRNA با هیچ mRNA رابطه مکملی نداشته و بنابراین بر روی بیان هیچ ژنی را تاثیر نمی‌گذارد. برای هر نمونه، کمپلکس لیپوفکتامین به شرح ذیل آماده گردید: مقدار ۱۰۰ پیکو مولار از siRNA در ۱۰۰ میکرولیتر RPMI بدون سرم، رقیق شده و به آرامی چند بار میکس می‌شود. مقدار ۲ میکرولیتر از لیپوفکتامین (Lipofectamine TM 2000- Invitrogen) در ۱۰۰ میکرولیتر محیط کشت RPMI بدون سرم مخلوط شده و ۵ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب

HbF بیماری بروز نمی‌کند و زمانی که HbF با Adult HbA (Hb جایگزین می‌گردد، عوارض بالینی بیماری مشاهده می‌شود) (۳، ۸-۵). به این ترتیب  $\beta$ -تالاسمی از معدود بیماری‌هایی است که در آن ژن فعال گذرا در دوره جنینی یعنی  $\gamma$ -گلوبین می‌تواند با دوباره فعال شدن، جایگزین ژن موتانت  $\beta$ -گلوبین گردد (۵-۱۵). داروهای مختلفی مثل 5-Azacytidine، مشتقات بوتیرات و هیدروکسی اوره می‌تواند باعث القای سنتز  $\gamma$ -گلوبین گردد (۵، ۱۵-۸). از بین داروهای فوق هیدروکسی اوره تنها دارویی است که توسط FDA (Federal Drug Administration) تصویب شده است. مطالعات نشان داده که این دارو، HbF را در بیماران مبتلا به  $\beta$ -تالاسمی افزایش داده و منجر به بهبود بیماران می‌گردد (۸-۵، ۱۵، ۱۶). از طرفی داروی هیدروکسی اوره توکسیک می‌باشد و سبب کاهش رشد سلول‌ها می‌گردد. با توجه با این موضوع، باید حداقل غلظتی از این دارو که بیشترین القای بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین را منجر شود، استفاده گردد. در گزارشات منتشر شده، القا بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در اثر هیدروکسی اوره با روش نورترن بلات نشان داده شده است، ولی تاکنون میزان القا بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در غلظت‌های مختلف هیدروکسی اوره، با استفاده از روش Real time PCR انجام نشده است. مطالعات نشان داده که Mitogen activated protein kinase (که از سرین/ترئونین کینازهای مهم سلول می‌باشد، در اثر هیدروکسی اوره فسفریله و فعال می‌گردد. در پایین دست p38MAPK پروتئین‌هایی مثل CREB، ATF-2 و CREM قرار دارند. این پروتئین‌ها در اثر فعالیت کینازی p38 می‌توانند فسفریله و فعال گردند. در رابطه با اینکه کدامیک از این پروتئین‌ها در پایین دست مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره قرار دارند و توسط p38 فعال می‌گردند، هنوز اطلاعات زیادی در دسترس نمی‌باشد.

مطالعات ما نشان داد که در رابطه با القا ژن  $\gamma$ -گلوبین، در غلظت ۱۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره هم می‌توان به نتایج مشابه با غلظت ۲۰۰ میکرومولار دست یافت. به این ترتیب می‌توان در حداقل غلظت هیدروکسی اوره، حداکثر القا ژن  $\gamma$ -گلوبین را در سلول‌های K562 مشاهده نمود. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در غلظت‌های مختلف هیدروکسی اوره و تعیین غلظت بهینه هیدروکسی اوره جهت القا بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین در سلول‌های K562 بود. از طرف دیگر با استفاده از تکنولوژی siRNA، میزان مهار ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره مورد بررسی قرار گرفت. بکارگیری siRNA کارآمد با اثر مهار بالایی می‌تواند در شناسایی پروتئین‌های درگیر در مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره مفید

آن ایزو پروپانول (Merck) اضافه و کاملاً مخلوط گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه ۱۳۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. به رسوب‌های حاصله یک میلی‌لیتر اتانول (Merck) سرد اضافه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۸۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. در انتها رسوب‌های حاصله در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اتوکلاو شده حل گردید (۱۸، ۱۹). جهت تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA علاوه بر اندازه‌گیری جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ بوسیله اسپکتروفوتومتر، در ژل لکتروفورز با ۱ درصد آگارز نیز بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت (Qiagen) QantiTect Reverse transcription انجام گرفت. بر طبق روش ذکر شده در کیت، مقدار ۱ میکروگرم RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده گردید (۱۸).

به منظور انجام Real-time PCR و بررسی بیان ژن، نمونه‌های cDNA به صورت ۵:۹۵ رقیق شدند. ۵ میکرولیتر از cDNA های رقیق شده با ۱۰ میکرولیتر از محلول پایه Quantifast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) و ۱/۵ میکرولیتر از هر سه پرایمر در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر در چاهک‌های ۸ تایی با استفاده از ABI PRISM7000 وارد واکنش شدند. برنامه واکنش شامل موارد زیر بود: گرمادهی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه که در این مرحله Hot start Taq DNA polymerase فعال می‌شود. دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه که در طی ۳۵ چرخه PCR انجام گردید (۲۰).

توالی پرایمری استفاده شده  
نام ژن  
γ-globin\_F 5'-GGGAAGGCTCCTGGTTGTCTA-3'  
Γ-globin\_R 5'-TCTTGCCATGTGCCTTTGACTT-3'  
CREB\_F 5'-CACCTGCCATCACCACTGTAA-3'

CREB\_R 5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'  
GAPDH\_F 5'-GGTGGTCTCTCTGACTTCAACA-3'  
GAPDH\_R 5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'

واکنش‌ها از نوع Relative quantification انجام گردید که در آن بیان ژن هدف در مقایسه با بیان یک ژن خانه‌دار (House keeping) 3-GAPDH (Glyceraldehyde phosphate dehydrogenase) به عنوان کنترل داخلی مقایسه گردید. سپس از فرمول ذیل جهت محاسبه بیان ژن استفاده گردید (۲۰، ۲۳).

$$\frac{\text{Sample 1}}{\text{Sample 2}} = \frac{2^{CT_{B1}-CT_{B2}}}{2^{CT_{A1}-CT_{A2}}} = 2^{(CT_{B1}-CT_{B2})-(CT_{A1}-CT_{A2})} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

در مورد بررسی میزان القا بیان ژن γ-گلوبین با غلظت‌های صفر، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره و همچنین بررسی میزان مهارت siRNA ژن CREB فرمول فوق به صورت ذیل بود:

$$2\Delta\Delta CT = 2(\Delta\gamma\text{-globin}-\Delta\text{GAPDH})$$

$$2\Delta\Delta CT = 2(\Delta\text{CREB}-\Delta\text{GAPDH})$$

siRNA و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط شده و ۲۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس Lipofectamine-DNA ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می‌شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملاً پخش گردد. پلیت در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، CO<sub>2</sub> ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند (۲۵). جهت کنترل کارایی ترانسفکشن، در کنار سلول‌های ترانسفکت شده با CREB siRNA در چاهک‌های جداگانه با همان شرایط ترانسفکشن پلاسمید pSV-β-Galactosidase نیز به داخل سلول‌ها ترانسفکت شدند. در صورت وارد شدن پلاسمید به سلول‌ها، بیان β-گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد که با رنگ‌آمیزی سلول‌ها به رنگ آبی نمایان می‌شوند. رنگ‌آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با pSV-β-Gal Staining Set (Roche) از کیت β-Gal انجام گرفت. این کیت متشکل از X-Gal و Iron buffer می‌باشد که با ترکیب این دو محلول با نسبت مشخص می‌توان بیان ژن lacZ باکتریایی را در هر سلول ترانسفکت شده مطالعه نمود. به این ترتیب سلول‌های ترانسفکت شده و تعداد آنها با کمک میکروسکپ نوری به راحتی قابل تشخیص می‌باشند. جهت تهیه فیکساتیو مقدار ۵۴۰ میکرولیتر فرمالدهید ۳۷ درصد در ۹/۳۸ میلی‌لیتر PBS اضافه شده و در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرم شد. جهت تهیه محلول رنگ‌آمیزی، ۱ واحد از X-Gal در ۱۹ واحد Iron buffer رقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملاً مخلوط گردید. برای رنگ‌آمیزی سلول‌های سوسپانسیون K562، رسوب سلولی در ۱۰ میلی‌لیتر PBS حل شده و دوباره سانتریفوژ گردید. محلول PBS حذف شده و سلول‌ها در ۱-۲ میلی‌لیتر فیکساتیو به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌ها رسوب داده شده و بلافاصله فیکساتیو حذف گردید و رسوب سلولی دو بار با PBS شسته شد. سپس در ۱-۲ میلی‌لیتر محلول رنگ‌آمیزی حل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲-۲۴ ساعت انکوبه شد. سلول‌های رنگ شده با میکروسکپ نوری معکوس مطالعه گردیدند.

استخراج RNA از سلول‌های K562 تیمار شده با هیدروکسی اوره و کنترل با استفاده از محلول RNX-Plus انجام گرفت (۱۸، ۱۹). سلول‌های K562 با سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ rpm رسوب‌دهی شدند. به هر کدام از رسوب‌های حاصل از چهار نمونه یک میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus (Cinagene) اضافه و به مدت ۵-۱۰ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی برداشته شد و هم حجم

**یافته‌ها**

همان‌طور که در شکل ۱ و جدول ۱ مشاهده می‌شود، نتایج حاصل از استخراج RNA از کیفیت خوبی برخوردار است. بالاتر بودن جذب نوری  $260/280$  از  $1/8$  نشانگر خالص بودن RNA می‌باشد. همچنین وجود باندهای  $18$  s rRNA و  $28$  s بیانگر سالم بودن RNA و عدم تخریب آن می‌باشد.

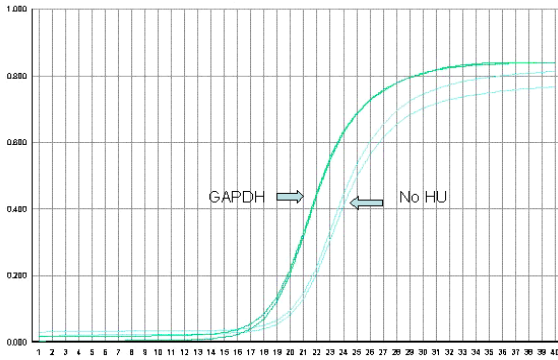
**جدول ۱-** نتایج مربوط به استخراج RNA از سلول‌های K562 تیمار شده با هیدروکسی اوره (HU) و کنترل.\*

	کنترل (بدون HU)	HU ( $50 \mu\text{M}$ )	HU ( $100 \mu\text{M}$ )	HU ( $200 \mu\text{M}$ )
مقدار RNA ( $\mu\text{g/ml}$ )	۱۰۰۰	۹۵۰	۱۰۵۰	۱۲۰۰
OD $260/280$	۱/۸۰	۱/۸۰	۱/۸۵	۱/۸۲

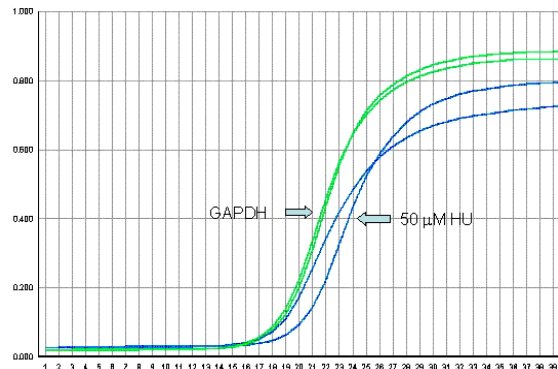
\*  $1 \mu\text{g}$  از هر کدام RNA ها جهت سنتز cDNA استفاده شد. با توجه به میزان جذب نوری در RNA  $260/280$  ها، از کیفیت خوبی برخوردار هستند.

0  $\mu\text{M}$  50  $\mu\text{M}$  100  $\mu\text{M}$  200  $\mu\text{M}$

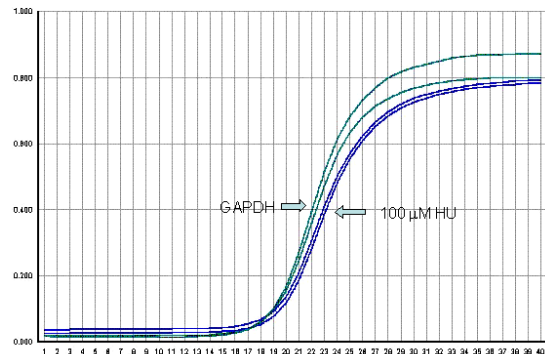
**الف**



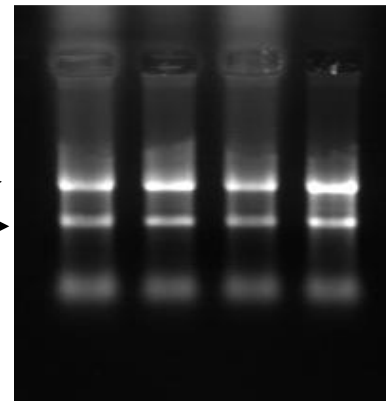
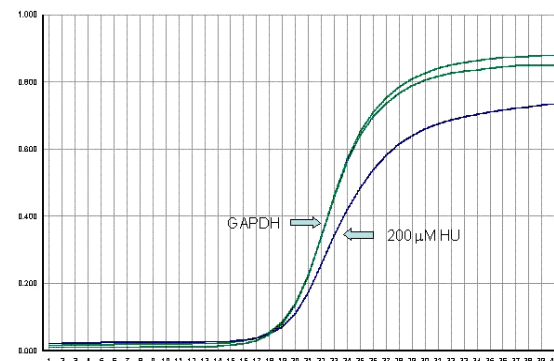
**ب**



**ج**



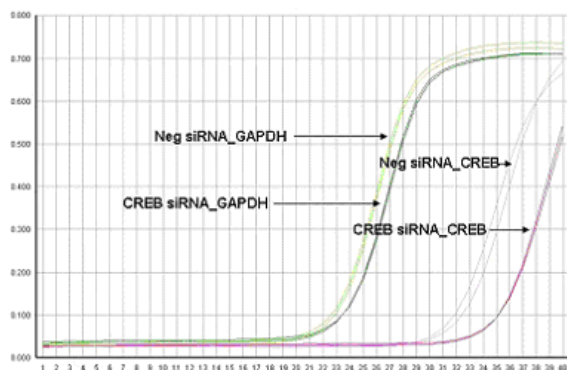
**د**



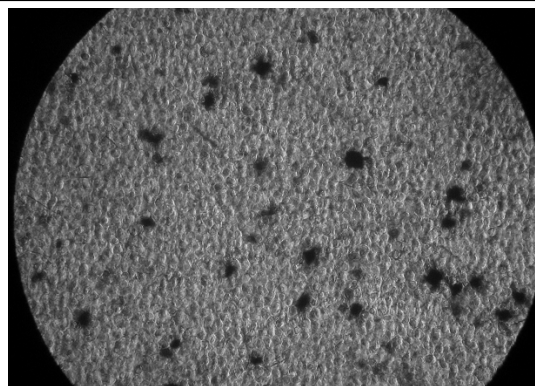
**شکل ۱-** بررسی RNA تخلیص شده از سلول‌های K562 کنترل (C) و سلول‌های القا شده با ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره در ژل آگارز ۱ درصد.

در شکل ۲ گراف‌های حاصل از Real-time PCR میزان القای ژن  $\gamma$ -گلوبین را با غلظت‌های کنترل، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره را نشان می‌دهد. با توجه به نتایج شکل ۲ و نمودار ۱ مشاهده می‌شود که در غلظت ۵۰ میکرومولار هیدروکسی اوره  $1/75$  برابر، غلظت ۱۰۰ میکرومولار میزان  $2/45$  برابر و ۲۰۰ میکرومولار میزان  $2/5$  برابر القا در بیان ژن  $\gamma$ -گلوبین دیده می‌شود (شکل ۲ و نمودار ۱).

**شکل ۲-** گراف‌های الف، ب، ج و د Real-time PCR به ترتیب القای ژن  $\gamma$ -گلوبین، در غلظت ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره را نشان می‌دهد.



شکل ۴ - گراف های Real time PCR مربوط به مهار ژن CREB، در سلول های K562 می باشد.

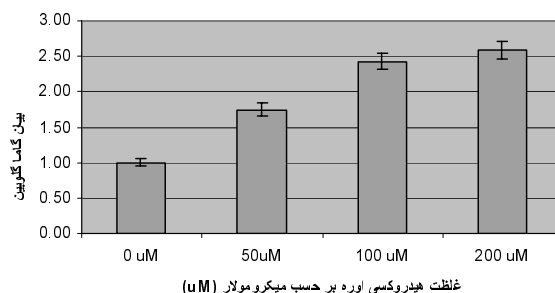


شکل ۳- سلول K562 ترانسفکت شده با پلاسمید β- pSV- Gal. سلولهای ترانسفکت شده به رنگ تیره نمایان شده اند.

### بحث

القا  $\gamma$ - گلوبین راهی موثر در درمان بیماران  $\beta$ - تالاسمی می باشد. با توجه به اینکه سلول های K562 مشابه سلول های اریثروئیدی جنینی بوده و توانایی القا شدن با داروهای مختلف مثل هیدروکسی اوره و تولید HbF را دارند، مدل مناسبی جهت مطالعات القا  $\gamma$ - گلوبین در شرایط *in vitro* می باشند (۱۶، ۱۲). یافته ها نشان می دهد که نتایج حاصل از ساخت mRNA و HbF مربوط به آن در مطالعات *in vivo* و *in vitro* با هم مرتبط بوده و به این ترتیب نتایج *in vitro* می تواند تاییدی بر پاسخ های *in vivo* باشد (۱۵). در مطالعاتی که قبلا صورت گرفته، غلظت های  $130 \mu\text{mol/L}$ ،  $100 \mu\text{mol/L}$  و  $40 \mu\text{mol/L}$  از هیدروکسی اوره جهت القا  $\gamma$ - گلوبین در سلول های مختلف خونی استفاده شده است. به این ترتیب ما جهت مطالعه القا  $\gamma$ - گلوبین در سلول های K562 با هیدروکسی اوره غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و  $200 \mu\text{mol/L}$  این دارو را بکار بردیم. با توجه به اینکه داروی هیدروکسی اوره اثر سمی بر روی رشد سلول ها دارد، تعیین کمترین مقدار هیدروکسی اوره که بیشترین القا را بر روی بیان ژن  $\gamma$ - گلوبین را در سلول ها داشته باشد، ضروری است. نتایج حاصل از Relative Real-time PCR کمی نشان داد که در غلظت های ۱۰۰ و  $200 \mu\text{mol/L}$  از هیدروکسی اوره، بیان ژن  $\gamma$ - گلوبین تا ۲/۵ برابر افزایش می یابد. به این ترتیب می توان با بکارگیری غلظت ۱۰۰ میکرومولار از این دارو، بیان ژن  $\gamma$ - گلوبین را به میزانی مشابه با  $200 \mu\text{mol/L}$  هیدروکسی اوره القا نمود. در مقایسه با روش Real-time PCR، روش نورترن بلاتینگ از دقت کمتری برخوردار است و نمی توان به طور دقیق به میزان القا بیان ژن  $\gamma$ - گلوبین پی برد. در حالی که روش Relative Real time PCR میزان بیان

تصویری از میزان ترانسفکشن سلول های K562 در شکل ۳ آمده است. با شمارش سلول های ترانسفکت شده با پلاسمید pSV-  $\beta$ - Gal، میزان کارایی ترانسفکشن بررسی گردید. تعداد سلول های آبی رنگ نمایانگر میزان ترانسفکشن می باشد. در رابطه با سلول های K562، ۴۰-۳۵ درصد سلول ها آبی رنگ بودند. آزمایشات سه بار تکرار شدند و در هر سه مورد کارایی ترانسفکشن در همین حدود بود. تعدادی سلول آبی کم رنگ هم مشاهده گردید که این حاکی از آن است این سلول ها ترانسفکت شده اند و در مقایسه با سلول های پررنگ میزان بیان ژن  $\beta$ - گالاکتوزیداز کم بوده است (شکل ۳). مقدار RNA های سلول K562 ترانسفکت شده با Negative siRNA و CREB siRNA به ترتیب ۹۰۰ و  $1300$  میکروگرم در میلی لیتر بود. میزان جذب نوری در  $260/280$  در نمونه های RNA فوق  $1/8-1/9$  بود و RNA های استخراج شده از کیفیت بالایی برخوردار بودند. اندازه گیری مهار بیان ژن کاندیدای مسیر هیدروکسی اوره (CREB)، در کنار یک ژن آندوژنوس GAPDH به عنوان کنترل داخلی صورت گرفته است. همچنین آزمایشات به صورت دوتایی (Duplicate) انجام گردید. (شکل ۴).



نمودار ۱- مقایسه میزان القا ژن  $\gamma$ - گلوبین سلول K562 با غلظت های ۵۰، ۱۰۰ و  $200 \mu\text{mol/L}$  هیدروکسی اوره را نشان می دهد.

موثر به سلول و مهار کارآمد آن می‌باشد. با استفاده از روش Lipofectamine 2000 ملکول‌های siRNA با میزان ترانسفکشن بالا وارد سلول‌های K562 شدند (۲۵). ملکول CREB siRNA مورد استفاده در این تحقیق موجب مهار بیان ژن CREB به میزان ۷۹/۵ درصد گردید. به این ترتیب در مطالعات آینده می‌توان از این siRNA کارآمد جهت بررسی عملکرد پروتئین CREB در مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره در سلول‌های K562 استفاده نمود.

### تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات اساتید و پرسنل محترم مرکز تحقیقات ژنتیک دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی تهران که در به انجام رساندن این تحقیق بر گرفته از پایان نامه کمک کردن صمیمانه سپاسگزاری می‌شود.

ژن را به طور دقیق نمایان می‌کند و روشی مطمئن جهت مطالعه بیان ژن‌هاست. یافته‌های ما، غلظت بهینه را جهت القا ژن  $\gamma$ -گلوبین در سلول‌های K562 نشان داد. از طرف دیگر، با توجه به اینکه در زمینه مسیر عملکردی هیدروکسی اوره در القا ژن  $\gamma$ -گلوبین اطلاعات زیادی در دسترس نمی‌باشد، شناسایی پروتئین‌های پایین دست مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره می‌تواند کمک زیادی در بهبود درمان بیماران مبتلا به  $\beta$ -تالاسمی و آنمی داسی شکل ارائه دهد. یکی از راه‌های مطالعه مسیر عملکردی داروها، استفاده از تکنولوژی siRNA می‌باشد (۲۶). ملکول‌های siRNA از این جهت که به طور اختصاصی بیان ژن هدف را در مرحله پس از رونویسی مهار می‌کنند، مورد توجه می‌باشند (۲۶). در قسمت دوم این تحقیق siRNA ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره یعنی CREB بر اساس معیارهای Reynolds و همکارانش، طراحی گردید (۲۴). از موارد مهم در بکارگیری siRNA، ورود

### REFERENCES

1. Rund D, Rachmilewitz E.  $\beta$ -Thalassemia. N Engl J Med 2005; 353:1135-46.
2. Higgs DR, Thein SL, Woods WG. The molecular pathology of the thalassaemias. In: Weatherall DJ, Clegg B, eds. The thalassaemia syndromes. 4<sup>th</sup> ed. Oxford, England: Blackwell Science; 2001; 133-91.
3. Perrine S. Fetal globin induction-Can it cure  $\beta$ -thalassemia. Hematology 2005; 21:38-44.
4. Steinberg MH, Rodgers GP. Pharmacologic modulation of fetal hemoglobin. Medicine 2001; 80:328-44.
5. Witt O, monkemeyer S, Ronndaahl G, Erdlenbruch B, Reinhardt D, Kanbach K. Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. Blood 2003; 101:2001-2007.
6. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. Blood 2006; 107:435-43.
7. Bank A. Understanding globin regulation in  $\beta$ -thalassemia: it's as simple as  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ . J Clin Invest 2005; 115:1470-73.
8. Cao H, Stamatoyannopoulos G, Jung M. Induction of human  $\gamma$  globin gene expression by histone deacetylase inhibitors. Blood 2004; 103:701-709.
9. Iyama WE, Adunyah SE, Fasold H, Horiuchi K, Baliga S, Frempong KO, et al. Combined use of nonmyelosuppressive nitrosourea analogues with hydroxyurea in the induction of F-cell production in human erythroleukemic cell line. Experiment Hematol 2003; 31:592-600.
10. Hsiao CH, Li W, Lou TF, Baliga BS, Pace BS. Fetal hemoglobin induction by histone deacetylase inhibitors involves generation of reactive oxygen species. Experiment Hematol 2006; 34:264-73.
11. 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; 106:3256-63.
12. Canedo AD, Chies JAB, Nardi NB. Induction of fetal haemoglobin expression in erythroid cells-A model based on iron availability signaling. Med Hypothes 2005; 65:932-36.
13. Fibach BE, Burke LP, Schechter AN, Noguchi CT, Rodgers GP. Hydroxyurea increases fetal hemoglobin in cultured erythroid cells derived from normal individuals and patients with sickle cell anemia or  $\beta$ -thalassemia. Blood 1993; 81:1630-35.
14. Keefer JR, Schneidereith TA, Mays A, Purvis SH, Dover GJ, Smith KD, et al. Role of cyclic nucleotides in fetal hemoglobin induction in cultured CD34+ cells. Experiment Hematol 2006; 34:1150-60.
15. Watanapokas in Y, Chuncharunee S, Sanmund D, Kongnium W, Winichagoon P, Rodgers G P. In vivo and in vitro studies of fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in  $\beta$ -thalassemia/hemoglobin E patients. Experiment Hematol 2005; 33:1486-92.

16. Woessmann W, Zwanzger D, Borkhardt A. Erk signaling pathway is differentially involved in erythroid differentiation of K562 cells depending on time and the inducing agent. *Cell Biol Int* 2004; 28:403-10.
17. Wang M, Tang D, Liu W, Chin K, Zhu J, Fibach E. Hydroxyurea exerts bi-modal dose-dependent effects on erythropoiesis in human cultured erythroid cells via distinct pathways. *Br J Haematol* 2002; 35:1098-105.
18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T, eds. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3<sup>rd</sup> ed. U.S.A: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
19. Puissant C, Houdbine L. An improvement of the single of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate phenolchloroform extraction. *Biotechnique* 1991; 8:148-49.
20. Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; 25:169-93.
21. Smith RD, Li J, Noguchi CT, Schechter AN. Quantitative PCR analysis of HbF inducers in primary human adult erythroid cells. *Blood* 2000; 95:863-69.
22. Erard F, Dean A, Schechter AN. Inhibitors of cell division reversibly modify hemoglobin concentration in human erythroleukemia K562 cells. *Blood* 1981; 58:1236-39.
23. Kubista M, Andrade JM, Bengtsson M, Forootan A, Jona'k J, Lind K, et al. The real-time polymerase chainreaction. *Mol Aspects Med* 2006; 27:95–125.
24. Reynolds A, Leake D, Boese Q, Scaringe S, Marshall W, Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat Biotechnol* 2004; 22:326-30.
25. Dallby B, Cates Sh, Harris A, Ohki EC, Tilkins LM, Price PJ. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: primary neurons, siRNA, and high-throughput applications. *Methods* 2003; 33:95-103.
26. Dorsett Y, Tuschl T. siRNA: application in functional genomics and potential as therapeutics. *Nature* 2004; 3:318-28.
27. Shi Y, Venkataraman SL, Dodson GE, Mabb AM, LeBlanc S, Tibbetts RS. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101:5893-903.