Original Article

مجله علوم پزشکی دانشگاه آزاد اسلامی
دوره ۱۸، شماره ۲، تابستان ۸۷، صفحات ۷۵ تا ۸۰

بررسی غلظت‌هایDMSO بر بیان ژن گاماگلوبین در سلول‌های هیبرید Hu11

علی محمد اصغریان[۱]، مهدی بنان[۲]، زهرا دیلمی[۱]، جلال قره سوران[۳]، ساغر قاسمی[۴]، فرخنده بهجتی[۲]، غلامرضا جوادی[۵]، کیمیا کهریزی[۶]، حسین نجم‌آبادی[۷]

[۱] دانشجوی PhD سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۲] استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
[۳] دانشجوی کارشناسی ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
[۴] کارشناس ارشد ژنتیک، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
[۵] دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران
[۶] دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
[۷] استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

چکیده

سابقه و هدف: *بررسی اثر موتاسیون‌ها در تولید هموگلوبین و شناخت مکانیسم‌های تولید و تبدیل گاما به بتاگلوبین در درمان بتاتالاسمی مهم می‌باشد. رده سلولی هیبرید Hu11 یکی از رده‌های سلولی مناسب در این زمینه است که دارای لوکوس بتاگلوبین انسانی در داخل سلول‌های اریتروئید موشی است. سلول‌های MEL در حضور دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO) تمایز می‌یابند، با این حال میزان القای گاماگلوبین در سلول‌های Hu11 در حضور دی‌متیل‌سولفاکساید هنوز تعیین نشده است. در تحقیق حاضر اثر غلظت‌های متفاوت DMSO بربیان ژن گاماگلوبین انسانی در رده سلول‌های Hu11 بررسی شده است.*

روش بررسی: *در این مطالعه، سلول‌های Hu11 در غلظت‌های متفاوت از DMSO کشت داده شد و میزان تولید هموگلوبین و بیان ژن گاماگلوبین از طریق Real-time PCR ارزیابی گردید.*

یافته‌ها: *تولید هموگلوبین در سلول‌های Hu11 در غلظت‌های ۱ و۲ درصد DMSO به ترتیب ۵ و ۱۰ برابر افزایش یافت. هم‌چنین در آزمایش Real-time PCR میزان بیان ژن گاماگلوبین در این غلظت‌های DMSO به ترتیب ۶۶ و ۲۹۶ درصد افزایش یافت.*

نتیجه‌گیری: *سلول‌های هیبرید Hu11 در حضور DMSO روند تمایزی را طی می‌کنند و میزان هموگلوبین و بیان ژن گاماگلوبین در آنها افزایش می‌یابد. این سلول‌ها می توانند در مطالعاتی که به منظور افزایش بیان ژن گاما در ژن درمانی بتا تالاسمی صورت می‌پذیرد مفید باشند.*

واژگان کلیدی: *سلول‌های Hu11، DMSO، هموگلوبین، ژن گاماگلوبین.*

مقدمه

هموگلوبین پروتئینی است کـه از دو زنجیـره آلفـا و دو زنجیـره شبه بتا ($\alpha_2\beta_2$) تشکیل شـده اسـت (۱،۲). در روی کروموزوم ۱۱ انسانی لوکوس ژنی بتاگلوبین وجود دارد که حـاوی نـواحی کد کننده ژن‌های شبه بتاگلوبین انسانی مـی‌باشـد. در انـسان ژن‌های شبه بتاگلوبین در مراحل مختلف زندگی بیان می‌شوند. ژن‌هـای e در دوران جنینـی، گامـاگلوبین ($A\gamma$ و $G\gamma$) در دوران جنینی- نوزادی (تا هفته ۱۲ بعد از تولـد) و ژن‌هـای δ و β گلوبین در اواخر دوران نوزادی به بعد بیان می‌شوند (۵-۱).

رده سـلول‌هـای Hu11 نـوعی سـلول هیبریـدومای حاصـل از سلول‌های فیبروبلاستی یا لنفوبلاستی انسانی با سلول‌های MEL

آدرس نویسنده مسئول: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست شناسی، علی محمد اصغریان (**email**: Mehranasgharian@yahoo.com)
تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۸۶/۱۱/۱۰
تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۸۷/۳/۲۵

(mouse erythroleukemia) است. به عبارت دیگر آنها سلول موشی حاوی کروموزوم ۱۱ انسانی هستند (۸-۶).

سلول‌های MEL در حضور دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO) تمایز یافته و تولید هموگلوبین می‌کنند و میزان بیان ژن‌های گلوبین آنها افزایش می‌یابد. در نتیجه رده‌های سلولی Hu11 و MEL می‌توانند در مطالعات مولکولی گلوبین و مکانیسم‌های تولید آن به عنوان یک مدل سیستم سلولی مناسب مد نظر باشند (۸-۶). نکته جالب توجه این است که حتی زمانی که سلول‌های غیراریتروئیدی انسانی (سلول‌های فیبروبلاستی دیپلوئیدی) با سلول‌های MEL الحاق شوند، فعال شدن ژن‌های گلوبین انسانی مشاهده می‌شود. حتی میزان بیان ژن‌های گلوبین انسانی در این موارد قابل مقایسه با بیان ژن‌های گلوبین موشی است (۱۰-۶).

از خصوصیات سلول‌های Hu11 این است که مانند سلول‌های MEL تمایزشان در اثر DMSO القا شده و مقدار هموگلوبین آنها افزایش می‌یابد. این سلول‌ها بتاگلوبین را بیان می‌کنند ولی مقدار بیان mRNA گاماگلوبین که مختص سلول‌های انسانی است، در آنها کم است (۸-۶).

سلول‌هایHu11 به موش‌های تراریختی که دارای ژن‌های بتاگلوبین انسانی هستند، شباهت زیادی دارند. امروزه از این حیوانات در مطالعات سوئیچینگ مولکولی گاما به بتاگلوبین و نیز بررسی موتاسیون‌هایی که بروی بیان ژن گلوبین انسانی اثر می گذارند، استفاده فراوانی می‌شود (۱۶-۹).

هدف از انجام این تحقیق بررسی دقیق میزان افزایش بیان ژن گاماگلوبین در حضور DMSO در سلول‌های Hu11 بود. نتایج این تحقیق می‌تواند در مطالعاتی که به منظور افزایش بیان ژن گاماگلوبین صورت می‌گیرد مهم باشد.

مواد و روشها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی اثر غلظت‌های مختلف دی‌متیل‌سولفاکساید (DMSO) بر بیان ژن گاماگلوبین انسانی در رده سلولی هیبرید Hu11 مورد بررسی قرار گرفت.

سلول‌های Hu11 (تهیه شده از دانشگاه Erasmus هلند) در محیط DMEM (Gibco) همراه با FBS ده درصد (fetal bovine serum) (Biosera) و ۱ درصد از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین-استرپتوماسین (Biosera) در انکوباتور CO_2 دار با ۹۵ درصد رطوبت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گرادکشت داده شدند تا زمانی که سلول‌ها به تعداد 10^6 در هر میلی‌لیتر رسیدند (۹-۶).

به منظور تایید اینکه سلول‌های Hu11 دارای کروموزوم شماره۱۱ می‌باشند، آنالیز کاریوتایپینگ بصورت زیر انجام شد: سلول‌های Hu11 در محیط کشت DMEM کامل (همراه با سرم) کشت داده شدند تا تعداد سلول‌ها به 10^6 در هر میلی‌لیتر برسد (۱۷). سپس ۶۰۰ میکرولیتر تایمیدین (از محلول ۱۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) به محیط افزوده شد و ظرف کشت ۲۴ ساعت در گرمخانه ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. محیط کشت را به مدت ۱۰ دقیقه در rpm ۱۰۰۰ سانتریفوژ کرده و رسوب حاصل دو بار با ده میلی لیتر محلول PBS (phosphate buffered saline) شستشو داده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر محیط کامل به سلول ها افزوده شده و به مدت ۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد (۱۷). سپس ۲۰۰ میکرولیترکلسیمید (از محلول پایه lμ/ml ۱۰) به سلول‌ها اضافه و مجددا به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد گرمادهی شد. بعد از سانتریفوژ به مدت۱۰ دقیقه با rpm۱۰۰۰ به رسوب حاصل ۱۳ میلی لیتر محلول کلرید کلسیم ۰/۰۵ مولار اضافه و بمدت ۱۵ دقیقه در حمام آب گرم ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. سپس۱۳ میلی‌لیتر از محلول تثبیت کننده (شامل سه قسمت متانل با یک قسمت از اسید استیک) اضافه شده و مدت ۳۰ دقیقه در یخ قرار داده شد (۱۷). در مرحله آخر سلول‌ها چندین بار با محلول فیکساتیو شستشو و بمدت یک روز در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند. روز بعد سلولها دو بار با فیکساتیو شستشو داده شدند و سپس ۲ میلی‌لیتر از محلول تثبیت کننده تازه به سلول‌ها اضافه گردید (۱۷).

با استفاده از پی‌پت یک قطره از سوسپانسیون سلولی برداشته شده و بر سطح یک لام تمیز ریخته شد. لام بمدت ۵ الی ۱۰ ثانیه روی بخار قرار داده شد و سپس در درجه حرارت آزمایشگاه خشک گردید. لام های تهیه شده ابتدا ۱۰۰ ثانیه در محلول پانکراتین (محلول۵ درصد پانکراتین در بافر Hanks) و سپس با محلول سالین همراه با FBS ۲ درصد شستشو داده شدند. در مرحله آخر لام‌ها را در محلول گیمسای ۵ درصد قرار داده شده و سپس با آب شستشو و توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند (۱۷).

جهت بررسی اثر DMSO در میزان بیان ژن گاماگلوبین در سلول‌های Hu11، این سلولها در سه فلاسک مجزا به‌ترتیب شامل محیط کشت کامل بدون DMSO بعنوان کنترل (شماره ۱)، محیط کشت کامل با DMSO ۱ درصد (شماره ۲) و محیط کشت کامل با DMSO ۲ درصد (شماره ۳) کشت داده

شدند. کلیه فلاسک‌ها به مدت ۴ روز در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شدند.

جهت بررسی و تعیین در صد سلول‌های زنده Hu11 رنگ‌آمیزی تریپان بلو انجام شد (۱۸). بدین منظور درشرایط استریل مقدار معینی از سلول‌های Hu11 از فلاسک ۱ و۲ و۳ برداشته شده و هم حجم آن تریپان بلو ۰/۵ درصد (شرکت Euroclone) اضافه شد. با استفاده از لام شمارش و میکروسکوپ نوری، شمارش سلول‌های زنده انجام شد. سلول‌های مرده رنگ تریپان‌بلو را جذب و آبی می‌شوند، در حالی که سلول‌های زنده این رنگ را جذب نمی‌کنند.

برای تعیین اثر DMSO در میزان هموگلوبین سلول‌های Hu11 از روش رنگ‌آمیزی بنزیدین استفاده گردید (۱۲،۱۳). محلول ۴ درصد بنزیدین دی‌هیدروکلراید (Sigma) که در اسید استیک گلاسیال(Merck) ۳ درصد و هیدروژن پراکسید ۱ درصد حل شده بود، تهیه گردید. به اندازه هم حجم محلول تهیه شده، سلول‌های Hu11 (نسبت۱:۱) از فلاسک‌های ۱ و۲ و ۳ برداشته و با محلول بنزیدین دی‌هیدروکلراید مخلوط گردید. سپس با استفاده از لام نئوبار و میکروسکوپ نوری سلول‌هایی که رنگ آبی گرفتند، شمارش شدند.

جهت بررسی اثر DMSO در القای بیان ژن گاماگلوبین، از سلول‌های فلاسک ۱ و ۲ و ۳ استخراج RNA انجام شد (۱۸،۱۹). سلول‌های Hu11 با سانتریفوژ در ۱۰۰۰rpm رسوب‌دهی شدند. به هر کدام از رسوب‌های حاصل از سه فلاسک مقدار یک میلی‌لیتر از محلول RNX-Plus (CinaGen) اضافه شد و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند.

فاز رویی انتخاب شد و هم حجم آن ایزوپروپانل (Merck) اضافه و کاملا مخلوط گردید و سپس در دور ۱۳۰۰۰rpm سانتریفوژ شدند. به رسوب‌های حاصل ۱ سی‌سی اتانل (Merck) سرد اضافه و سپس در ۷۰۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. در انتها رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل گردید (۱۸،۱۹). جهت تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA، علاوه بر اندازه‌گیری جذب نوری توسط فتومتر(اپندورف)، در ژل الکتروفورز با آگاروز ۱ درصد نیز بررسی شد.

یک میکروگرم از RNA خالص‌سازی شده جهت سنتزcDNA با استفاده از کیت RT-PCR QuantiTect Reverse transcription (Qiagene) به کار رفت (۱۸).

به منظور بررسی میزان بیان ژن گاماگلوبین از کیت QuantiFast SYBR Green (Qiagene) و دستگاه Techne مدل Quantica و پرایمرهای Real-time PCR ژن گاماگلوبین با توالی زیر استفاده شد:

Forward: GGGAAGGCTCCTGGTTGTCTA
Reverse: TCTTGCCATGTGCCTTGACTT

دما و شرایط انجام Real-time PCR بصورت زیر بود: گرمادهی اولیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵دقیقه که طی این مرحله Hot star DNA Taq polymerase فعال می‌شود. در هر چرخه، دمای ۹۴ درجه سانتی‌گراد بمدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد بمدت ۳۰ ثانیه بود که طی ۳۵ چرخه PCR انجام شد (۲۰).

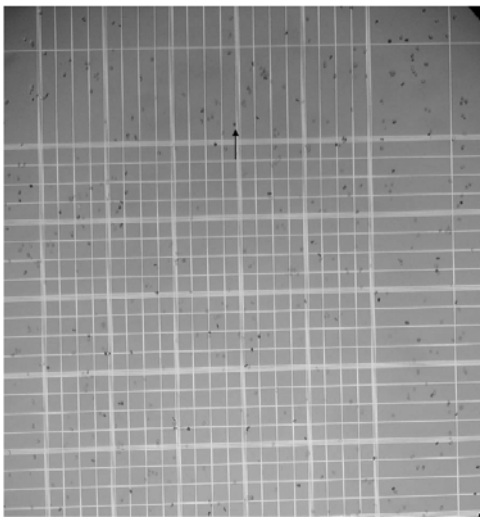
یافته‌ها

تصویری از کاریوتایپینگ در شکل ۱ آمده است که در آن کروموزوم ۱۱ انسانی با فلش نشان داده شده است. همانطور که در شکل ۱ آمده یک کروموزوم ۱۱ انسانی در میان کروموزم سلولهای MEL دیده می شود. نتایج نشان دادکه بیش از ۹۰ ٪ از سلول های Hu11 دارای کروموزوم ۱۱ انسانی بودند.



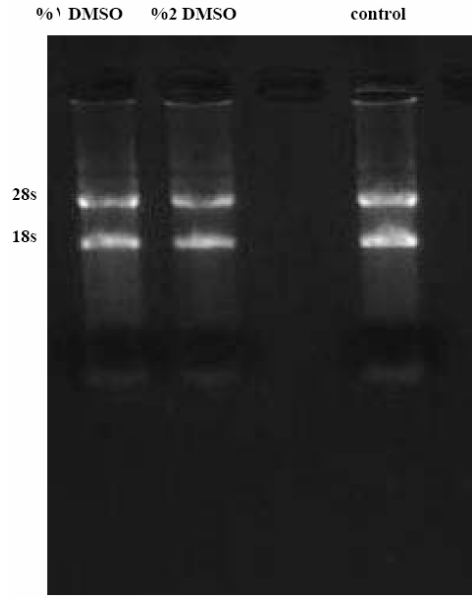
شکل ۱- نتیجه کاریوتایپینگ سلولهای HU11.
کروموزومی که با فلش نشان داده شده کروموزوم ۱۱ انسانی است که در میان کروموزوم‌های موشی قرار دارد.

در شکل ۲ سلول‌هایی که در رنگ‌آمیزی بنزیدین رنگ آبی گرفتند، نشان داده شده است. میزان رنگ‌آمیزی در سلول‌هایی که با DMSO ۱ و ۲ درصد تیمار شدند در مقایسه با نمونه کنترل، به ترتیب ۵ و ۱۰ برابر افزایش را نشان داد.



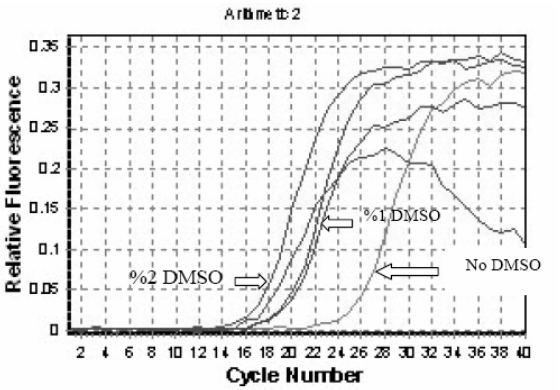
شکل ۲- سلولهای HU11 پس از القا توسط DMSO یک درصد. در رنگ‌آمیزی با بنزیدین سلول‌های HU11 رنگ آبی به خود میگیرند که محتوای هموگلوبین سلول‌ها را نشان می دهد.

مقدار RNA در گروه‌های کنترل، DSMA ۱ درصد و DSMA ۲ درصد به ترتیب ۱۱۹۱، ۱۲۸۳ و ۱۷۶۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بود. میزان جذب نوری در ۲۶۰/۲۸۰ در گروه کنترل ۱/۸۶، در گروه DSMA ۱ درصد ۱/۸ و DSMA ۲ درصد ۱/۹۸ بود. میزان جذب نوری در ۲۶۰/۲۸۰ و وجود باندهای ۲۸s و ۱۸s نشان می‌دهد که RNAهای استخراج شده از هر سه فلاسک از کیفیت مطلوبی برخوردار بوده و RNA تخریب نشده است (شکل ۳).



شکل ۳- RNA تخلیص شده از سلول‌های کنترل و سلولهای تیمار شده با DMSO ۱ و۲ ٪ ، در ژل آگاروز ۱ درصد نشان داده شده است.

شکل ۴ گرافهای Real time PCR مربوط القای ژن گاماگلوبین در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد DMSO و نمونه کنترل بدون DMSO نشان می‌دهد. میزان بیان ژن گاماگلوبین در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد DMSO نسبت به نمونه کنترل به ترتیب به میزان ۶۸ و۲۹۶ درصد افزایش داشت.



شکل۴- گرافهای Real time PCR مربوط القای ژن گاماگلوبین در غلظت‌های ۱ و ۲ درصد DMSO. و نمونه کنترل بدون DMSO.

بحث

مطالعات ژن‌های گلوبین انسانی بدلیل محدودیت دستیابی به سلول‌های اریتروئیدی اولیه خصوصا از افرادی که دارای موتاسیون موثر در بیان ژن بتاگلوبین‌اند، در سطح عملکردی با محدودیت همراه است (۹،۷،۱۳). در صورت دستیابی به رده‌های سلولی بیان کننده ژن‌های گلوبین انسانی، انجام این مطالعات آسان خواهد شد. سلول‌های MEL دارای لوکوس بتاگلوبین از رده‌های سلولی هستند که می‌توانند در مطالعات تنظیم بیان ژن گاماگلوبین در محیط سلولی بالغ استفاده شوند (۱۰-۶، ۱۴، ۱۵).

مطالعات پیشنهاد می‌کند که این رده‌های سلولی، مدلی مناسب به منظور انجام این مطالعات می‌باشند. سلول‌های MEL حاوی بتالوکوس انسانی شباهت زیادی به سلول‌های اریتروئیدی دارند (۱۰،۱۶). این سلول‌ها در ابتدا ژن‌های گاما و اپسیلون گلوبین جنینی و سپس ژن‌های بتاگلوبین را بیان می‌کنند. بعد از ۱۰ الی ۲۰ هفته از کشت این سلول‌ها، بیان ژن‌های بتاگلوبین نیز در آنها فعال می‌شود. در نتیجه از لحاظ الگوی بیان ژن گلوبین، سلول‌های MEL به سلول‌های اریتروئیدی بالغ شباهت زیادی دارند (۱۰،۱۶).

در سلول‌های بالغ انسانی در اثر اریتروپوئیتین(EPO) میزان بیان ژن بتاگلوبین افزایش می‌یابد (۲۱،۲۲). در سلول‌های MEL دارای کروموزوم ۱۱ انسانی نیز مشابه چنین حالتی با DMSO مشاهده می‌گردد و میزان بیان ژن بتاگلوبین افزایش می‌یابد (۱۶-۱۴، ۹-۶).

نتایج رنگ‌آمیزی بنزیدین نشان داده زمانی که سلول‌های Hu11 در معرض DMSO ۱ و ۲ درصد قرار می گیرند، میزان محتوای هموگلوبین در آنها دو برابر می‌گردد. این یافته با نتایج حاصل از تحقیقات Pyati و همکارانش مطابقت دارد (۷). نتایج حاصل از آزمایشات Real-time PCR نشان داده زمانی که سلول‌های Hu11 در معرض غلظت‌های ۱ و ۲ درصد DMSO قرار می‌گیرند، بیان ژن گاماگلوبین در مقایسه با نمونه کنترل به ترتیب به میزان ۵۵ و ۲۹۶ درصد افزایش می‌یابد (شکل۴). القای ژن گاماگلوبین در سلول‌های هیبرید MEL با لنفوسیت یا فیبروبلاست توسط zavondy و همکارانش بررسی شد، ولی میزان دقیق القای ژن گاماگلوبین در حضور DMSO تعیین نگردید (۸).

در این تحقیق به منظور بررسی میزان بیان ژن گاماگلوبین در سلول‌های Hu11 در حضور DMSO از روش دقیق Real-time PCR استفاده شد. در Real-time PCR مقدار محصول PCR در حین مراحل تکثیر از طریق رنگ‌های فلورسنتی که متناسب با مقدار محصول تکثیر شده می‌باشد، دقیقا قابل ارزیابی است (۲۰). در ادامه نشان دادیم که در سلول‌های Hu11 در اثرDMSO میزان بیان ژن گاماگلوبین افزایش قابل توجهی می‌یابد. بنابراین سلول‌های Hu11 می‌توانند در مطالعات مولکولی تنظیم بیان ژن‌های گاماگلوبین بعنوان مدل سلولی مناسب استفاده شوند. بیان ژن هموگلوبین جنینی (گاماگلوبین) در دوران جنینی فعال است، ولی در دوران بلوغ بیانش کاهش می یابد (۴-۱). یکی از روش‌های درمانی برای بهبود بیماران مبتلا به کم‌خونی ناشی از سلول‌های داسی شکل و بتاتالاسمی، افزایش هموگلوبین جنینی (گاماگلوبین) است (۴-۱). این یافته‌ها اولین بار از بیمارن HPFH (Hereditary persistence of fetal hemoglobin) حاصل شد. مبتلایان HPFH معمولا در پروموتر گاماگلوبین موتاسیون‌هایی دارند و این موتاسیون‌ها باعث شده که در این افراد میزان گاماگلوبین در دوران بلوغ افزایش یابد و از خود آنمی خفیفی نشان دهند (۴-۱). این نتایج بینش جدیدی در درمان بتاتالاسمی ایجاد کرده است و فعال شدن بیان ژن گاماگلوبین در دوران بلوغ می‌تواند از اثرات این بیماری‌ها بکاهد (۴-۱). از روش‌های جدیدی که می‌تواند در ژن‌درمانی بتاتالاسمی موثر باشد، بر پایه استفاده از مولکول‌های siRNA (small interference RNA) است. siRNA مولکول‌های کوچک دورشته‌ای‌اند که می‌توانند با تخریب mRNA بطور اختصاصی سبب مهار بیان ژن‌های خاص شوند (۲۱). پیشنهاد شده که مولکول‌های siRNA که رپرسورهای ژن گاما گلوبین را هدف قرار می‌دهند یا کلا مولکول‌های siRNA که سبب افزایش بیان ژن گاماگلوبین می شوند را می‌توان بعنوان یک روش درمانی مد نظر داشت (۱). در مجموع جهت انجام این تحقیقات و بررسی‌هایی که به منظور افزایش بیان ژن گاماگلوبین در جهت بهبود و درمان بتاتالاسمی و آنمی ناشی از سلول‌های داسی شکل انجام می‌پذیرد، همواره به یک مدل سلولی مناسب که در آن ژن گاماگلوبین بیان داشته باشد نیاز است. در مطالعه حاضر میزان افزایش بیان ژن گاماگلوبین در سلول‌های Hu11 در غلظت‌های مختلف DMSO بصورت دقیق تعیین گشت و معلوم شد که ژن گاماگلوبین در سلول‌های Hu11 از بیان قابل‌توجهی برخودار بوده و می تواند بعنوان یک سلول مدل مناسب در مطالعات مولکولی گاماگلوبین بکار گرفته شود.

REFERENCES

1. Bank A. Regulation of human fetal hemoglobin: new players, new complexities. Blood 2006;107:435-43.
2. Bank A. Understanding globin regulation in β-thalassemia: it's as simple as α, β, γ, δ. J Clin Invest 2005;115:1470-73.
3. Perrine S. Fetal globin induction--Can it cure β- thalassemia? Hematology Am Soc Hematol Educ Program. 2005:38-44.
4. Harju S, Mcqueen KJ, Peterson KR. Chromatin structure and control of β-Like globin gene switching. Exp Biol Med (Maywood) 2002;227:683-700.
5. Choi OR, Engel JD. Developmental regulation of beta-globin gene switching. Cell 1988;55:17-26.
6. Nandi A, Roginski R, Gregg R, Smithies O, Skoultchi A. Regulated expression of genes inserted at the human chromosomal β-globin locus by homologous recombination. Proc Natl Acad Sci 1988;85:3845-49.
7. Pyati J, Kucherlapati R, Skoultchi A. Activation of human β-globin genes from nonerythroid cells by fusion with murine erythroid leukemia cells. Proc Natl Acad Sic 1980;77:3435-39.

8. Zavodny PJ, Roginski RS, Skoultchi AI. Regulated expression of human globin genes and flanking DNA in mouse erythroleukemia--human cell hybrids. Prog Clin Biol Res 1983;134:53-62.

9. Ganglia S, SkoultchiO A.I. Absolute Rates of Globin Gene Transcription and mRNA Formation during Differentiation of Cultured Mouse Erythroleukemia Cells. J Biol Chem 1985;260:12167-73.

10. Peterson KR, Zitnik G, Huxley C, Lowery CH, Gnirke A, Leppig KA, et al. Use of yeast artificial chromosomes (YACs) for studying control of gene expression: correct regulation of the genes of a human, β-globin locus YAC following transfer to mouse erythroleukemia cell lines. Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:11207-11.

11. Tuan DYH, Saloman WB, London IM, Lee DP. An erythroid-specific, developmental-stage-independent enhancer far upstream of the human β-like globin genes. Proc Natl Acad Sci 1989;86:2554-58.

12. Chen ZX, Banks J, Rifkind RA, Marks PA. Inducer-mediated commitment of murine erythroleukemia cells to differentiation: a multi-step process. Proc Natl Acad Sci USA 1982;79:471-75.

13. Razin A, Levine A, Kafri T, Agostinis, Gomi T, Cantoni G. Relationship between transient DNA hypomethylation and erythroid differentiation of murine erythroleukemia cells. Proc Natl Acad Sci 1988;85:9003-9006.

14. Sadelain M, Wang CH, Antoniou M, Grosveld F, Mulligan RC. Generation of a high-titer retroviral vector capable of expressing high levels of the human β-globin gene. Proc Natl Acad Sci USA 1995;92:6728-32.

15. Buzina A, Aladjem M, Kolman J, Wahl G, Ellis J. Initiation of DNA replication at the human β-globin 3' enhancer. Nucleic Acids Res 2005;33:4412-24

16. Morley BBJ, Abbott CA, Wood WG. Regulation of human fetal and adult globin genes in mouse erythroleukemia cells. Blood 1991;78:1355-63.

17. Behjati F. Laboratory manuals in human cytogenetics. Tehran: Social Welfare and Rehabilitation University Publication; 2007.

18. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. . 3rd ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

19. Puissant C, Houdbine L. An improvement of the single of RNA isolation by Acid Guanidium thiocyanate Phenol-chloroform Extraction. Biothech 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. Bantounas I, Phylactou LA, Uney JB. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. J Mol Endocrinol 2004;33:545-57.