نقش تنظیمی miR-34a در پیشروی سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell با هدف قرار دادن ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1

شیوا نجاری[۱،۲]، رضا محمدزاده[۱*] و بهزاد برادران[۲]

[۱] ایران، مراغه، دانشگاه مراغه، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی سلولی و مولکولی

[۲] ایران، تبریز، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات ایمونولوژی

تاریخ دریافت: ۹۸/۳/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۸/۶/۹

چکیده

لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell (T-ALL) یک بدخیمی لنفوئیدی است که بعلت دگرگونی اونکوژنیک اجداد T-cell ایجاد می‌شود. اخیرا گزارش شده است که میکرو RNAها در لوسمی‌های مختلف از جمله T-ALL نقش دارند. بیان نابجای این میکرو RNAها در تکثیر، تهاجم و آپوپتوز از طریق هدف قرار دادن مسیرهای سیگنالی گزارش شده است. MiR-34a یک سرکوب کننده‌تومور در بسیاری از سرطان‌ها از جمله T-ALL است. هدف از این مطالعه، بررسی نقش تنظیمی miR-34a در پیشروی سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell با هدف قرار دادن ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1 می‌باشد. در این مطالعه سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell (T-ALL) در محیط کشت کامل RPMI 1640 کشت شدند و miR-34a mimic با استفاده از معرف ترانسفکشن in vitro DNA jetPEI، ترانسفکت شد. پس از گذشت ۲۴ ساعت، استخراج RNA و سنتز cDNA انجام شد. میزان بیان miR-34a و ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1 با استفاده از روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت. نتایج توسط نرم افزار Graph Pad Prism 6 و آزمون Sidak وTurkey، تجزیه و تحلیل شدند. تجزیه و تحلیل نتایج حاصل از qPCR نشان داد که بیان ژن‌های BACH1 وSIRT1 که جزء ژن‌های انکوژن هستند پس از ترانسفکت miR-34a کاهش می‌یابد و بیان ژن PTEN که سرکوبگر تومور می‌باشد پس از ترانسفکت miR-34a افزایش می‌یابد.

واژه های کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell (T-ALL)، miR-34a، BACH1، PTEN و SIRT1

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۴۱۳۷۲۷۲۰۷۲، پست الکترونیکی: rmohamadzadeh@maragheh.ac.ir

مقدمه

لوسمی حدود ۸ درصد از کل موارد سرطان را در جهان تشکیل می‌دهد و شامل همه‌ی گروه‌های سنی با بروز متفاوت در ایران و جهان است (۵۴). لوسمی لنفوبلاستیک‌حاد (ALL) یک بدخیمی خونی بسیار تهاجمی است که ناشی از تکثیر و گسترش بلاست‌های لنفوئیدی در خون، مغز استخوان و سایراعضای بدن است (۳۲). ALL رایج ترین بیماری لوسمی حاد دوران کودکی است که ۸۰٪ از لوسمی‌های کودکان را شامل می‌شود اما تنها ۲۰٪ از لوسمی‌های بالغین را تشکیل می دهد (۵). ALL با توجه به سلول‌های لنفوبلاستیکی که تحت تاثیر قرار می‌گیرند، می‌تواند به T-cell ALL (T-ALL) و B-cell ALL (B-ALL) تقسیم شود (۴۱). T-ALL تقریبا ۲۰٪ از همه موارد ALL را تشخیص می‌دهد و در بزرگسالان نسبت به کودکان شایع‌تر است (۵۰). تظاهرات بالینی T-ALL شامل تب، ترومبوسیتوپنی، خونریزی، عفونت و توده های تیموسی بزرگ متعدد می‌باشد (۹, ۳۳). در حال حاضر درمان T-ALL شیمی درمانی با دوز بالا است که میزان بقای کودکان بیمار را افزایش داده است. با این حال شیمی درمانی دارای عوارض جانبی کوتاه مدت و بلند مدت است. همچنین عود بیماری چالش مهم

دیگری است که در بیماران T-ALL مشاهده می‌شود (۱۹،۲۵). کشف میکرو RNAها درک جدیدی را از سرطان زایی بوجود آورده است. تنظیم نابجای میکرو RNAها می‌تواند منجر به اختلال در سیستم خونی و ایجاد سرطان خون شود (۳۹). میکرو RNAها برای اولین بار در سال ۱۹۹۳ توسط لی و همکارانش در نماتد *سینورابدیتیس الگانس (Caenorhabditis elegans)* شناسایی شدند (۳۰). miRNAها نقش مهمی در تنظیم مسیرهای متابولیک و سلولی متعدد مانند کنترل تکثیر سلولی، تمایز و بقا دارند. اعضای خانواده miR-34 شامل سه میکرو RNA پردازش شده است که شامل miR-34a و همولوگ های miR-34b و miR-34c است (۳،۱۴) و حذف در این مناطق اغلب در انواع سرطان‌هایی از جمله سرطان پستان، سرطان ریه، سرطان کولورکتال و بدخیمی های خونی دیده می‌شود (۴). miR-34a از میکرو RNAهای سرکوبگر تومور است که کاهش بیان دارد و در این مورد درمان با بازگرداندن بیان این میکرو RNA بحالت نرمال انجام می‌گیرد که برای این منظور از روش درمان با جایگزینی میکرو RNA استفاده می‌شود (۶،۴۷). افزایش بیان miR-34 با رشد سلول‌های کلونوژنیک، تهاجم سلولی، متوقف شدن آپوپتوز و کاهش حساسیت سلولها به شیمی درمانی در سرطان پانکراس مرتبط است. در مطالعه دیگری نشان داده شد که خانواده miR-34 می تواند بیان و جهش p53 را تنظیم کند، در حالی که miR-34b و miR-34c، MYC را هدف قرار می دهد (۱۱،۱۶, ۲۷, ۴۳). علاوه بر این، miR-34a می-تواند بیان ژن SIRT1 را مهار کند و بیان p53 استیله و p21 را افزایش دهد و موجب تنظیم چرخه سلولی و آپوپتوز شود (۵۲). BACH1 یک ژن کد کننده پروتئین است. از مسیرهای مرتبط با آن می‌توان به مسیر سرطان پستان یکپارچه و مسیر BRCA1 اشاره کرد. تفسیر هستی شناسی ژن مربوط به BACH1 شامل فعالیت فاکتور رونویسی اتصال دهنده DNA و اتصال پروتئین هِم است (۱۸). پروتئین PTEN یک مهارکننده تومور است که فعالیت آن اغلب در سرطان های انسانی کاهش می‌یابد. بنابراین فعال شدن مجدد چنین پروتئینی بطور بالقوه می‌تواند یک درمان مؤثرعلیه سرطان باشد (۵۳). سیتروئین‌ها بدلیل نقش‌های متنوعی که در وقایع مختلف فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی از جمله اختلالات مرتبط با سن، چاقی، التهاب و سرطان دارند، توجه ویژه‌ای به خود جلب کرده‌اند. نقش SIRT1 در سرطان‌ها در سال‌های اخیر بسیار مورد مطالعه قرار گرفته است. با این حال نقش سیتروئین‌ها در سرطان‌ها هنوز هم مورد بحث است زیرا می‌توانند با توجه به بافت سلولی یا اهداف آن در مسیرهای خاص سیگنالی یا سرطانهای خاص بعنوان سرکوبگر تومور یا انکوژن عمل کنند (۳۱). شناسایی میکرو RNAها و اهداف آنها که در توسعه سرطان و متاستاز نقش دارند، ممکن است فرصت-های درمانی جدیدی فراهم کند (۲۰, ۲۸, ۳۴, ۳۵, ۴۹). هدف از پژوهش حاضر بررسی تاثیرترانسفکت miR-34a و افزایش بیان آن بر میزان بیان ژن‌های هدف BACH1، PTEN و SIRT1 در رده سلولی Jurkat در لوسمی لنفوبلاستیک حاد T-cell (T-ALL) می‌باشد.

مواد و روشها

کشت سلول‌های JURKAT: رده سلولی Jurkat از انستیتوپاستور ایران به صورت ویال خریداری شد. سلول ها در محیط کشت RPMI-1640 غنی شده با ۱۰٪ FBS (GibcoBRL–USA) و ۱٪ آنتی بیوتیک پنی سیلین/ استرپتومایسین (GibcoBRL–USA) در ۳۷ درجه سانتی گراد و اتمسفر مرطوب حاوی ۵٪ CO_2 کشت داده شدند.

ترانسفکت miR-34a: برای ترانسفکت miR-34a، سلول-های Jurkat در پلیت ۶ خانه‌ای به مقدار تقریبی 8×10^5 سلول در هر چاهک کشت شدند. برای انجام بقیه مراحل انتقال از پروتکل شرکت jetPEI (PolyPlus-transfection, Strasbourg, France) استفاده شد. برای این منظور ابتدا در میکروتیوپ 200 µl، بافر و غلظت های ۱ و ۵ و ۱۰ نانومول از miR-34a و jetPEI 4µl اضافه شد و بمدت ۱۵

دقیقه در دمای محیط انکوبه گردید. پس از گذشت این مدت زمان، مخلوط موجود به چاهک‌های پلیت منتقل شد و سپس پلیت حاوی سلول‌های ترانسفکت شده بمدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی گراد با ۵٪ CO_2 انکوبه گردید. زمان و غلظت موثر miR-34a بر روی سلول‌هایJurkat بررسی شد و در نهایت ازغلظت متوسط (۵ نانومول) استفاده شد. دراین آزمایش از U6 بعنوان کنترل داخلی استفاده شد و بیان ژن های مرتبط با کنترل که ۱ در نظر گرفته شده بود، محاسبه گردید.

استخراج RNA و سنتز cDNA : کارایی ترانسفکشن miR-34a پس از ۲۴ ساعت بررسی شد و بمنظور تغییر بیان ژن‌ها توسط میکرو RNA، RNA کل سلول با استفاده از محلول Riboex (GENEALL Biotechnology, Seoul, Korea) استخراج شد. سپس میزان خلوص RNA استخراج شده توسط دستگاه Nano drop اندازه گیری شد. DNA مکمل (cDNA) با استفاده از کیت سنتز miScript II RT (QIAGEN, Hilden, Germany) برای miR-34a با توجه به پروتکل شرکت سازنده سنتز شد. سنتز cDNA ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1 با استفاده از کیت (BIOFACT, korea) انجام شد. سنتز رشته cDNA از روی رشته RNA به کمک پرایمر Random hexamer صورت گرفت.

qRT-PCR: تغییرات میزان بیان میکروRNA با روش qRT-PCR با استفاده از کیت miScript SYBR Green PCR (QIAGEN, Hilden, Germany) که حاوی پرایمر-های اختصاصی این میکرو RNA است، بررسی شد. ژن U6 بعنوان کنترل داخلی miR-34a و ژن β□Actin بعنوان کنترل داخلی ژن‌های BACH1، PTEN وSIRT1 استفاده شد. طراحی پرایمرها با استفاده از سایت مخصوص طراحی پرایمر، primer blast در NCBI صورت گرفت و توسط شرکت تکاپو زیست، پرایمرها سنتز شدند. توالی هدف پرایمر miR-34a در جدول۱ و توالی پرایمر ژن های BACH1، PTEN و SIRT1 در جدول۲ نشان داده شده است. داده ها با استفاده از روش Pfaffle ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) آنالیزشد.

جدول ۱- توالی هدف پرایمر miR-34a

miR-34a	UGGCAGUGUCUUAGCUGGUUGU
U6	Forward : CTTCGGCAGCACATATACTAAAATTGG
	Reverse : TCATCCTTGCGCAGGGG

جدول ۲- توالی پرایمر ژن های BACH1، PTEN و SIRT1

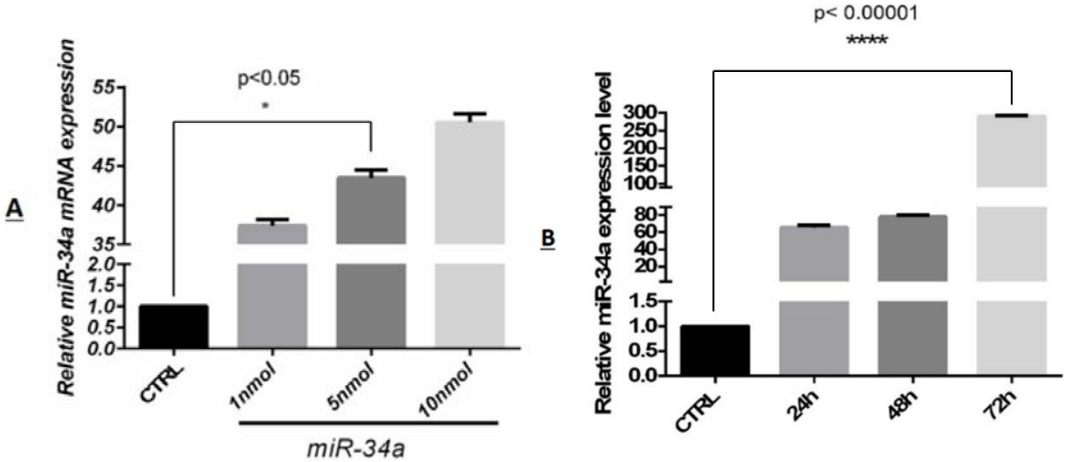
β□Actin	Forward : TCCCTGGAGAAGAGCTACG
	Reverse : GTAGTTTCGTGGATGCCACA
BACH1	Forward :TGCGATGTCACCATCTTTGT
	Reverse : CCTGGCCTACGATTCTTGAG
SIRT1	Forward : TGGCAAAGGAGCAGATTAGTAGG
	Reverse : CTGCCACAAGAACTAGAGGATAAGA
PTEN	Forward : GGTTTTTTGAGGTGTTT
	Reverse : AAAAACTAAACACAATCACA

آنالیز آماری: جهت تجزیه و تحلیل آماری نتایج بدست آمده از نرم افزار Graph Pad Prism 6 استفاده شد. برای تعیین تغییرات متغیر بین گروه‌های کنترل و ترانسفکت شده با میکرو RNA از آزمون Sidak و Turkey استفاده گردید که سطح معنی داری $p< 0.05$ در نظر گرفته شد.

نتایج

تغییر بیان miR-34a پس از ترانسفکشن سلول Jurkat: بیان miR-34a در گروه کنترل و گروه سلول‌های ترانسفکت شده با miR-34a توسط آزمایش qRT-PCR ارزیابی شد. نتایج نشان داد که بعد از ترانسفکت miR-34a

میزان بیان این میکروRNA بمیزان قابل توجهی پس از ۷۲ ساعت افزایش یافته است و بـا اسـتفاده از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ افزایش ۳۰۰ برابری بوده است (شکل ۱). دراین مطالعه $p < ۰/۰۵$ (غلظت) و $p < ۰/۰۰۰۰۱$ (زمان) معنی‌دار در نظر گرفته شد. این نتایج تجزیه و تحلیل بیان نشان داد که miR-34a ممکن است یک هدف مهم درمانی باشد.

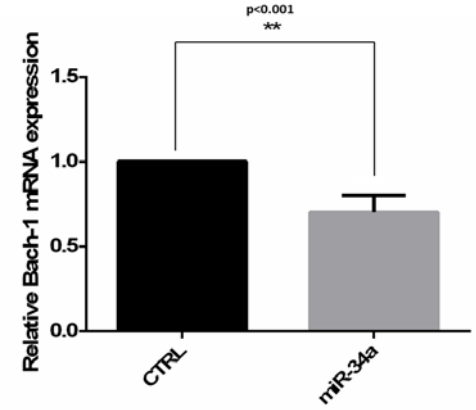


شکل۱- تغییرات بیان miR-34a در سلول های ترانسفکت شده با miR-34a و گروه کنترل در زمان های ۲۴، ۴۸ و ۷۲ ساعت و غلظت های ۱، ۵ و ۱۰ نانومول توسط qRT-PCR ارزیابی شد، (A) بیان miR-34a درغلظت های مختلف و ($P < 0.05$) معنی دار است، (B) بیان miR-34a در زمان های مختلف و ($P < 0.00001$) معنی‌دار است.

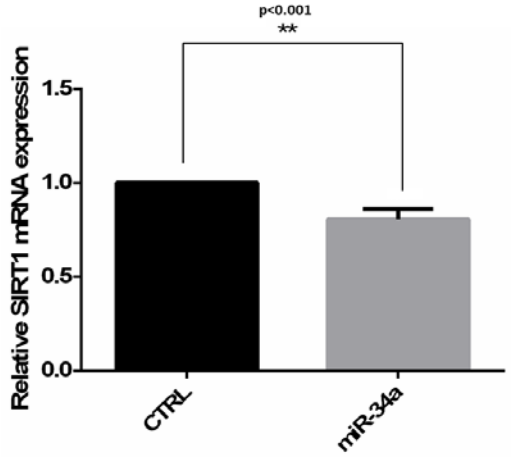
ارتباط بیان miR-34a و بیان ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1: نتایج نشان داد که میزان بیان ژن‌های BACH1 و SIRT1 در اثر ترانسفکشن با miR-34a نسبت به گروه کنترل کاهش می‌یابد که این کاهش معنی دار است ($p < ۰/۰۰۱$) و بیان ژن PTEN در اثر ترانسفکشن با miR-34a نسبت به گروه کنترل افزایش می‌یابد که این افزایش معنی-دار است ($p < ۰/۰۰۱$). سطح بیان نسبی ژن BACH1 در گروه ترانسفکت شده با میکرو RNA، ۷ درصد بود که نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته بود (شکل۲). سطح بیان نسبی ژن SIRT1 در گروه ترانسفکت شده با میکرو RNA، ۸ درصد بود که نسبت به نمونه کنترل کاهش یافته بود (شکل۳). سطح بیان نسبی ژن PTEN در گروه ترانسفکت شده با میکرو RNA ، ۱۷ درصد بود که نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته بود (شکل۴).

بحث

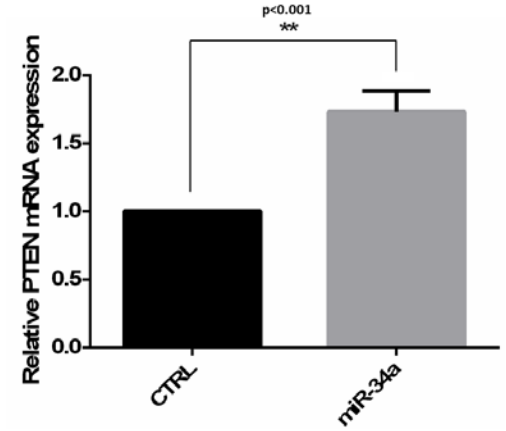
لوسمی لنفوبلاستیک حاد (ALL) شایع ترین بدخیمی در کودکان است. T-ALL، سلول‌های بنیادی تولید کننده سلول‌های لنفوئیدی، بخصوص نوعی از سلول‌های سفید خون به نام لنفوسیت‌های T را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۰،۵۱).



شکل۲- تغییرات بیان ژن BACH1 در سلول‌های ترانسفکت شده با غلظت ۵ نانومول از miR-34a و گروه کنترل در سلول Jurkat توسط qRT-PCR ارزیابی شد.



شکل۳- تغییرات بیان ژن SIRT1 در سلول های ترانسفکت شده با غلظت ۵ نانومول از miR-34a و گروه کنترل در سلول Jurkat توسط qRT-PCR ارزیابی شد.



شکل۴- تغییرات بیان ژن PTEN در سلول های ترانسفکت شده با غلظت ۵ نانومول از miR-34a و گروه کنترل در سلول Jurkat توسط qRT-PCR ارزیابی شد.

میکرو RNAها کلاسی از RNAهای غیر کدکننده درون‌زا هستند که بعنوان تنظیم کننده‌های اصلی ژنوم انسان عمل می‌کنند (۱, ۲, ۸). بیان نابجا و عملکرد میکرو RNAها در بسیاری از بیماری های انسانی این اجزای کوچک سلولی را به اهداف درمانی تبدیل کرده است (۱۵،۲۲). بویژه در سرطان، برخی از میکرو RNAها با معیارهای سختگیرانه‌ای برای تبدیل شدن به اهداف ایده‌آل درمانی با عملکرد به عنوان آنکوژن‌ها و سرکوب کننده تومورو به رو می‌شوند (۲۳, ۲۹, ۴۴, ۴۵). میکرو RNAها تقریبا در تمام بدخیمی های جامد و خونی تنظیم نابجا دارند (۳۶). miR-34a بعنوان یک میکروRNA سرکوب‌کننده تومور شناخته شده است. با توجه به شواهد علمی که در حال افزایش است، مشخص است که miR-34a از طریق تنظیم و تغییر تعدادی از آنکوژن‌ها، رشد تومور را مهار می‌کند. مطالعات مختلفی در مورد نقش miR-34a در سرطان‌های مختلف انجام شده است. در مطالعه‌ای توسط Qing و همکارانش miR-34 mimic که به سلول سرطانی معده، Kato III ترانسفکت شده بود، باعث کاهش رشد سلول، مهار پیشرفت در طی چرخه سلول و افزایش آپوپتوز دراین سلول‌ها شد (۲۶). در مطالعه دیگری Mraz و همکارانش مشاهده کردند که بیان miR-34a به طور مداوم در CLL با جهش های p53 کاهش می‌یابد که نشان می‌دهد تشخیص بیان miR-34a می‌تواند بعنوان پیش بینی کننده برای پاسخ درمانی استفاده شود (۴۰). BACH1 یک ژن کد کننده و یک عامل رونویسی است که در تعادل سلولی پاسخ استرس هِم اکسیداتیو، تنظیم پیشرفت چرخه سلولی و تنظیم HO-1 (هموژناز۱) در سرطان‌ها دخالت دارد. همچنین BACH1 بعنوان پروتئین متصل به گروه پروستتیک هِم نیز شناخته می‌شود. این پروتئین از طریق دومِین BTB-POZ هترودیمر تشکیل می دهد که به کمپلکس DNA-binding متصل می‌شود و در تنظیم ساختار کروموزومی دخالت دارد. ویژگی اتصال به هِم به طور منفی فعالیت DNA-binding را تنظیم می‌کند. اگرچه BACH1 به عنوان مهارکننده رونویسی گزارش شده است ولی می‌تواند به عنوان فعال کننده ژن‌های هدف نیز عمل کند. بر اساس مطالعات دخالت BACH1 در سرطان ها بویژه سرطان پستان گزارش شده است. ژن BACH1 در تنظیم چندین ژن از جمله CXCR4 و MMP1 که در مهاجرت و متاستاز سلول های سرطانی به ارگان‌های دیگر نقش دارند، دخالت دارد (۱۸). در مطالعه دیگری ژن BACH1 در میان ژن های کروموزوم ۲۱ شناسایی شده است که بیان بالای آن در لوسمی مگاکاریوبلاستیک مزمن

(AMKL) نشان داده شده است (۱۲). فسفاتاز PTEN دارای موتیف فعال اختصاصی برای خانواده پروتئین تریروزین فسفاتازاست و فسفاتیدیل اینوزیتول تری فسفات (PIP3) سوبسترای اصلی آن است (۲۱). همچنین PTEN آنتاگونیست اصلی مسیر PI3 کیناز است که نشان دهنده نقش مهم آن در کنترل پیشرفت و توسعه تومور است. نتایج مطالعات بر روی PTEN درک بسیاری از جنبه‌های زیست شناسی مانند متابولیسم فسفولیپید و مسیرهای سیگنالی پایین دست، تنظیم فرآیندهای سلولی مانند مهاجرت و در نهایت اصول ژنتیکی مهار سرطان را فراهم آورده است. ارتباط مهارPTEN در سطح رونویسی با لوسمی T cell بیان شده است (۵۳). همچنین بر اساس مطالعات ارتباط بین مقاومت به گاما-سکرتاز (GSI) در لوسمی تحت تاثیرNOTCH1 با جهش PTEN یافت شده است که نشان دهنده اهمیت مسیر PTEN در این بدخیمی هاست. علاوه بر این مطالعات مشابه در مورد نقش PTEN در درمان‌های هدفمند در مورد ارتباط تغییرات PTEN/PI3K و مقاومت به مهارکننده های HER2، Herceptin/Trastuzumab در سرطان پستان (۴۲) و مقاومت به مهار کننده‌های EGFR، Erlotinib و Gefitinib در بیماران گلیوبلاستوما انجام شده است (۳۸). SIRT1 یکی از اعضای خانواده Sirtuin است. SIRT1 یک نیکوتین آمید آدنوزین دی نوکلئوتید (NAD) وابسته به دِاستیلاز است و گروه استیل را از بسیاری از پروتئین‌های هیستونی و غیر هیستونی جدا می‌کند (۳۷،۴۶). بر اساس گزارشات بیان شده است که سطح SIRT1 بطور چشمگیری در سرطان پروستات (۲۴)، لوسمی میلوئیدی حاد (۱۳) و سرطان کولون در مرحله اولیه (۴۸) بالا است.

نتیجه گیری

در این مطالعه تاثیر miR-34a بر میزان بیان ژن‌های BACH1، PTEN و SIRT1 در رده سلولی Jurkat مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که میزان بیان PTEN که یک سرکوبگر تومور است در اثر انتقال با miR-34a افزایش و میزان بیان ژن های BACH1 و SIRT1 که انکوژن هستند، کاهش می‌یابد. در مطالعه ای که توسط Yamakuchi و همکارانش نیز انجام شد، نشان دادند miR-34a بیان ژن SIRT1 را مهار می‌کند که منجر به افزایش بیان ژن های P53 و P21 می‌شود که در نهایت موجب القای آپوپتوز در سلول های سرطان کولون WT می‌شود (۵۲). نتایج ما می‌تواند بیان کننده این باشد که با القای افزایش بیان این میکرو RNA و تاثیر آن بر افزایش بیان PTEN و کاهش بیان ژن های BACH1 و SIRT1 می‌توان تکثیر سلول‌ها در این بیماری را کاهش داد. علاوه براین، ژن PTEN می‌تواند بعنوان مارکر تشخیصی، پیش آگهی و همچنین هدف درمانی سرطان، مورد بررسی‌های بیشتر قرار گیرد. با توجه به محدودیتهای مطالعه حاضرازقبیل بررسی در سطح آزمایشگاهی و مطالعه بر روی یک رده سلولی، پیشنهاد می‌شود که میزان بیان miR-34a در دیگر رده های سلولی و در سطح کلینیکی نیز مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

۱- سهرابی، سید سجاد، اسماعیلی، نظریان فیروزآبادی و فلاحی. (۲۰۱۹). شناسایی و تعیین خصوصیات میکروRNA های حفاظت شده در عدس. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی.

۲- صمدی، بهاره، قائدی، کامران، صنعتی، محمد حسین. (۲۰۱۹). بررسی ارتباط پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی rs2976394 ژن PSCA مرتبط با hsa-miR-3934 و ابتلا به سرطان معده. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی.

3- Adachi, N., & Lieber, M. R. (2002). Bidirectional gene organization: a common architectural feature of the human genome. *Cell*, 109(7), 807-809.

4- Agostini, M., & Knight, R. A. J. O. (2014). miR-34: from bench to bedside. *Oncotarget*, *5*(4), 872.

5- Aldoss, I., Forman, S. J., & Pullarkat, V. J. J. o. o. p. (2019). Acute lymphoblastic leukemia in the older adult. *ournal of oncology practice*, *15*(2), 67-75.

6- Bader, A. G., Brown, D., & Winkler, M. J. C. r. (2010). The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer research, 70*(18), 7027-7030.

7- Baghbani, E., Khaze, V., Sadreddini, S., Mokhtarzadeh, A., Mansoori, B., Mohammadi, A., Baradaran, B. J. A. P. B. (2018). PTPN22 Silencing in Human Acute T-Cell Leukemia Cell Line (Jurkat Cell) and its Effect on the Expression of miR-181a and miR-181b. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, *8*(2), 277.

8- Bartel, D. P. J. c. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297.

9- Bazarbachi, A., Suarez, F., Fields, P., & Hermine, O. J. B. (2011). How I treat adult T-cell leukemia/lymphoma. *blood*-2011-2003-345702.

10- Board, P. P. T. E. (2019) .Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Treatment (PDQ®). In *PDQ Cancer Information Summaries [Internet]*: National Cancer Institute (US).

11- Bonetti, P., Climent, M., Panebianco, F., Tordonato, C., Santoro, A., Marzi, M. J., Nicassio, F. J. O. (2019). Dual role for miR-34a in the control of early progenitor proliferation and commitment in the mammary gland and in breast cancer. *Oncogene*, *38*(3), 360.

12- Bourquin, J.-P., Subramanian, A., Langebrake, C., Reinhardt, D., Bernard, O., Ballerini, P., Hasle, H. J. P. o. t. N. A. o. S. (2006). Identification of distinct molecular phenotypes in acute megakaryoblastic leukemia by gene expression profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *103*(9), 3339-3344.

13- Bradbury, C., Khanim, F., Hayden, R., Bunce, C., White, D., Drayson, M., Turner, B. J. L. (2005). Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, *19*(10), 1751.

14- Buanne, P., Corrente, G., Micheli, L., Palena, A., Lavia, P., Spadafora, C., Quarto, M. J. G. (2000). Cloning of PC3B, a novel member of the PC3/BTG/TOB family of growth inhibitory genes, highly expressed in the olfactory epithelium. *Genomics*, *68*(3), 253-263.

15- Calin, G. A., & Croce, C. M. J. N. r. c. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nature reviews cancer*, *6*(11), 857.

16- Cannell, I., & Bushell, M. J. C. C. (2010). Regulation of Myc by miR-34c: A mechanism to prevent genomic instability? . *Cell Cycle*, *9*(14), 2798-2802.

17- Cheng, C.-Y., Hwang, C.-I., Corney, D. C., Flesken-Nikitin, A., Jiang, L., Öner, G. M., Nikitin, A. Y. J. C. r. (2014). miR-34 cooperates with p53 in suppression of prostate cancer by joint regulation of stem cell compartment. *Cell reports*, *6*(6), 1000-1007.

18- Davudian, S., Mansoori, B., Shajari, N., Mohammadi, A., & Baradaran, B. J. G. (2016). BACH1, the master regulator gene: A novel candidate target for cancer therapy. *Gene*, *588*(1), 30-37.

19- den Hoed, M. A., Pluijm, S. M., te Winkel, M. L., de Groot-Kruseman, H. A., Fiocco, M., Hoogerbrugge, P., Bresters, D. J. h. (2015). Aggravated bone density decline following symptomatic osteonecrosis in children with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*, 100(12), 1564-1570.

20- Deng, Z.-Q., Yin, J.-Y., Tang, Q., Liu, F.-Q., Qian, J., Lin, J., .pathology, e. (2014). Over-expression of miR-98 in FFPE tissues might serve as a valuable source for biomarker discovery in breast cancer patients. *International journal of clinical and experimental pathology*, *7*(3), 1166.

21- Engelman, J. A., Luo, J., & Cantley, L. C. J. N. R. G. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nature Reviews Genetics*, *7*(8), 606.

22- Esquela-Kerscher, A., & Slack, F. J. J. N. R. C. (2006). Oncomirs—microRNAs with a role in cancer. *Nature reviews cancer*, *6*(4), 259.

23- Hayden, E. C. J. N. (2008). Cancer complexity slows quest for cure. *Nature*, *455*(7210), 148-149.

24- Huffman, D. M., Grizzle, W. E., Bamman, M. M., Kim, J.-s., Eltoum, I. A., Elgavish, A., & Nagy, T. R. J. C. r. (2007). SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer research*, *67*(14), 6612-6618.

25- Hunger, S. P., Lu, X., Devidas, M., Camitta, B. M., Gaynon, P. S., Winick, N. J., Carroll, W. L. J. J .o. C. O. (2012). Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *Journal of Clinical Oncology*, *30*(14), 1663.

26- Ji, Q., Hao, X., Meng, Y., Zhang, M., DeSano, J., Fan, D., & Xu, L. J. B .c. (2008). Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC cancer*, *8*(1), 266.

27- Ji, Q., Hao, X., Zhang, M., Tang, W., Yang, M., Li, L., Fan, D. J. P. o. (2009). MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PloS one*, *4*(8), e6816.

28- Jiang, Q., Lu, X., Huang, P., Gao, C., Zhao, X., Xing, T., Zheng, H. J. B. r. i. (2018). Expression of miR-652-3p and effect on apoptosis and drug sensitivity in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *BioMed research international*, *2018*.

29- Jones, S., Zhang, X., Parsons, D. W., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Jimeno, A. J. s. (2008). Core signaling pathways in human pancreatic cancers revealed by global genomic analyses. *Science*, 321(5897), 1801-1806.

30- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell, 75*(5), 843-854.

31- L Lin, Z., & Fang, D. (2013). The roles of SIRT1 in cancer. Genes & cancer, 4(3-4), 97-104.

32- Litzow, M. R., & Ferrando, A. A. (2015). How I treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*, 126(7), 833-841.

33- Litzow, M. R., & Ferrando, A. A. J. B. (2015b). How we treat T-cell acute lymphoblastic leukemia in adults. *Blood*-2014-2010-551895.

34- Liu, Y., Yin, J., Abou-Kheir, W., Hynes, P ,. Casey, O., Fang, L., Sheppard-Tillman, H. J. O. (2013). MiR-1 and miR-200 inhibit EMT via Slug-dependent and tumorigenesis via Slug-independent mechanisms. *Oncogene*, 32(3), 296.

35- Liu, Z., Zhu, J., Cao, H., Ren, H., & Fang, X. J. I. j. o. o. (2012). miR-10b promotes cell invasion through RhoC-AKT signaling pathway by targeting HOXD10 in gastric cancer. *International journal of oncology*, 40(5), 1553-1560.

36- Lu, J., Getz, G., Miska, E. A., Alvarez-Saavedra, E., Lamb, J., Peck, D., Ferrando, A. A. J. n. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, *435*(7043), 834.

37- Luo, Y., Chen, J.-J., Lv, Q., Qin, J., Huang, Y.-Z., Yu, M.-H., & Zhong, M. J. C. l. (2019). Long non-coding RNA NEAT1 promotes colorectal cancer progression by competitively binding miR-34a with SIRT1 and enhancing the Wnt/β-catenin signaling pathway. *Cancer letters*, *440*, 11-22.

38- Mellinghoff, I. K., Wang, M. Y., Vivanco, I., Haas-Kogan, D. A., Zhu, S., Dia, E. Q., Chute, D. J. J. N. E. J. o. M. (2005). Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *New England Journal of Medicine*, 353(19), 2012-2024.

39- Miao, M.-h., Ji, X.-q., Zhang, H., Xu, J., Zhu, H., & Shao, X.-j. J. O. (2016). miR-590 promotes cell proliferation and invasion in T-cell acute lymphoblastic leukaemia by inhibiting RB1. *Oncotarget*, *7*(26), 39527.

40- Mraz, M., Malinova, K., Kotaskova, J., Pavlova, S., Tichy, B., Malcikova, J., Doubek, M. J. L. (2009). miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*, *23*(6), 1159.

41- Mullighan, C. G. J. A. E. P. B. (2014). The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *ASH Education Program Book*, *2014*(1), 174-180.

42- Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F. J., Sahin, A. A., Nguyen, N. T. J. C. c. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer cell*, *6*(2), 117-127.

43- Okada, N., Lin, C.-P., Ribeiro, M. C., Biton, A., Lai, G., He, X., development. (2014). A positive feedback between p53 and miR-34 miRNAs mediates tumor suppression. *Genes & development*, *28*(5), 438-450.

44- Ors-Kumoglu, G., Gulce-Iz, S., & Biray-Avci, C. J. C. (2019). Therapeutic microRNAs in human cancer. *Cytotechnology*, *71*(1), 411-425.

45- Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C.-H., Leary, R. J., Angenendt, P., Gallia, G. L. J. S. (2008). An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science*, *321*(5897), 1807-1812.

46- Pillarisetti, S. J. R. p. o. c. d. d. (2008). A review of Sirt1 and Sirt1 modulators in cardiovascular

and metabolic diseases. *Recent patents on cardiovascular drug discovery*, *3*(3), 156-164.

47- Slabáková, E., Culig, Z., Remšík, J., & Souček, K. (2017). Alternative mechanisms of miR-34a regulation in cancer. *Cell death & disease*, 8(10), e3100.

48- Stünkel, W., Peh, B. K., Tan, Y. C., Nayagam, V. M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Wood, J. J. B. J. H. N. T. (2007). Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, *2*(11), 1360-1368.

49- Tsang, T. Y., Tang, W. Y., Chan, J. Y. W., Yeung, C. L. A., Yau, P. L., Kong, S. K., Kwok, T. T. J. A. (2011). P-glycoprotein enhances radiation-induced apoptotic cell death through the regulation of miR-16 and Bcl-2 expressions in hepatocellular carcinoma cells. *Apoptosis*, 16(5), 524-535.

50- Vadillo, E., Dorantes-Acosta, E., Pelayo, R., & Schnoor, M. J. B. r. (2018). T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): new insights into the cellular origins and infiltration mechanisms common and unique among hematologic malignancies. *Blood reviews*, *32*(1), 36-51.

51- Van Vlierberghe, P., & Ferrando, A. J. T. J. o. c. i. (2012). The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *The Journal of clinical investigation*, *122*(10), 3398-3406.

52- Yamakuchi, M., Ferlito, M., & Lowenstein, C. J. J. P. o. t. N. A .o. S. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *105*(36), 13421-13426.

53- Yin, Y., & Shen, W. J. O. (2008). PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene*, *27*(41), 5443.

54- Zand, A., Sa'adati, M., Borna, H., Ziaei, R., & Honari, H. J. K. M. J. (2010). Effect of age, gender and blood group on blood cancer types. *Kowsar Medical journal*, *15*(2), 111-114.

MicroRNA-34a regulates T-cell acute lymphoblastic leukemia progression by targeting BACH1 ،PTEN and SIRT1 genes.

Najjary Sh.,[1] Mohammadzadeh R.[1] and Baradaran B.[2]

[1] Dept. of Cell and Molecular Biology, Faculty of Science, University of Maragheh, Maragheh, I.R. of Iran.

[2] Immunology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, I.R. of Iran.

Abstract

T-cell acute lymphoblastic leukemia is a lymphoid malignancy affected by oncogenic transformation of immature T-cell progenitors. Recently, it has been reported that microRNAs play a role in various leukemia including T-ALL. The aberrant expression of these microRNAs in proliferation, invasion, and apoptosis has been reported through targeting signal paths. MiR-34a is a tumor suppressor in many cancers, including T-ALL. The aim of this study was to investigate the regulatory role of miR-34a in the development of acute T-cell lymphoblastic leukemia cells by targeting the BACH1, PTEN and SIRT1 genes. In this experimental study, Jurkat T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) cells were maintained in RPMI 1640. MiR-34a mimic was transfected using jetPEI in vitro DNA transfection reagent. RNA extraction and cDNA synthesis were performed after 24 h. Expression of miR-34a and BACH1, PTEN and SIRT1 genes were examined using qRT-PCR. The results were analyzed by Graph Pad Prism 6 software and Sidak and Turkey test. QRT-PCR analyses showed that the expression levels of BACH1 and SIRT1 oncogene genes reduced and the expression of PTEN tumor suppressor gene increased after the transfection with miR-34a.

Key words: T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), miR-34a, BACH1, PTEN, SIRT1