

تاثیر miR-146a و miR-150 بر القای تمایز سلول های لنفوئیدی T در سلول های بنیادی خونساز

پرویز فلاح^۱، مسعود سلیمانی^۲، محسن حمیدپور^۳، مصطفی رضایی طاویرانی^۴، احمد قره باغیان^۵،
احسان عارفیان^۶، کتایون احمدی^۷

چکیده

سابقه و هدف

میکرو RNAها، کلاسی از RNAهای کوچک غیر کدکننده هستند و اخیراً نشان داده شده است که نقشی اساسی در فرآیندهای مهم سلولی از جمله تکامل و تمایز از طریق تنظیم پس از ترجمه، ایفا می کنند. نقش این عناصر در رده سلول های خونساز نیز بررسی شده است و شواهد زیادی دال بر دخالت میکرو RNA های شماره ۱۵۰ (miR-150) و ۱۴۶ (miR-146a) در تمایز لنفوسیت های T وجود دارد. هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر افزایش بیان miR-146a و miR-150 در سلول های بنیادی خونساز و توانایی این دو میکرو RNA در تمایز سلول های بنیادی به سمت سلول های لنفوئیدی T بود.

مواد و روش ها

در یک مطالعه تجربی، القای افزایش بیان دو miR-146a و miR-150 در سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف صورت گرفت. پس از هفت روز، فرآیند تمایز به لنفوسیت های T با مارکرهای CD4 و CD8 توسط روش فلوسیتومتری سنجیده شدند. هم چنین افزایش بیان این دو میکرو RNA با روش های RT-PCR و quantitative Real Time PCR بررسی شد.

یافته ها

سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف، یک هفته پس از آلودگی با ویروس خصوصیات لنفوسیت های T به ویژه لنفوسیت های T سائیتوتوکسیک را از خود نشان دادند، یعنی افزایش بیان مارکرهای CD4 و به ویژه CD8 در آن ها دیده شد.

نتیجه گیری

با توجه به داده های کسب شده می توان نتیجه گرفت که سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف، با افزایش القای بیان miR-146a و miR-150، توانایی تمایز به سمت لنفوسیت های T را دارند.

کلمات کلیدی: میکرو RNAها، miR-150 انسانی، miR-146a انسانی، سلول های بنیادی خونساز

تاریخ دریافت: ۹۰/۴/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۰/۹/۱۹

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی - دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۲- مؤلف مسؤول: PhD هماتولوژی - دانشیار دانشگاه تربیت مدرس - تهران - ایران - صندوق پستی: ۱۴۱۱۵-۱۱۱

۳- PhD هماتولوژی - استادیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۴- PhD بیوفیزیک - دانشیار مرکز تحقیقات پروتومیکس، دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۵- PhD ایمونوهماولوژی بالینی - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۶- PhD ویروس شناسی - مرکز تحقیقات بن یاخته - تهران - ایران

۷- کارشناس ارشد ژنتیک - مرکز تحقیقات بن یاخته - تهران - ایران

مقدمه

امروزه سلول های بنیادی به عنوان سلول هایی با توانایی خودسازی و تکثیر به همراه توانایی تمایز به رده های خونساز شناسایی می شوند. با بررسی های انجام شده بر روی مغز استخوان مشخص شد که سلول های اولیه ای در این بافت ها وجود دارند که قادر به ایجاد کلونی های خونساز در طحال موش اشعه دیده تا حد مرگ می باشند (۱، ۲). سلول بنیادی قادر است که پس از تقسیم متقارن، سلول های دختری ایجاد کند که یکی مشابه مادر و دیگری به سمت تمایز متعهد شود (۳). شاخصی که در انتخاب سلول های بنیادی خونساز به کار می رود، آنتی ژن CD133 است. اولین بار بین و همکارانش این مولکول سطحی را شناسایی کرده و خصوصیات آن را توصیف کردند (۴، ۵).

در کنار نقش اولیه فاکتورهای رونویسی ژن، در چند سال اخیر خانواده دیگری از عناصر تنظیمی در بیان ژن ها نیز مورد توجه قرار گرفته و نشان داده شده است که نقشی تعیین کننده در تمایز رده های سلولی ایفا می کنند. این عناصر تنظیمی اپی ژنتیک، در گروه RNA های کوچک غیر کدکننده قرار گرفته و میکرو RNA (miRNA) نام دارند (۶، ۷). میکرو RNA ها، مولکول های RNA کوچک و تک رشته ای هستند که مکمل mRNA یک ژن کد کننده پروتئین دیگر می باشند و می توانند از بیان یک ژن و تولید پروتئین مربوطه جلوگیری کنند. میکرو RNA ابتدا در کرم C.elegans به شکل مولکول های RNA با طول ۲۳-۱۸ نوکلئوتید که مکمل بخش 3'-mRNA UTR های هدف بودند، دیده شدند و شامل lin-4 و let-7 می باشند (۸، ۹).

در سال های اخیر با افزایش پیشرفت در زمینه روش های مولکولی و مطالعه های انجام شده بر روی میکرو RNA ها، نقش این عناصر تنظیمی اپی ژنتیک در تمایز سلول های خونساز مورد توجه قرار گرفت و مشخص شد که میکرو RNA ها، سهم قابل توجهی در طول این فرآیند سلولی دارند (۱۰، ۱۱). اولین مورد در موش ها شرح داده شد، افزایش بیان نابه جای miR-181 در سلول های پروژنیاتور خونساز، موجب افزایش

لنفوسیت های B در شرایط آزمایشگاهی (in vitro) و داخل بدنی (in vivo) شد (۱۲). هم چنین با روشی مشابه نشان داده شد که miR-223 طی فرآیند تمایز گرانولوسیتی افزایش می یابد و پیش سازهای پرومیلوسیتی را در انسان به سمت رده گرانولوسیتی پیش می راند (۱۳، ۱۴).

با استناد به بررسی های انجام شده مشخص شد که در حالت معمول برای تمایز سلول بنیادی خونساز به رده لنفوییدی T، با افزودن فاکتورهای رشد خاص این رده در محیط کشت به سلول ها، این کار انجام می شود، با بررسی بیان میکرو RNA ها مشخص شد در این روند دو miR-150 و miR-146a افزایش بیان داشته اند، اما هدف در مطالعه حاضر تمایز سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ به رده لنفوییدی T فقط با القای بیان این دو میکرو RNA در سلول های بنیادی خونساز بدون افزودن فاکتور رشد به محیط کشت سلول ها بود (۱۵، ۱۶).

مواد و روش ها

جداسازی سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ از خون بند ناف:

مطالعه انجام شده از نوع تجربی بود. در این مطالعه، سلول های بنیادی خونساز CD133⁺ از خون بند ناف جداسازی شده و ماهیت بنیادی آن ها تایید شد. به طور خلاصه یک نمونه خون بند ناف که به طور میانگین حاوی ۶۰ تا ۷۰ میلی لیتر خون با ماده ضد انعقاد CPDA بود، گرفته شد. در مرحله بعد ۳۰ میلی لیتر نمونه خون با ۱۰ میلی لیتر PBS (Phosphate buffer Saline) استریل رقیق شد (نسبت سه به یک). سپس خون رقیق شده به آرامی به ۳ میلی لیتر فایکول در فالتکون ۱۵ افزوده شد، به طوری که خون به صورت یک لایه بر روی فایکول قرار بگیرد. به مدت ۲۰ دقیقه در دور ۲۱۰۰ سانتریفوژ انجام شد. سلول های تک هسته ای مابین گلبول های قرمز که در پایین لوله رسوب کرده اند و مایع زرد رنگی که در بالای لوله است به صورت یک لایه جمع می شوند که با استفاده از پی پت پاستور این لایه را به داخل یک لوله فالتکون تمیز منتقل کرده و با PBS یک بار شستشو دادیم. جداسازی سلول های CD133⁺ با استفاده از روش

جداسازی مغناطیسی سلول انجام شد (MACS = Magnetic Cell Sorting of human cells). برای جداسازی با MACS، سلول‌های تک هسته‌ای جدا شده در مرحله قبل، با آنتی‌بادی‌ها علیه مولکول CD133 نشاندار شد که این مرحله مجاورت با آنتی‌بادی، ۳۰ دقیقه بود. سپس سلول‌ها شسته شده و روی ستون برده شدند. در این مرحله که ستون داخل آهن‌ربا قرار داده می‌شود، سلول‌های CD133⁺ داخل آن باقی مانده و CD133⁻ها خارج می‌شوند. در مرحله بعد ستون از آهن‌ربا خارج شده و یک بار با PBS شستشو انجام شد که نتیجه آن خروج سلول‌های CD133⁺ بود. سپس سلول‌های CD133⁺ جدا شده برای تکثیر در محیط کشت Stemsan بدون سرم، حاوی کوکتل تکثیر (expansion) قرار گرفتند. این کوکتل شامل ۱۰۰ ng/mL Stem cell factor، ۱۰۰ ng/mL TPO و اینترلوکین ۳ با غلظت ۱۰ ng/mL بود. سلول‌های فوق مدت ۵ الی ۷ روز در این محیط تکثیر شدند، بعد از آن برای تایید مارکر CD133، فلوئوسیتومتری با آنتی‌بادی CD133 (Anti-CD133) انجام شد. سپس برای مرحله بعد یعنی تمایز، آن‌ها به محیط کشت DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) انتقال داده شدند.

استخراج Total RNA:

برای استخراج Total RNA از سلول، از کیت‌های استخراج RNA گوناگونی استفاده می‌شود. این کیت‌ها بر اساس اختلاف فاز فنل کلرفرم یا بر اساس قدرت تفکیک ستون‌های کوچک جداسازی کار می‌کنند. در ایران هر دو مورد قابل استفاده است. گرچه کیت‌هایی که بر اساس فنل کلرفرم کار می‌کند، دارای میزان تخلیص بالاتری هستند ولی RNA حاصل از ستون سالم‌تر می‌باشد. مراحل کار کیت‌های مبتنی بر فنل کلرفرم به صورت زیر می‌باشد:

یک میلی‌لیتر از محلول تیازول بر روی سلول‌ها ریخته می‌شود، به خوبی مخلوط می‌گردد و در دمای محیط به مدت ۵ دقیقه انکوبه می‌شود.

مخلوط فوق به میکروتیوب منتقل می‌شود و به آن ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم اضافه می‌گردد و با تکان دست به مدت ۱۵ ثانیه به خوبی با مخلوط فوق آمیخته می‌شود.

مخلوط حاضر به مدت ۴ دقیقه در دمای اتاق انکوبه می‌شود و پس از آن به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۳۲۰۰ rpm سانتریفوژ می‌گردد.

فاز رویی محصول سه فازی به دست آمده را برداشته، به میکروتیوب جدید منتقل کرده و به میزان دو برابر حجم آن اتانول سرد اضافه می‌شود.

مخلوط به دست آمده به آرامی تکان داده می‌شود و یک شبانه روز در ۲۰- درجه سانتی‌گراد انکوبه می‌گردد. این مخلوط پس از یک شبانه روز انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌گردد.

مایع رویی دور ریخته می‌شود و به رسوب سفید رنگ ۱ میلی‌لیتر از اتانل ۷۵٪ سرد اضافه می‌گردد و به خوبی ورتکس می‌شود تا رسوب از ته میکروتیوب جدا گردد.

مخلوط فوق به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و با دور ۱۲۰۰۰ rpm سانتریفوژ می‌گردد. اتانل روی رسوب دور ریخته می‌شود و در دمای اتاق قرار داده می‌شود تا رسوب تا حد امکان خشک شود. رسوب در ۲۰ میکرولیتر آب استریل حل می‌شود.

سپس غلظت RNA استخراج شده تعیین شده و نیمی از آن برای بررسی mRNA و بیان ژن و نیمی دیگر برای بررسی miRNA مورد استفاده قرار می‌گیرد.

واکنش پلی‌مریزاسیون معکوس (Reverse = RT transcriptase):

واکنش پلی‌مریزاسیون معکوس (RT) یکی از حساس‌ترین روش‌های تعیین میزان کم mRNA است که از نمونه‌های کوچک و محدود حاصل می‌شود. با این روش می‌توان نمونه‌های گوناگون و کوچک تا حد یک سلول را مورد تجزیه و تحلیل قرار داد و میزان mRNA ها را در نمونه‌های گوناگون با هم مقایسه نمود. به طور طبیعی از روش RT-PCR برای مشخص نمودن الگوی بیان ژن‌های مورد نظر در شرایط و تیمارهای متفاوت و هم چنین برای تعیین ساختار RNA استفاده می‌شود. باید توجه داشت که RT-PCR، روش پیچیده‌ای است که کلیه

گزنونوکلئازی، هر دو آنزیم را در خور اشتباه می کند.
Km (ضریب میکائلیس) این آنزیم ها برای سوبسترای dNTP خیلی بالاست. به همین دلیل باید برای اطمینان حاصل کردن از رونویسی کامل ترانسکریپت، غلظت بالایی از dNTP مصرف شود.

آنزیم سوم، DNA پلی مراز مقاوم به حرارت Taq است. این آنزیم توسط یک باکتری گرما دوست (*Eubacterium thermophilus*) ساخته می شود که در حضور Mn^{2+} از خود فعالیت RT نشان می دهد. مزیت مهم استفاده از این آنزیم این است که هر دو مرحله RT و PCR در یک تیوپ صورت می گیرد. ولی متأسفانه این آنزیم قادر است تنها ۱-۲ kb cDNA را بسازد که این میزان از کارایی Mo-MLV که حدود ۱۰ kb را تولید می کند، پایین تر است از طرف دیگر یون Mn^{2+} باعث کاهش کارایی ساخت DNA می شود و در نهایت Tth قادر نیست که از آغازگرهای اولیگو dTTP و راندوم هگزامر استفاده کند زیرا این آغازگرها در دمایی که آنزیم فعال است پایدار نمی باشند.

در فرآیند RT برای ساختن cDNA، به آغازگر احتیاج است. آغازگرهای آنتی سنس اختصاصی (Antisense specific primers)، قطعات الیگونوکلئوتیدهای شش تایی تصادفی (Random Hexamers)، و آغازگرهای الیگوتیمیدن (Oligo dTTP)، سه نوع آغازگری هستند که در فرآیند RT از آن ها استفاده می شود. انتخاب مناسب آغازگر و تعیین میزان مناسب غلظت آن در انجام صحیح فرآیند RT ضروری است.

آغازگر Reverse اختصاصی ژن، اکثراً به صورت اختصاصی به الگوی RNA متصل می شود و از به دست آمدن cDNA های دیگر مناطق جلوگیری می کند. استفاده از راندوم هگزامر یا آغازگرهای الیگوتیمیدین میزان mRNA های قابل تجزیه و تحلیل که از یک نمونه استخراج شده اند را به حداکثر می رساند، و بیشترین میزان cDNA ممکن از روی RNA ساخته می شود. در مواردی که RNA بسیار طولانی و گسترده باشد و یا ساختارهای ثانویه ایجاد شده در RNA زیاد باشد، راندوم هگزامرها به عنوان آغازگر توصیه می شوند.

عوامل فیزیکی و شیمیایی دخیل در آن به هم وابسته هستند لذا تکرارپذیری، حساسیت و ویژگی آزمایش به بهینه سازی روش و برقراری تعادل بین این عوامل بستگی دارد.

RNA نمی تواند به عنوان الگو در PCR استفاده شود پس اولین مرحله رونویسی معکوس از روی RNA و تولید cDNA می باشد. سپس این الگو با PCR به صورت نمایی تکثیر یافته و میزان آن افزایش می یابد.

ترانس کریپت ها، ساختارهای ثانویه ای را تشکیل می دهند که آنزیم پلی مراز معکوس (RT) قادر به باز کردن آن ها نیست پس cDNA در این موارد به طور مناسب ساخته نمی شود. این پدیده کیفیت RT-PCR را کاهش می دهد لذا سعی می شود که از طرق گوناگون از ایجاد آن جلوگیری شود.

آنزیم های رایج که در فرآیند رونویسی معکوس (RT) استفاده می شوند سه نوع هستند؛ یکی آنزیم رونویسی معکوس ویروس آوین میلوبلاستوزیس (AMV = Avian Myeloblastosis Virus) و دیگری آنزیم رونویسی معکوس ویروس ملونی مورین لوکمی (Mo-MLV = Moloney Murine Leukemia Virus) می باشند که تحت عنوان آنزیم های مزوفیل مطرح هستند.

آنزیم AMV نسبت به آنزیم Mo-MLV مقاوم تر بوده حتی تا دمای ۵۵ درجه سانتی گراد هم قادر است به طور مشخص فعالیت پلی مریزاسیون خود را حفظ کند. هم چنین این آنزیم مشکلاتی که ساختارهای ثانویه RNA ایجاد می کنند را از بین می برد. در مقابل آنزیم Mo-MLV و آنزیم های نوترکیب، فعالیت RNaseH ضعیفی را از خود نشان می دهند. به طوری که کاهش این فعالیت باعث می شود که آنزیم توانایی ماندگاری اش افزایش یافته قطعات cDNA بزرگتری را بسازد. لذا اگر هدف از فعالیت رونویسی معکوس (RT)، ساختن cDNA کامل از کل ترانس کریپت است، آنزیم Mo-MLV پیشنهاد می شود.

هر دو آنزیم به یک الگوی RNA یا DNA به همراه یک آغازگر DNA یا RNA که در سر 3' خود گروه هیدروکسیل حمل می کند نیاز دارند. فقدان نقش 5'→3'

miR-146a روی cDNA ساخته شده با دستورالعمل مربوط به Master Mix شرکت فرمتاز انجام گرفت (جدول ۱ و ۲).

تخلیص پلاسمیدها:

برای تخلیص پلاسمید از کیت شرکت فرمتاز استفاده شد. این سیستم بر اساس لیز قلیایی باکتری و اتصال پلاسمید به غشای سیلیکاژل استوار است. دستورالعمل تخلیص پلاسمید در زیر آورده شده است:

کشت شبانه باکتری به حجم ۱۰ mL در ۳۵۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. پس از خارج نمودن محیط کشت به صورت کامل، رسوب باکتری‌ها در ۲۵۰ μ L محلول سوسپانسیون کننده حل شده و به یک میکروتیوب منتقل شد. ۲۵۰ μ L محلول لیز کننده به میکروتیوب اضافه و ۶-۴ بار به آرامی برگردانده شد تا به خوبی مخلوط شود. میکروتیوب به مدت حداکثر ۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شد. سپس ۳۵۰ μ L محلول خنثی کننده به میکروتیوب افزوده و ۱۰-۶ بار به آرامی برگردانده شد تا به خوبی مخلوط گردید. بعد از آن در ۴۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه سانتیفریوژ شد. مایع رویی به آرامی به یک ستون تخلیص پلاسمید منتقل شد و سپس در ۱۳۰۰۰ rpm به مدت ۶۰ ثانیه سانتیفریوژ گردید و مایع خارج شده دور ریخته شد. به ستون، ۷۰۰ μ L الکل ۸۰٪ اضافه و مانند مرحله قبل سانتیفریوژ انجام شد، سپس ستون به مدت ۱ دقیقه جهت خارج شدن کامل الکل سانتیفریوژ شد.

مقدار ۵۰ μ L بافر elution یا آب مقطر دو بار تقطیر به ستون اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه در ۱۳۰۰۰ rpm سانتیفریوژ شد، پلاسمید تخلیص شده در مایع خارج شده قرار دارد. غلظت پلاسمیدهای تخلیص شده در این مرحله ۳۰۰ ng/ μ L می‌باشد.

اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-150 با pRETROSUPER و هم چنین قطعه pri-mir-146a با pLEX-JRED: برای انجام واکنش اتصال آنزیمی، نسبت مولی قطعات

ساخت cDNA با استفاده از آنزیم Mo-MLV:

مراحل ساخت cDNA به صورت زیر می‌باشد:
در یک لوله فاقد RNase (RNase free)، ۱۰۰ ng تا ۴۰۰ ng از RNA توتال اضافه شد. ۲ μ L از آغازگر راندوم هگزامر به آن اضافه گردید. حجم نهایی توسط آب مقطر فاقد RNase به ۲۰ μ L رسید. مجموعه در ۷۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه انکوبه گردید و سپس بلافاصله روی یخ قرار گرفت. بافر [5X] RT، به حجم ۶ μ L اضافه شد. ۱۰ mM dNTPmix به میزان ۳ μ L اضافه گردید. ۲۰۰ واحد آنزیم ترانس کریپتاز معکوس [M-Mul-V] معادل ۱ میکرولیتر اضافه شد. با آب مقطر فاقد RNase به حجم نهایی ۳۰ μ L رسانده شد. به مدت یک ساعت در ۴۲ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. ۱۰ دقیقه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت که سبب غیرفعال شدن آنزیم گردید. سپس بلافاصله به ظرف یخ منتقل شد. محصول cDNA در ۲۰- درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید. برای بررسی بیان miR-150، با استفاده از کیت شرکت فرمتاز از روی Total RNA استخراج شده، cDNA ساخته شد.

جدول ۱: مقادیر مورد استفاده جهت انجام Real Time-PCR

مواد	مقدار (μ L)
آغازگر جلوبرنده (۱۰ pmol)	۰/۷۵
آغازگر معکوس (۱۰ pmol)	۰/۷۵
Master Mix	۱۲/۵
Di H ₂ O	۹

جدول ۲: چرخه دمایی انجام Real Time-PCR

تکرار	زمان	دما (درجه سانتی‌گراد)
۱ سیکل	۱۰ دقیقه	۹۵
۴۰ سیکل	۱۰ ثانیه	۹۵
	۴۵ ثانیه	۶۰

انجام Real Time-PCR برای بررسی بیان miR-150 و miR-146a:

واکنش Real Time-PCR برای بررسی بیان miR-150 و

اتصال آنزیمی، نسبت مولی قطعات وکتور و قطعه‌های ژنی مورد نظر به صورت یک به سه انتخاب شد که این واکنش با استفاده از آنزیم لیگاز T4 طبق دستورالعمل شرکت سیناژن انجام شد.

انتقال به میزبان باکتریایی STBL4:

در این تحقیق از روش الکتریکی جهت ترانسفورماسیون استفاده شد. مقدار ۵ میکرولیتر از محصول لیگاسیون به ۱۰۰ میکرولیتر باکتری کامپنت STBL4 افزوده شد و بر روی محیط LB-Agar حاوی آمپی‌سیلین برای پلاسمید pRETRO-SUPER و هم چنین بر روی محیط LB-Agar حاوی کانامایسین و ژئومایسین برای پلاسمید pLEX-JRED منتقل گردید. تمام محیط‌های کشت به مدت یک شب در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. ۲۴ ساعت بعد، از کلنی‌های به دست آمده برای پلاسمید یک کلنی برداشته شد و برای فرآیند تخلیص پلاسمید مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی سلول‌ها:

ابتدا سلول‌های تولید کننده ویروس که سلول‌های HEK (Human Embryonic Kidney) و HEK-GP بودند، کشت داده شدند. به این صورت که ۲۴ ساعت قبل از ترانسفورماسیون سلول‌ها با پلاسمید، حدود ۵ میلیون سلول HEK در یک پلیت ۱۰۰ میلیمتری برای لنتی ویروس و هم چنین همین مقدار از سلول HEK-GP برای رتروویروس کشت داده شدند. محیط کشت مورد استفاده، DMEM به همراه ۱۰٪ FBS، ۲ mM آل - گلوتامین و 1X Pen-Strep بود. سپس سلول‌ها در انکوباتور CO₂ در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در مرحله بعد حدود دو ساعت قبل از ترانسفورماسیون، محیط کشت روی سلول‌ها با محیط تازه که به دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد رسیده بود تعویض محیط گردید.

تولید ویروس نوترکیب با استفاده از روش کلسیم فسفات: در این روش ابتدا DNA ها در محیط حاوی بافر فسفات به آرامی با کلرید کلسیم مخلوط شدند. به این

وکتور و insert به صورت ۳:۱ انتخاب شد (جدول ۳).

جدول ۳: مقادیر مورد استفاده جهت اتصال آنزیمی قطعه pri-miR-146a به وکتور pRETRO و هم چنین قطعه pri-miR-146a به وکتور pLEX-JRED

مواد	آزمایش (μL)
وکتور	۱۵
Insert	۲۰
T4 DNA ligase	۲
بافر 10 x	۵
di H ₂ O	۳
PEG	۵

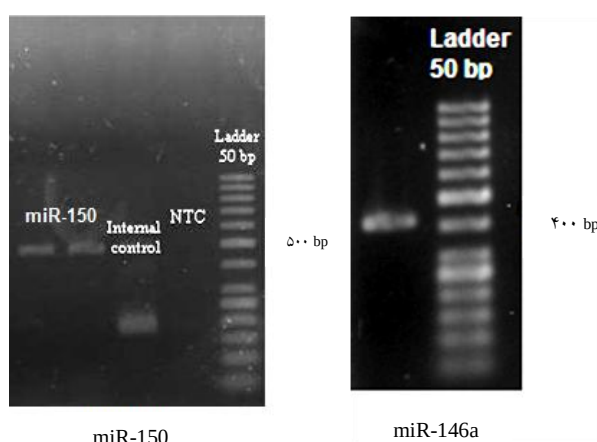
واکنش فوق یک ساعت در دمای اتاق و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد و آنزیم‌های واکنش سپس در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۵ دقیقه غیر فعال شدند.

کلونینگ miR-146a و miR-150:

به منظور کلون کردن قطعه ژنی miR-146a، از وکتور لنتی ویروسی pLEX-JRED (چون یک وکتور بیانی است و هم چنین پروتئین JRED را بیان می‌کند که می‌توان وجود آن را در سلول با میکروسکوپ فلورسانس بررسی کرد) و برای قطعه ژنی miR-150 از وکتور رتروویروسی pRETRO-SUPER (یک وکتور بیانی) استفاده شد. بدین منظور ابتدا برای دو قطعه ژنی miR-146a و miR-150، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) انجام شد (جدول ۴). از طرف دیگر وکتورهای مورد نظر با استفاده از کیت استخراج پلاسمید شرکت فرمتاز استخراج شدند. در ادامه قطعه miR-146a و وکتور pLEX-JRED با آنزیم‌های محدود کننده Mlu1 و Xho1 و قطعه miR-150 و وکتور pRETRO-SUPER با آنزیم‌های محدود کننده BglII و HindIII که متعلق به شرکت فرمتاز بودند بریده شدند. واکنش هضم آنزیمی به مدت ۵ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و بعد از آن واکنش اتصال برای هر قطعه با وکتور خاص خودش انجام شد. برای انجام واکنش

جدول ۴: مشخصات آغازگرهای طراحی شده برای تکثیر و تشخیص بیان قطعه‌های مورد نظر

ردیف	نام آغازگر	توالی آغازگر	طول قطعه (bp)
۱	pri-miR-146a	F: 5'-CCGCTCGAGCCACATCAGCCTTCCAGAC -3' R: 5'-CGACGCGTCTCACACTCCTTATACCTTCAG -3'	۴۱۶
۲	pri-miR-150	F: 5'-GGAAGATCTCCCTTGCTGGTTCTCTA TG-3' R: 5'-CCCAAGCTTGCAGGTACAATAGAA ACAGGT G-3'	۴۸۲
۳	miR-146a	5'- TGAGAACTGAATTCCATGGGTT-3'	۲۲
۴	miR-150	5'- TCTCCCAACCCCTTGATAC -3'	۱۷



شکل ۱: نتایج PCR قطعه‌های ژنی miR-146a و miR-150

آزمون فلوسیتومتری برای تایید فنوتیپ سلول‌های CD133⁺:

در این مطالعه بعد از این که سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ با روش MACS جدا شدند و به مدت ۵ روز تکثیر یافتند، برای تایید فنوتیپ CD133⁺، فلوسیتومتری انجام شد که ۹۵٪ (RN2= ۹۵٪) سلول‌ها، فنوتیپ CD133⁺ را داشتند (شکل ۲). از آن جایی که وکتور pLEX-JRED پروتئین رنگی JRED (قرمز) را بیان می‌کرد، از این مزیت برای تایید ورود آن‌ها به سلول‌ها استفاده شد به طوری که بعد از ترانسفکشن DNA ها به سلول‌های HEK برای تولید ویروس، از سلول‌ها با میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد (شکل ۳).

ارزیابی سلول‌های بنیادی خونساز بعد از انتقال ژن با میکروسکوپ فلوروسنت:
از سلول‌های بنیادی خونساز نیز ۲۴ ساعت بعد از

ترتیب کمپلکس DNA و کلسیم فسفات شکل گرفت. در مرحله بعد، ترکیب فوق به سطح سلول‌های HEK اضافه شد. میزان DNA مورد استفاده ۱۰-۵ μgr بود. در ادامه بعد از ۲۴، ۴۸، و ۷۲ ساعت، محیط رویی که حاوی ویروس بود جمع‌آوری شد. در انتها آن‌ها را با دور ۲۳۰۰۰ g به مدت دو ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد اولترا سانتریفوژ کرده و تغلیظ انجام شد.

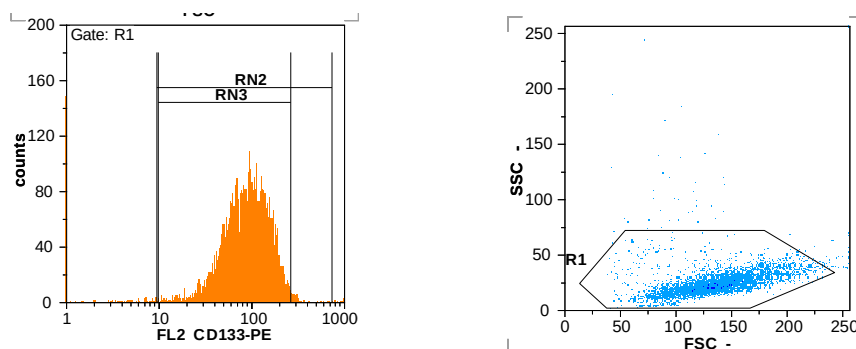
انتقال ژن miR-150 و miR-146a به سلول‌های بنیادی خونساز:

در نهایت ۴ × ۱۰^۵ سلول بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده در هر چاهک یک پلیت ۲۴ خانه تقسیم شد و وکتورهای ویروسی به محیط اضافه شدند. ابتدا رتروویروس که حاوی ژن miR-150 بود به سلول‌ها اضافه شد و پس از ۲۴ ساعت لنتی ویروس که حاوی ژن miR-146a بود، اضافه شد. پس از اضافه شدن هر یک از ویروس‌ها، سلول‌ها به مدت ۵ ساعت در انکوباتور با CO₂ ۵٪ و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، با حرکات دورانی مخلوط شدند. پس از ۵ ساعت دوران متوقف شد و سلول‌ها حدود ۱۶ ساعت دیگر در مجاورت ویروس قرار گرفتند و تقریباً ۲۱ ساعت پس از برخورد با ویروس، محیط کشت آن‌ها تعویض شد.

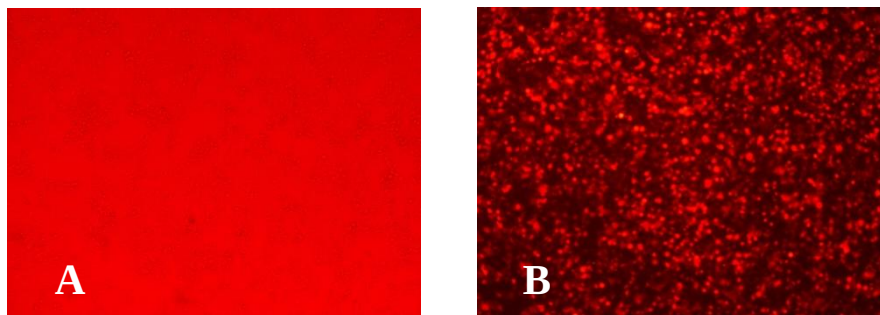
یافته‌ها

نتایج PCR برای قطعه‌های ژنی:

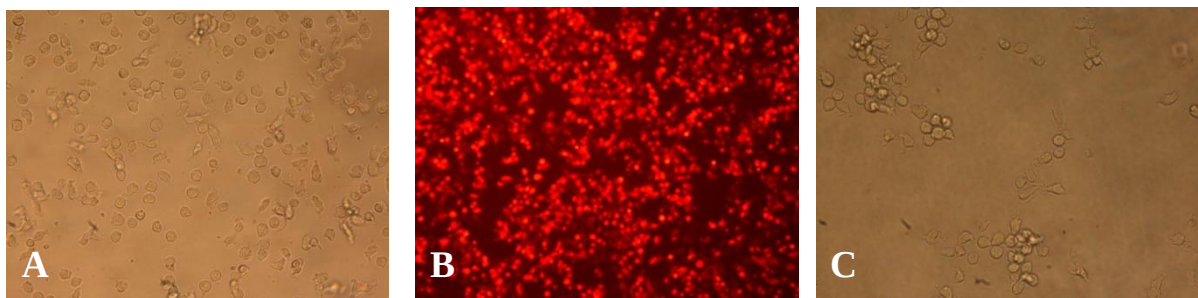
در شکل ۱ نتایج واکنش زنجیره‌ای پلی‌مرز (PCR) برای قطعه‌های ژنی miR-150 (۴۸۲ جفت باز) و miR-146a (۴۱۶ جفت باز) نشان داده شده است.



شکل ۲: تایید فنوتیپ CD133 برای سلول های بنیادی خونساز جدا شده با روش MACS



شکل ۳: تصاویر سلول های HEK قبل (A) و بعد (B) از ورود DNA به آنها



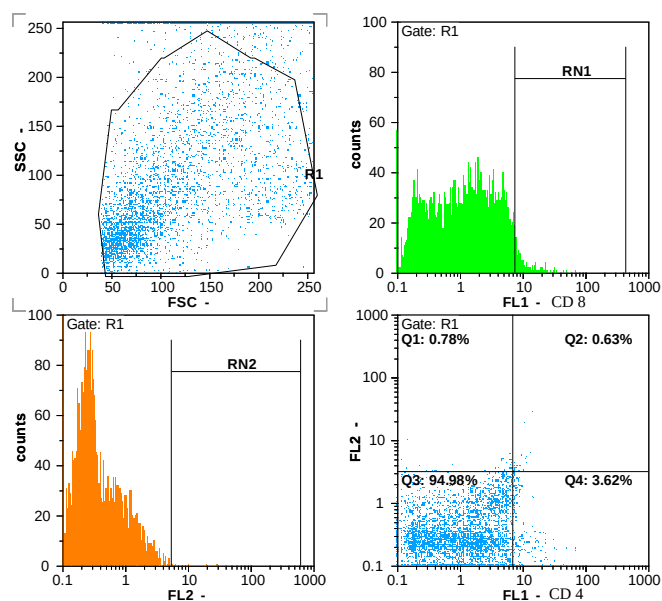
شکل ۴: سلول های بنیادی خونساز قبل (تصویر A)، ۲۴ ساعت بعد از انتقال ژن (تصویر B) و پس از هفت روز (تصویر C)

شده و سلول های کنترل پس از ۷ روز استخراج گردید. پس از بررسی های کمی و کیفی روی RNA استخراج شده، واکنش رونویسی معکوس و به دنبال آن واکنش Real Time-PCR با استفاده از آغازگرهای طراحی شده برای هر میکرو RNA صورت گرفت.

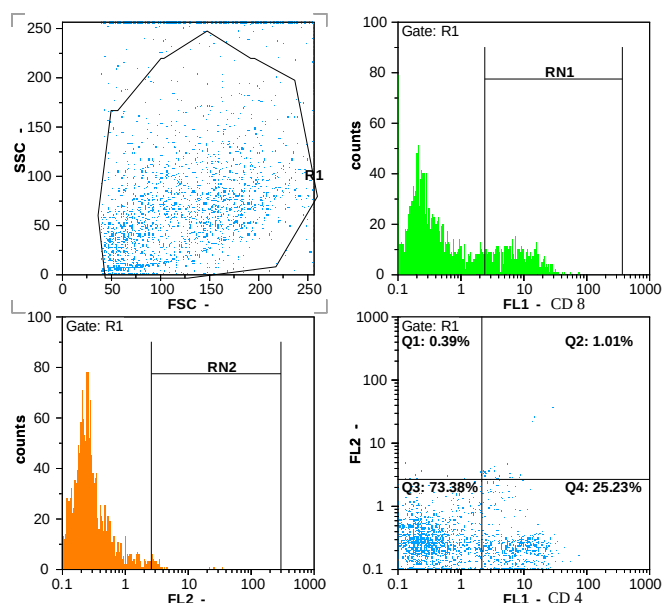
بررسی های انجام شده نشان داد که بیان هر دو miR-146a و miR-150 در سلول های تیمار شده نسبت به سلول های کنترل (سلول هایی که با ویروس های بدون قطعه های مورد نظر مجاور شدند) افزایش داشته است

مجاور شدن با ویروس ها با میکروسکوپ فلوروسنت عکس گرفته شد که تایید کننده ورود ویروس ها به داخل آنها می باشد (شکل ۴). هم چنین تصویر C، سلول های بنیادی خونساز را بعد از ۷ روز از انتقال ژن نشان می دهد که سلول های بنیادی خونساز حالت به هم چسبیده پیدا کرده اند.

بررسی بیان miR-146a و miR-150 از طریق RT-PCR: در مطالعه حاضر، نمونه های RNA از سلول های تیمار



شکل ۵: نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای CD8 و CD4 در روز ۷ در سلول‌های کنترل



شکل ۶: نتایج فلوسیتومتری برای مارکرهای CD8 و CD4 در روز ۷ در سلول‌های پس از انتقال ژن

مارکرهای CD4 و CD8 بررسی شدند، که این دو مارکر در سلول‌های کنترل (سلول‌های بنیادی خونسازی که با ویروس‌های فاقد قطعه‌های مورد نظر مجاور شدند) به میزان خیلی کمی بیان شدند اما در سلول‌های تیمار شده این دو مارکر افزایش داشتند (شکل‌های ۵ و ۶).

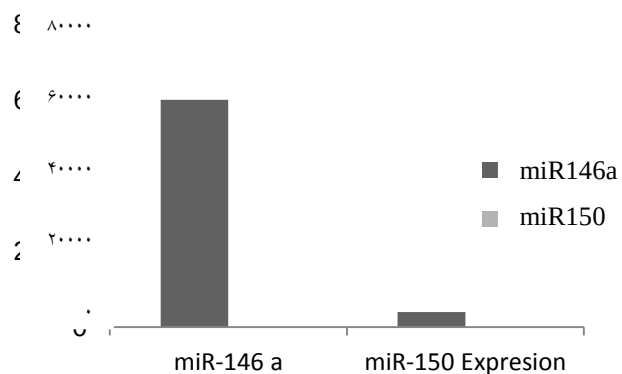
(میانگین برای miR-146a، ۶۰۷۹۳ با انحراف معیار ۴۶۵ و برای miR-150، ۵۲۴۶ با انحراف معیار ۱۲۵) (نمودار ۱).

بررسی بیان مارکرهای CD4 و CD8 با فلوسیتومتری: در این پژوهش، سلول‌ها پس از هفت روز برای

پتانسیل تکامل پیش سازهای چند رده ای را تعیین می کنند (۱۹، ۱۴).

بعضی از این فاکتورهای رونویسی مانند SCL/Tall و AML 1 چند منظوره بوده و کمبودشان در تمایز کل سلول ها تاثیر می گذارد. از طرفی بیان برخی از فاکتورهای رونویسی دیگر از جمله C/EBP α و GATA 1، PU.1 و C/EBP α نسبت به یکدیگر به عنوان یک عامل تنظیم کننده و تعیین کننده سرنوشت تمایزی سلول به رده مونوسیتی در برابر رده گرانولوسیتی پیشنهاد می شود (۱۴). بدین ترتیب miRNA به عنوان نامزد مناسبی برای القای تنظیم فرآیندهای تکثیر و عامل تعیین کننده سرنوشت سلولی در سلول های مختلف و به ویژه در سلول های بنیادی محسوب می شود. این مولکول ها طی تکامل به شدت حفاظت شده اند و در خون سازی گونه های مختلف پستانداران نیز نقش بسیار اساسی دارند (۲۱، ۲۰). در مطالعه های انجام شده حدود ۳۳ miRNA در سلول های پیش ساز خونی شناخته شده و اظهار شده است که سرشماری از این مولکول ها در تمایز رده های مختلف خون سازی نقش مهمی دارند (۲۲، ۸). از جمله این miRNA ها می توان به miR-181 در تکامل لنفوسیت های B، miR-223 در گرانولوپوئز و miR-221 و miR-222 در تمایز اریتروئیدی اشاره کرد. هم چنین کاهش سطح a، ۲۰ و miR-17-5p برای مونوسیتوپوئز ضروری می باشد (۲۴، ۲۳).

سلول های CD133⁺ به دلیل توانایی تکثیر و تمایز بیشتری که نسبت به سلول های CD34⁺ دارند (بنیادی تر هستند)، برای انجام این مطالعه انتخاب شدند (۵). سلول های CD133⁺ پس از جداسازی از خون بند ناف تکثیر شده و مجدداً از نظر فنوتیپ با روش فلوسیتومتری برای مارکر CD133 چک شدند. پس از اطمینان از فنوتیپ مورد نظر، با وکتور لنتی ویروسی و رترو ویروسی ساخته شده آلوده شدند و هفت روز پس از آلوده سازی با ویروس های نو ترکیب، کل RNA که شامل mRNA و miRNA می باشد از آن ها استخراج شد و بررسی برای میزان بیان miR-146a و miR-150 روی آن ها صورت گرفت. سلول ها طی یک هفته تغییرات قابل توجهی از



نمودار ۱: نتیجه اندازه گیری کمی برای بررسی تغییرات بیان miR-146a و miR-150 با Real Time-PCR

بحث

تمایز سلول های پروژنیاتور چند قوه ای خون ساز، یک فرآیند چند مرحله ای می باشد که توسط سیستم پیچیده ای از فاکتورهای رونویسی که با یکدیگر تعامل دارند، کنترل می شود (۱۷، ۱۶). در سال های اخیر شبکه جدیدی از چرخه های تنظیمی در سطح mRNA مورد توجه قرار گرفته است که شامل یک کلاس از RNA های غیر کدکننده به نام microRNA است. ابتدا در سال ۱۹۹۰ دو گروه از محققین سعی در افزایش بیان ژن های پیگمان های رنگی در گل های گیاه پتونیا (Petonia) نموده اند که نتیجه کار تولید گیاهان بدون رنگ بود. تلاش های بعدی در توجیه علمی این موضوع منجر به کشف فرآیند تنظیمی RNA های تداخل کننده (RNAi) گردید و در سال ۱۹۹۳ اولین microRNA به نام lin-4 کشف شد. هفت سال بعد دومین microRNA به نام let-7 شناخته شد و شناسایی این RNA ها ادامه پیدا کرد (۱۸).

مطالعه های اخیر ثابت کرده اند که این گروه از RNA های کوچک، بسیاری از فرآیندهای تکامل از قبیل تنظیم بیان و خاموشی ژن پس از نسخه برداری یا مهار ترجمه را انجام می دهند. به صورت اختصاصی در بافت های متفاوت بیان شده، بیش از ۳۰٪ از mRNA ها را کنترل کرده و مسیرهای سلولی را تنظیم می کنند (۱۹، ۱۴).

بررسی های متعدد نشان می دهند که بعضی از این فاکتورها حتی در HSC ها نیز بیان می شوند (اگر چه با غلظت پایین)، در مراحل ابتدایی رونویسی نقش دارند و

درصد بود و افزایش آن چشمگیر نبود. از طرفی میزان مارکر CD8 که در گروه کنترل ۳/۳ درصد بود در گروه آزمون ۲۵ درصد بود که افزایش آن چشمگیر و نشان‌دهنده لنفوسیت‌های سایتوتوکسیک بود.

در مطالعه حاضر سعی بر آن شد تا با استناد به بررسی‌های انجام شده بر روی miRNA ها، با انتقال ژن‌های miR-150 و miR-146a به ترتیب توسط وکتورهای رترو ویروسی و لنتی ویروسی به سلول‌های پیش‌ساز CD133⁺، شرایط افزایش بیان miR-150 و miR-146a را فراهم کرده و میزان القای تمایز لنفوئیدی T را در آن‌ها مورد بررسی قرار داد.

نتیجه‌گیری

با توجه به داده‌های کسب شده، می‌توان نتیجه گرفت که با القای بیان میکرو RNA های ۱۴۶ و ۱۵۰ در سلول‌های بنیادی خونساز، توانایی تمایز آن‌ها به سمت رده لنفوئیدی T وجود دارد.

تشکر و قدردانی

این پژوهش در قالب پایان‌نامه دانشجویی و با مساعدت‌های مالی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی انجام شده است که بدین وسیله از آن‌ها تشکر و قدردانی می‌شود.

خود نشان دادند، میزان بیان miR-146a و miR-150 نیز به ترتیب حدود ۸ و ۳/۵ برابر شد. در آزمون فلوسیتومتری که برای مارکرهای CD4 و CD8 انجام شد، افزایش بیان مارکرهای CD4 و به ویژه CD8 در سطح سلول‌ها مشاهده شد که نشان‌دهنده ایجاد خصوصیات لنفوئیدی به خصوص لنفوسیت‌های T سایتوتوکسیک (Cytotoxic T lymphocyte = CTL) در سلول‌های بنیادی خونساز آلوده شده با ویروس می‌باشد.

همان‌طور که گفته شد، هدف از انجام مطالعه حاضر، القای افزایش بیان miR-150 و miR-146a و بررسی تاثیر این تغییر در القای تمایز لنفوئیدی T در سلول‌های بنیادی خونساز CD133⁺ جدا شده از خون بند ناف بود. بنابراین چنین انتظار می‌رفت که پس از آلوده شدن سلول‌ها با ویروس‌ها، شاهد افزایش بیان miR-150 و miR-146a نیز باشیم که پس از هفت روز وقتی miRNAs از سلول‌ها استخراج شدند و میزان آن‌ها با استفاده از روش Real-Time PCR سنجیده شد، نتایج حاصل کاملاً همان نتایج مورد انتظار بود. به این ترتیب که افزایش بیان miR-150 و miR-146a صورت گرفت و بیان این میکرو RNA نسبت به گروه کنترل افزایش یافت.

هم‌چنین آزمون فلوسیتومتری پس از هفت روز برای مارکرهای CD4 و CD8 انجام شد که میزان مارکر CD4 در گروه کنترل ۰/۲ درصد و در سلول‌های تیمار شده ۱/۴

References :

- Nowak D, Stewart D, Koeffler HP. Differentiation therapy of leukemia: 3 decades of development. *Blood* 2009; 113(16): 3655-65.
- Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res* 1961; 14: 213-22.
- Jan YN, Jan LY. Asymmetric cell division. *Nature* 1998; 392(6678): 775-8.
- Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood* 1997; 90(12): 5002-12.
- Metcalf D, Carpinelli MR, Hyland C, Mifsud S, DiRago L, Nicola NA, et al. Anomalous megakaryocytopoiesis in mice with mutations in the c-Myb gene. *Blood* 2005; 105(9): 3480-7.
- Summers YJ, Heyworth CM, de Wynter EA, Hart CA, Chang J, Testa NG. AC133 + G0 cells from cord blood show a high incidence of long-term culture-initiating cells and a capacity for more than 100 million-fold amplification of colony-forming cells *in vitro*. *Stem Cells* 2004; 22(5): 704-15.
- Lin SL, Ying SY. Combinational therapy for potential HIV-1 eradication and vaccination. *Int J Oncol* 2004; 24(1): 81-8.
- Rosa A, Ballarino M, Sorrentino A, Sthandier O, De Angelis FG, Marchioni M, et al. The interplay between the master transcription factor PU.1 and miR-424 regulates human monocyte/macrophage differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 2007; 104(50): 19849-54.
- Hannon GJ, Rossi JJ. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature* 2004;

- 431(7006): 371-8.
- 10- Appasani K, editor. Micro RNAs: fom basic science to disease biology. First ed. New York, USA: Cambridge University Press; 2008.
- 11- Mukai HY, Motohashi H, Ohneda O, Suzuki N, Nagano M, Yamamoto M. Transgene Insertion in proximity to the c-myb gene disrupts erythroid-megakaryocytic lineage bifurcation. *Mol Cell Biol* 2006; 26(21): 7953-65.
- 12- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* 1993; 75(5): 843-54.
- 13- Felli N, Fontana L, Pelosi E, Botta R, Bonci D, Facchiano F. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(50): 18081-6.
- 14- Faller M, Guo F. MicroRNA biogenesis: there's more than one way to skin a cat. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1779(11): 663-7.
- 15- Calin GA, Croce CM. Chronic lymphocytic leukemia: interplay between noncoding RNAs and protein-coding genes. *Blood* 2009; 114(23): 4761-70.
- 16- Kluiver J, Kroesen BJ, Poppema S, van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia* 2006; 20(11): 1931-6.
- 17- Chen C-Z, Li L, Lodish HF, Bartel DP. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004; 303(5654): 83-6.
- 18- Lin SL, Chang D, Wu DY, Ying SY. A novel RNA splicing-mediated gene silencing mechanism potential for genome evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 310(3): 754-60.
- 19- Shivdasani RA. MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood* 2006; 108(12): 3646-53.
- 20- 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/EBP alpha regulates human granulopoiesis. *Cell* 2005; 123(5): 819-31.
- 21- Garzon R, Fabbri M, Cimmino A, Calin GA, Croce CM. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol Med* 2006; 12(12): 580-7.
- 22- Cross MA, Enver T. The lineage commitment of haemopoietic progenitor cells. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7(5): 609-13.
- 23- Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003; 3(2): 89-101.
- 24- Mendes ND, Freitas AT, Sagot MF. Current tools for the identification of miRNA genes and their targets. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(8): 2419-33.

Original Article

Effect of miR-146a and miR-150 on T-cell lymphoid differentiation of hematopoietic stem cells

**Fallah P.¹, Soleimani M.², Hamidpour M.¹, Rezaii Tavirani M.^{1,3}, Gharehbaghian A.¹,
Arefian E.⁴, Ahmadi K.⁴**

¹Paramedical Faculty, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

³Proteomics Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴Stem Cell Research Center, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Micro RNAs are a class of small non-coding RNAs which have been recently shown to play a crucial role in major cellular processes such as development and differentiation through post-transcriptional regulation. The role of these epigenetic elements has been also demonstrated in hematopoietic lineage differentiation and there is a large body of evidence that miR-150 and miR-146a are responsible for T lymphocyte differentiation. Our goal was to examine the effect of miR-150 and miR-146a overexpression in hematopoietic stem cells and its ability to differentiate these cells into a T lymphoid cell.

Materials and Methods

In this experimental study CD133⁺ stem cells were employed as hematopoietic stem cells and permanent overexpression of miR-150 and miR-146a was established. The differentiation progress was tracked by flowcytometry for lymphocyte markers such as CD4 and CD8. Moreover, expression of miR-146a and miR-150 by RT-PCR and quantitative real time PCR after 7 days was studied.

Results

The cells showed T lymphoid characteristics 7 days after transduction. CD4 and especially CD8 expression significantly increased.

Conclusions

In conclusion, miR-150 and miR-146a overexpression is an effective factor in T cytotoxic differentiation and they have the ability of directing CD133⁺ hematopoietic stem cells to express T lymphoid characteristics.

Key words: MicroRNAs, miR-150, human, miR-146a, human, Hematopoietic Stem Cells

Received: 6 Jul 2011

Accepted: 10 Dec 2011

Correspondence: Soleimani M., PhD of Hematology. Associate Professor of Tarbiat Modares University. P.O.Box: 14115-111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 88011001; Fax: (+9821)88013030
E-mail: soleimani.masoud@gmail.com