

بررسی میزان القای ژن β -گلوبین با غلظت‌های مختلف هیدروکسی اوره در رده سلولی K562 با هدف درمان بتا تالاسمی

زهرا دیلمی خیابانی^۱، مهدی بنان^۲، علی محمد اصغریان^۳، جلال قره سوران^۴، غلامرضا جوادی^۵
کیمیا کهریزی^۶، حسین نجم آبادی^۷

^۱ دانشجوی دکترای سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

^۲ استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

^۳ مریبی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تکابن، تکابن، ایران

^۴ مریبی، کارشناس ارشد ژنتیک انسانی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۵ دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، تهران، ایران

^۶ دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی، تهران، ایران

^۷ 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 β -گلوبین به منظور درمان β -تالاسمی گردد. در این مطالعه اثر غلظت‌های مختلف این دارو بر میزان القای ژن β -گلوبین در سلول‌های K562 بررسی و غلظت بهینه جهت القای ژن β -گلوبین در این سلول‌ها تعیین و همچنین اثر مهاری 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 β -گلوبین و میزان مهار ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره با روش Real-time PCR اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: تیمار سلول‌های K562 با هیدروکسی اوره، بیان ژن β -گلوبین در غلظت ۵۰ میکرومولار ۱/۷۵ برابر و در غلظت ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولا رتا 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 القای ژن β -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 β -گلوبین، هیدروکسی اوره، سلول‌های K562، siRNA، Real time PCR

نامتعادل زنجیره α -گلوبین منجر به رسوب آن و در نهایت القا مرگ سلولی در اریتروblastها می‌شود (۳-۶). در انسان در مرحله قبل از تولد، هموگلوبین جنینی (HbF) که متشکل از دو جفت زنجیره به صورت ۴۲٪ می‌باشد، هموگلوبین عمدۀ را تشکیل می‌دهد (۱-۸). بعد از تولد در اثر سوئیچینگ ژن β -گلوبین خاموش شده و بیان ژن β -گلوبین صورت می‌گیرد (۳-۸). در افراد مبتلا به β -تالاسمی قبل از تولد به دلیل حضور

مقدمه

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

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 مهاری CREB siRNA در سلول‌های K562 مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

در این پژوهش تجربی سلول‌های K562 در محیط RPMI ۱۰ (Fetal Bovine Serum-Biosera) با (Biosera) درصد و یک درصد از آنتی‌بیوتیک‌های پنی‌سیلین، استریپتومایسین (Biosera) در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. تا سلول‌ها به 5×10^5 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 گرفته و در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، CO₂ 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 ۵' GGUGGAAAAUGGACUGGCC tt3' siRNA بر اساس معیارهای Reynolds و همکاران صورت گرفت (۲۴). جهت مطالعات siRNA علاوه بر siRNA 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 لیپوفکتامین با شرح ذیل آماده گردید: مقدار 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

(Adult HbA با HbF) بیماری بروز نمی‌کند و زمانی که Hb (Hb) جایگزین می‌گردد، عوارض بالینی بیماری مشاهده می‌شود (۳، ۵-۸). به این ترتیب β -تالاسمی از محدود بیماری‌هایی است که در آن ژن فعال گذرا در دوره جنینی یعنی ۷-گلوبین می‌تواند با دوباره فعال شدن، جایگزین ژن موتانت β -گلوبین گردد (۵-۸). از بین داروهای فوق هیدروکسی اوره تنها (Federal Drug Administration) FDA تصویب شده است. مطالعات نشان داده که این دارو، HbF را در بیماران مبتلا به β -تالاسمی افزایش داده و منجر به بهبود بیماران می‌گردد (۱۶، ۵-۸). از طرفی داروی هیدروکسی اوره توکسیک می‌باشد و سبب کاهش رشد سلول‌ها می‌گردد. با توجه با این موضوع، باید حداقل غلطی از این دارو که بیشترین القای بیان ژن ۷-گلوبین را منجر شود، استفاده گردد. در گزارشات منتشر شده، القای بیان ژن ۷-گلوبین در اثر هیدروکسی اوره با روش نورترن بلات نشان داده شده است، ولی تاکنون میزان القای بیان ژن ۷-گلوبین در غلطی‌های مختلف هیدروکسی اوره، با استفاده از روش Real time PCR انجام نشده است. (Mitogen activated p38MAPK protein kinase) که از سرین/ترؤنین کینازهای مهم سلول پایین دست p38MAPK می‌باشد، در اثر هیدروکسی اوره فسفریله و فعال می‌گردد. در ATF-2، CREB و CREM قرار دارند. این پروتئین‌ها در اثر فعالیت کینازی ۳۸ 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 ۷-گلوبین، در غلطت ۱۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره هم می‌توان به نتایج مشابه با غلطت ۲۰۰ میکرومولار دست یافت. به این ترتیب می‌توان در حداقل غلطت هیدروکسی اوره، حداقل القا ژن ۷-گلوبین را در سلول‌های K562 مشاهده نمود. هدف از این مطالعه، بررسی بیان ژن ۷-گلوبین در غلطی‌های مختلف هیدروکسی اوره و تعیین غلطت بهینه هیدروکسی اوره جهت القا بیان ژن ۷-گلوبین در سلول‌های K562 بود. از طرف دیگر با استفاده از تکنولوژی RNAi، میزان مهار ژن کاندیدای مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره مورد بررسی قرار گرفت. بکارگیری siRNA کارآمد با اثر مهاری بالا می‌تواند در شناسایی پروتئین‌های در گیر در مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره مفید

آن ایزو پروپانول (Merck) اضافه و کاملا مخلوط گردید و سپس به مدت ۱۵ دقیقه ۱۳۰۰ rpm سانتریفوژ شدند. به رسوپهای حاصله یک میلی لیتر تانول (Merck) سرد اضافه و سپس به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۷۸۰ rpm سانتریفوژ شدند. در انتها رسوپهای حاصله در ۵۰ میکرولیتر آب دیونیزه اتوکلاو شده حل گردید (۱۸، ۱۹). جهت تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA علاوه بر اندازه گیری جذب نوری ۲۸۰/۲۶۰ بوسیله اسپکتروفوتومتر، در ژل الکتروفورز با ۱ درصد آگارز نیز بررسی شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت QuntiTect Reverse transcription (Qiagene) انجام گرفت. بر طبق روش ذکر شده در کیت، مقدار ۱ میکرو گرم RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA استفاده گردید (۱۸).

به منظور انجام Real-time PCR و بررسی بیان ژن نمونهای cDNA به صورت ۵:۹۵ رقیق شدند. ۵ میکرولیتر از Quantifast SYBR Green PCR Kit (Qiagen) و ۱/۵ میکرولیتر از هرسه پرایمر در حجم کلی ۲۰ میکرولیتر در چاهکهای ۸ تایی با استفاده از ABI PRISM 7000 وارد واکنش شدند. برنامه واکنش شامل موارد زیر بود: گرمادهی اولیه در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ دقیقه که در این مرحله Hot start Taq DNA polymerase می شود. دمای ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، دمای ۵۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه و دمای ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ ثانیه که در طی ۳۵ چرخه PCR انجام گردید (۲۰).

نام ژن	توالی پرایمری استفاده شده
γ-globin_F	5'-GGGAAGGCTCCGGTGTCTA-3'
γ-globin_R	5'-TCTGCCATGTGCCTTGACTT-3'
CREB_F	5'-CACCTGCCATACCACTGTAA-3'
CREB_R	5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'
GAPDH_F	5'-GGTGGTCTCCTCTGACTCAACA-3'
GAPDH_R	5'-GTTGCTGTAGCCAAATTGTTGT-3'

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

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

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

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

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

iRNA و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط شده و دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا کمپلکس Lipofectamine-DNA آرامی به محیط سلول‌ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می‌شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملا پخش گردد. پلیت در انکوباتور با رطوبت ۹۵ درصد، ۵ درجه CO₂ و دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۴۸ ساعت قرار گرفتند (۲۵). جهت کنترل کارآیی ترانسفکشن، در کنار سلول‌های ترانسفکت شده با CREB pSV-β-Galactosidase نیز به داخل سلول‌ها ترانسفکت شدن. در صورت وارد شدن پلاسمید به سلول‌ها، بیان β-گالاکتوزیداز صورت می‌گیرد که با رنگ آمیزی سلول‌ها به رنگ آبی نمایان می‌شوند. رنگ آمیزی سلول‌های ترانسفکت شده با β-Gal Staining Set (Roche) با استفاده از کیت pSV-β-Gal با این کیت مشکل از Iron buffer و X-Gal 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 میکروسکوپ نوری به راحتی قابل تشخیص می‌باشند. جهت تهیه فیکساتیو PBS اضافه شده و در بن‌ماری با دمای ۳۷ درجه سانتی گراد گرم شد. جهت تهیه محلول رنگ آمیزی، ۱ واحد از X-Gal در ۱۰ واحد Iron buffer رقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملا مخلوط گردید. برای رنگ آمیزی سلول‌های سوسپانسیون K562، رسوپ سلولی در ۱۰ میلی لیتر PBS حل شده و دوباره سانتریفوژ گردید. محلول PBS حذف شده و سلول‌ها در ۱-۲ میلی لیتر فیکساتیو به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفتند. سلول‌ها رسوپ داده شده و بلا فاصله فیکساتیو حذف گردید و رسوپ سلولی دو بار با PBS شسته شد. سپس در ۱-۲ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی حل گردید و در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲-۲۴ ساعت انکوبه شد. سلول‌های رنگ شده با میکروسکوپ نوری معکوس مطالعه گردیدند.

استخراج RNA از سلول‌های K562 تیمار شده با هیدروکسی اوره و کنترل با استفاده از محلول RNX-Plus انجام گرفت (۱۹). سلول‌های K562 با سانتریفوژ در دور ۱۰۰۰ rpm رسوپ‌های شدن. به هر کدام از رسوپ‌های حاصل از چهار نمونه یک میلی لیتر از محلول RNX-Plus (Cinagene) اضافه و به مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلروفوم افزوده و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۳۰۰ به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی برداشته شد و هم حجم

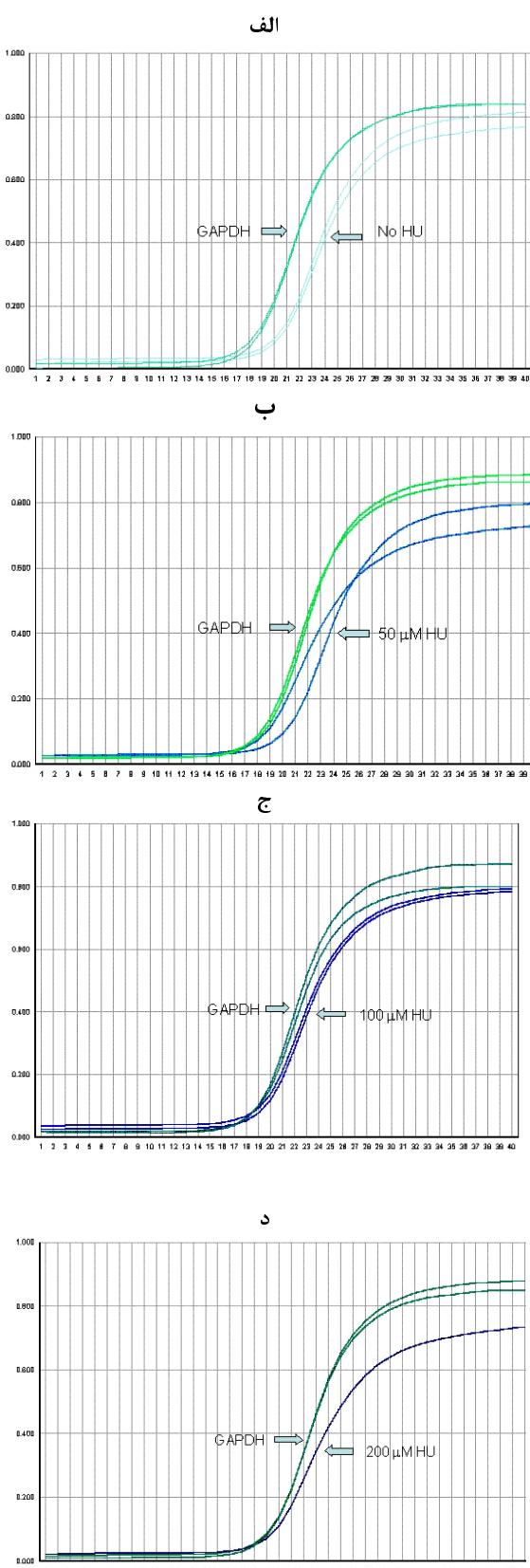
یافته‌ها

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 ۱۸ و ۲۸s srRNA می‌باشد. RNA و عدم تخریب آن می‌باشد.

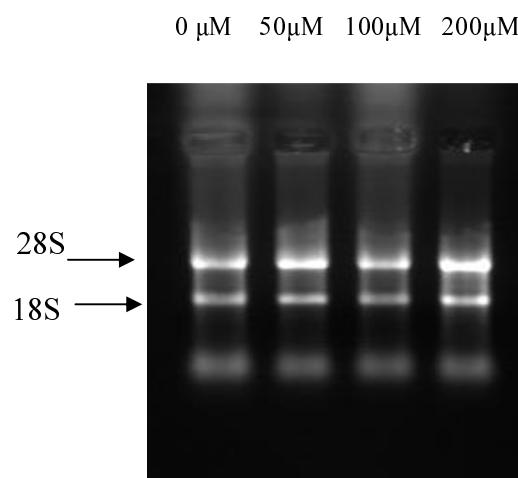
جدول ۱- نتایج مربوط به استخراج RNA از سلول‌های K562 تیمار شده با هیدروکسی اوره (HU) و کنترل.*

	کنترل	HU (HU)	HU (۵۰ μ M)	HU (۱۰۰ μ M)	HU (۲۰۰ μ M)
(μ g/ml) RNA مقدار	۱۰۰۰	۹۵۰	۱۰۵۰	۱۲۰۰	
OD $260/280$	۱/۸۰	۱/۸۰	۱/۸۵	۱/۸۲	

* از هر کدام RNA ها چهت سنتر cDNA استفاده شد. با توجه به میزان جذب نوری در $260/280$ RNA ها، از کیفیت خوبی برخوردار هستند.

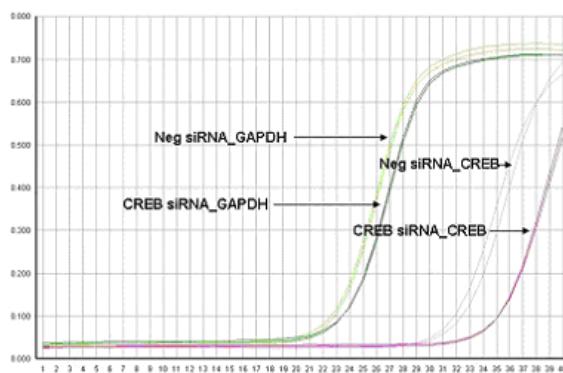


شکل ۲- گراف‌های الف، ب، ج و د ترتیب القای ژن-۷-گلوبین، در غلظت ۰، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره را نشان می‌دهد.

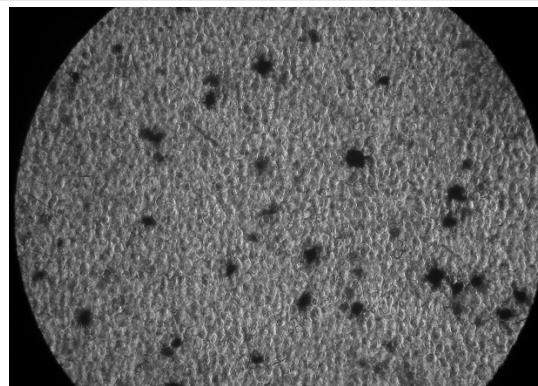


شکل ۱- بررسی RNA تخلیص شده از سلول‌های K562 کنترل (C) و سلول‌های القا شده با ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره در ژل آگارز ۱ درصد.

در شکل ۲ گراف‌های حاصل از Real-time PCR میزان القای ژن-۷-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 200 میکرومولار میزان $2/5$ برابر القا در بیان ژن-۷-گلوبین دیده می‌شود (شکل ۲ و نمودار ۱).



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

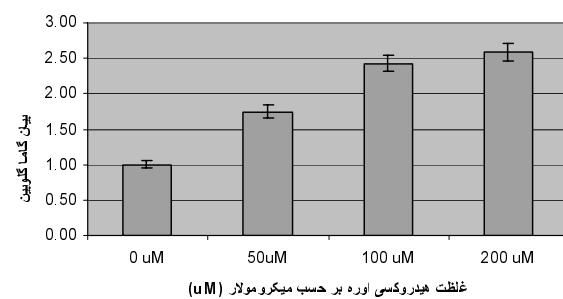


شکل ۳ - سلول K562 ترانسفکت شده با پلاسمید - β -Gal. سلولهای ترانسفکت شده به رنگ تیره نمایان شده اند.

بحث

القا- گلوبین راهی موثر در درمان بیماران β - تالاسمی می باشد. با توجه به اینکه سلول های K562 مشابه سلول های اریتروئیدی جنینی بوده و توانایی القا شدن با داروهای مختلف مثل هیدروکسی اوره و تولید HbF را دارند، مدل in vitro مناسبی جهت مطالعات القا- گلوبین در شرایط می باشدند (۱۶، ۱۲). یافته ها نشان می دهد که نتایج حاصل از in vivo mRNA و HbF مربوط به آن در مطالعات in vivo و in vitro با هم مرتبط بوده و به این ترتیب نتایج می تواند تاییدی بر پاسخ های in vivo باشد (۱۵). در مطالعاتی که قبلا صورت گرفته، غلظت های $\mu\text{mol/L}$ ۱۳۰، $\mu\text{mol/L}$ ۱۰۰ و $\mu\text{mol/L}$ ۴۰ از هیدروکسی اوره جهت القا- گلوبین در سلول های مختلف خونی استفاده شده است. به این ترتیب ما جهت مطالعه القا- گلوبین در سلول های K562 با هیدروکسی اوره غلظت های ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار از 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 القا- 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 ۲۰۰ میکرومولار از هیدروکسی اوره، بیان ژن- گلوبین تا $۲/۵$ برابر افزایش می یابد. به این ترتیب می توان با بکارگیری غلظت ۱۰۰ میکرومولار از این دارو، بیان ژن- گلوبین را به میزانی مشابه با ۲۰۰ میکرومولار 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- گلوبین پی برد. در حالی که روش 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- β - Gal، میزان کارآیی ترانسفکشن بررسی گردید. تعداد سلول های آبی رنگ نمایانگر میزان ترانسفکشن می باشد. در رابطه با سلول های K562 $۳۵-۴۰$ درصد سلول ها آبی رنگ بودند. آزمایشات سه بار تکرار شدند و در هر سه مورد کارآیی 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 پرنگ میزان بیان ژن β - گلاکتوزیداز کم بوده است (شکل ۳). مقدار RNA های CREB Negative siRNA و SLOU K562 ترانسفکت شده با siRNA به ترتیب ۹۰۰ و ۱۳۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. میزان جذب نوری در $۲۶۰/۲۸۰$ در نمونه های Föc ۱/۸-۱/۹ برخوردار بودند. اندازه گیری مهار بیان ژن کاندیدای مسیر هیدروکسی اوره (CREB)، در کنار یک ژن آندوزنوس GAPDH به عنوان کنترل داخلی صورت گرفته است. همچنین آزمایشات به صورت دوتایی (Duplicate) انجام گردید. (شکل ۴).



نمودار ۱- مقایسه میزان القا ژن- گلوبین سلول K562 با غلظت های ۵۰ ، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکرومولار هیدروکسی اوره را نشان می دهد.

موثر به سلول و مهار کارآمد آن می‌باشد. با استفاده از روش siRNA 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 در مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره در سلول‌های K562 استفاده نمود.

تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات استادی 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 روشهای مطمئن جهت مطالعه بیان ژن‌هاست. یافته‌های ما، غلظت بهینه را جهت القا ژن-۶-گلوبین در سلول‌های K562 نشان داد. از طرف دیگر، با توجه به اینکه در زمینه مسیر عملکردی هیدروکسی اوره در القا ژن-۶-گلوبین اطلاعات زیادی در دسترس نمی‌باشد، شناسایی پروتئین‌های پایین دست مسیر سیگنالی هیدروکسی اوره می‌تواند کمک زیادی در بهبود درمان بیماران مبتلا به β -تالاسمی و آنمی داسی شکل ارائه دهد. یکی از راههای مطالعه مسیر عملکردی داروهای 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, Rachmileitz E. β -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. 4th ed. Oxford, England: Blackwell Science; 2001; 133-91.
3. Perrine S. Fetal globin induction-Can it cure β - 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 β -thalassemia: it's as simple as α , β , γ , δ . J Clin Invest 2005; 115:1470-73.
8. Cao H, Stamatoyannopoulos G, Jung M. Induction of human γ globin gene expression by histone deacetylase inhibitors. Blood 2004; 103:701-709
9. Iyamu WE, Adunyah SE, Fasold H, Horiuchi K, Baliga S, Fremppong 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 γ -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 β -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. Watanapokasin Y, Chuncharunee S, Sanmund D, Kongnium W, Winichagool P, Rodgers G P. In vivo and in vitro studies of fetal hemoglobin induction by hydroxyurea in β - 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*. 3rd 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-thrououghput 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.