

بررسی بیان RNA غیرکدکننده طویل HOTAIR در مبتلایان به لوسمی میلوئیدی مزمن

مونا آقامحمدحسین تجریشی^۱، دکتر امیر آتشی^۲، دکتر مسعود سلیمانی^۳، الهام سجادی^۱، دکتر پرویز فلاح^۴،

دکتر سعید کاویانی^۳، دکتر سعید آبرون^۳

نویسنده‌ی مسئول: گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود atashia@gmail.com

دریافت: ۹۴/۸/۳۰ پذیرش: ۹۵/۸/۱۷

چکیده

زمینه و هدف: RNA های غیرکدکننده طویل (lncRNA)، گروه جدیدی از RNA غیرکدکننده هستند که امروزه در مقیاس ژنومی گسترده‌ای مورد مطالعه قرار گرفته‌اند. lncRNA ها نقش‌های بیولوژیکی متنوعی در زمینه‌ی بیان ژن، تمایز سلولی و بیماری‌زایی دارند. مطالعات اخیر نقش مهم lncRNA ها را در سرطان‌ها از جمله بدخیمی‌های خونی نشان داده‌اند، که می‌توانند ابزاری جهت تشخیص و پیش‌آگهی بسیاری از بیماری‌ها و به‌عنوان یک جایگزین درمانی محسوب شوند. این تحقیق به بررسی بیان RNA غیرکدکننده طویل HOTAIR در لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) که یک اختلال بدخیم در سلول بنیادی خون‌ساز است، می‌پردازد.

روش بررسی: نمونه خون محیطی از ۳۰ فرد مبتلا به CML و ۲۰ فرد سالم جمع‌آوری شد. بیماران انتخاب‌شده هیچ‌گونه سابقه‌ی گرفتن درمان نداشتند و در همگی، آزمون BCR-ABL مثبت بود. انتخاب افراد سالم بر مبنای برابری سن و جنس با بیماران بود، و سابقه‌ی ابتلا به بیماری‌های زمینه‌ای را نیز نداشتند. RNA نام از افراد بیمار و سالم استخراج و سطح بیان ژن HOTAIR با استفاده از تکنیک qRT-PCR سنجیده شد.

یافته‌ها: با مقایسه کمی بیان ژن در بین دو گروه بیمار و نرمال مشخص گردید، بیان ژن HOTAIR در بیماران مبتلا به CML در مقایسه با افراد سالم افزایش معنی‌داری دارد (۰/۰۵).

نتیجه‌گیری: یافته‌های ما نشان داد که تغییر در بیان ژن HOTAIR می‌تواند در بیولوژی لوسمی میلوئیدی مزمن دخالت داشته باشد.

واژگان کلیدی: RNA های غیرکدکننده طویل، HOTAIR، لوسمی میلوئیدی مزمن، واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی

مقدمه

فعالیت تیروزین کینازی محصول انکوپروتئین ژن کایمیریک BCR-ABL است. پروتئین BCR-ABL پیغام‌های تحریکی خود را از طریق شبکه‌ای پیچیده متشکل از مسیرهای مولکولی انتقال داده و موجب کاهش مرگ برنامه‌ریزی شده

لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) یک اختلال بدخیم در سلول بنیادی خون‌ساز با شاخص ژنتیکی کروموزوم فیلادلفیا (در ۹۵ درصد موارد) و تکثیر بیش از حد سلول‌های رده‌ی میلوئیدی است. افزایش سلول‌های رده‌ی میلوئیدی در اثر

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

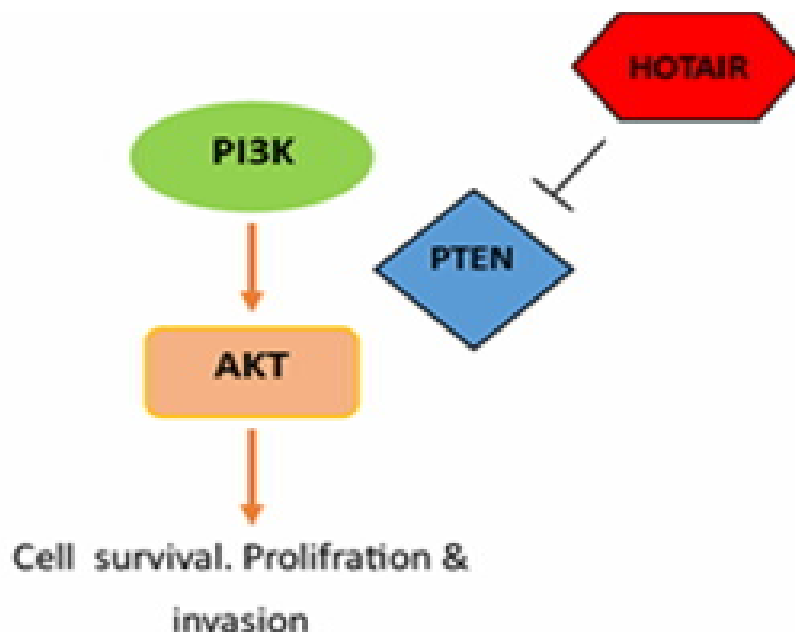
۲- دکترای تخصصی خون‌شناسی، استادیار گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده‌ی پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شاهرود، شاهرود

۳- دکترای تخصصی خون‌شناسی، دانشیار گروه خون‌شناسی، دانشکده‌ی علوم پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران

۴- دکترای تخصصی خون‌شناسی، استادیار گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی البرز، کرج

متابولیسم سلولی می شود (۲). ژن PTEN، که از ژن های مهارکننده ی تومور است، مهارکننده ی مسیر سیگنالینگ PI3K است. از تنظیم خارج شدن ژن PTEN در تعدادی از بدخیمی های انسانی، مانند لوسمی میلوئیدی مزمن گزارش شده است، و متیلاسیون نابجا در ژن های مهارکننده ی تومور مرتبط با پیشرفت سرطان است (۳-۵) (شکل ۱).

سلول (آپتوز) و افزایش روند تکثیر می گردد (۱). مسیر انتقال پیام PI3K، یکی از مسیرهای تیروزین کینازی دخیل در اختلال CML است، که افزایش فعالیت آن بر روند تکثیر رده ی میلوئیدی تاثیرگذار است. این مسیر دارای فعالیت بسیار زیادی در طیف وسیعی از سرطان ها است. افزایش فعالیت این مسیر تیروزین کینازی منجر به افزایش تقسیم، تمایز، بقا و



شکل ۱: شکل فوق نشان دهنده تاثیر HOTAIR بر PTEN است. بیان ژن HOTAIR اثر مهاری بر PTEN دارد، که نتیجه ی آن افزایش فعالیت مسیر PI3K در تکثیر بیش از حد سلول های رده ی میلوئیدی در بیماری CML است.

بالاست و مکانیسم های پاتوژنیک دخیل در این بیماری اثر مهاری بر روش های درمانی دارد (۸-۶). یکی از راه های مطالعه کنترل تمایز در سرطان های خون استفاده از رده های سلولی مشتق شده از سلول های سرطانی است. K562 اولین رده ی سلولی نامیرا است که در لوسمی میلوئید مزمن مورد استفاده قرار گرفت. سلول های K562 از نوع اريترولوکمی می باشند، ژن الحاقی BCR/ABL در این سلول ها مثبت است (۹ و ۱۰). ژنوم پستانداران شامل توالی های کدکننده (کمتر از ۲ درصد کل ژنوم) و غیرکدکننده (بیش از

لوسمی میلوئیدی مزمن شایع ترین اختلال میلوپرولیفراتیو بوده و حدود ۱۵ تا ۲۰ درصد موارد جدید تشخیص لوسمی را بین بیماری بزرگسالان به خود اختصاص می دهد. میزان شیوع بیماری ۱ تا ۱/۶ در ۱۰۰۰۰۰ نفر در سال است. احتمال وقوع بیماری در هر سنی وجود دارد، اما پیک آن در سن ۵۰ تا ۷۰ سالگی است و تنها ۳ درصد موارد در کودکان اتفاق می افتد. روش های درمانی شامل رادیوتراپی و استفاده از مواد آلکیله کننده به ویژه بوسولفان و مهارکننده ی تیروزین کیناز است. با وجود درمان های موجود میزان مرگ و میر در این بیماران

قابل توجهی بالا است (۲۲-۱۸). سطح بیان ژن HOTAIR از lncRNA های مشتق شده از ژن های کلاستر HOX، در سرطان های مختلفی مورد مطالعه قرار گرفته است. ژن HOTAIR، واقع بر کلاستر HOXC، در ارتباط با PRC2 است و از طریق مدیفیکاسیون هیستون ها دارای اثر مهار بر روی ژن های کلاستر HOXD است (۲۴ و ۲۳). همچنین ژن HOTAIR با متیلاسیون نواحی CPG در پروموتور PTEN باعث مهار این ژن شده و در نهایت موجب افزایش فعالیت تیروزین کینازی و افزایش تومورزایی می گردد (۲۵).

برای اولین بار در این مطالعه، به بررسی بیان ژن غیرکدکننده ی طویل HOTAIR در ۳۰ بیمار مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن و رده ی سلولی K562 پرداخته شده است. همچنین نسبت بیان این ژن بین دو گروه بیمار و سالم مورد بررسی قرار گرفته است.

روش بررسی

تهیه گروه های مورد آزمایش: مطالعه ی انجام شده از نوع تجربی بود و بر روی ۳۰ نمونه خون محیطی از بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن مراجعه کننده به آزمایشگاه پیوند، پس از کسب رضایت و پر کردن فرم های رضایت نامه توسط بیمار انجام گرفت. نکاتی که در انتخاب بیماران مدنظر قرار گرفت، عدم مصرف قرص های مهارکننده ی تیروزین کیناز (مانند ایماتینیب) و یا عدم گرفتن سابقه ی درمان دیگر و همچنین مثبت بودن نتایج آزمون BCR/ABL در همه ی این بیماران بود. بیماران سابقه ی مصرف دارو و یا بیماری زمینه ای خاصی نداشتند. میانگین سنی بیماران ۴۵ سال، و نسبت جنسیت زن به مرد ۱ به ۴ بود.

همچنین در این مطالعه ۲۰ نمونه خون محیطی از افراد سالم به صورت داوطلب گرفته شد که همگی از سلامت کامل برخوردار بودند. معیار انتخاب این افراد بر مبنای سن و جنس ایشان و بر اساس یکسان سازی با بیماران بود.

۹۰ درصد کل ژنوم) است. توالی های کدکننده و غیرکدکننده با همکاری یکدیگر موجب ساخت، سازمان دهی ساختارهای سلولی و تنظیم الگوهای بیان ژن می شوند و در نهایت باعث تعیین هویت سلول و عملکرد آن می شوند. توالی های غیرکدکننده فاقد ظرفیت برای سنتز پروتئین است و در طیف گسترده ای از اعمال سلولی شرکت می کنند. این وظایف شامل: سازمان دهی سنتز پروتئین (مانند RNA ریپوزومی و tRNA)، تنظیم سنتز پروتئین (مانند MicroRNA ها) و تنظیم بیان ژن در سطوح رونویسی و پس از رونویسی (مانند Long non coding RNA ها) است (۱۳-۱۱). LncRNA ها اخیراً در مقیاس ژنومی وسیعی شناسایی شده اند و تنها بخش کوچکی از عملکردشان تا به امروز شناخته شده است. LncRNA ها بیش از ۲۰۰ نوکلئوتید طول دارند و توسط RNA پلیمراز II رونویسی می شوند. LncRNA های انسانی در طیفی از فرایندهای بیولوژیکی شرکت می کنند، این فرایندها شامل: اپی ژنتیک، پردازش فرعی، تخریب RNA و ترجمه است. مطالعات به دست آمده اختلال در تنظیم بیان LncRNA ها را در سرطان های متعددی نشان داده است، و این مطلب بیان کننده ی آن است که LncRNA ها می توانند نقش بالقوه ای را به عنوان انکوژن و یا مهارکننده ی تومور داشته باشند (۱۶-۱۴). شواهدی دال بر این موضوع وجود دارد که سطح بیان LncRNA ها در نمونه های بیمار در مقایسه با نمونه های افراد سالم متفاوت است (۱۷).

ژن HOTAIR یکی از بیشترین LncRNA هایی است که در اصلاح ژنوم مورد مطالعه قرار گرفته است. جایگاه کروموزومی رونوشت HOTAIR بین HOXC11 و HOXC12 است، اما عملکرد آن مهار گروه های دیستال ژن های HOXD همولوگ در ترانس است. تاثیر HOTAIR بر بیان ژن، به واسطه ی مدیفیکاسیون هیستونی است. مطالعات نشان داده اند که میزان بیان ژن HOTAIR در سرطان های سینه سلول های کبدی، کارسینومای حنجره، کولورکتال و پانکراس به طور

جداسازی لایه بافی کوت: ۵ میلی‌متر از نمونه‌ی خون بیماران مبتلا به CML و افراد سالم را در لوله‌های حاوی ضد انعقاد EDTA ریخته، و به مدت ۵ دقیقه در دور ۱۲۰۰ سانتریفیوژ شد و در ادامه پس از دور ریختن پلاسما، لایه سفید تشکیل شده بین پلاسما و گلبول‌های قرمز (بافی کوت) جدا گردید. لایه‌ی بافی کوت از تمام نمونه‌ها استخراج شده و سپس محلول گوانیدیوم تیوسیانات (Guanidinium Thiocyanate) به آن‌ها اضافه شد و فوراً به ۷۰- درجه‌ی سانتی‌گراد منتقل شدند.

کشت سلولی: به منظور انجام کشت سلول، رده سلولی K562 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد. سپس به منظور کسب اطمینان تست BCR/ABL بر روی رده‌ی سلولی K562 انجام گرفت. سلول‌ها در محیط کشت RPMI 1640 همراه با FBS ۱۰ درصد کشت داده شدند و در حرارت ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد همراه با CO₂ ۵ درصد و رطوبت انکوباتور

نگهداری شد. هر ۲ تا ۴ روز یک بار محیط آن‌ها تعویض شدند و پس از پاساژ سوم و رشد کافی سلول‌ها، شمارش سلولی انجام و برای استخراج RNA استفاده گردید.

استخراج RNA: پس از تهیه‌ی نمونه‌ها، به منظور مقایسه بیان ژن HOTAIR در بافی کوت بیماران مبتلا به CML و نمونه‌های خون محیطی افراد سالم و رده‌ی سلولی K562، Total RNA با بهره‌گیری از (CinnaGen Inc, Iran) RNXTM(plus) بر پایه اختلاف فاز فنل کلروفرم استخراج گردید. جهت بررسی کنترل کیفی RNA استخراج شده، مقدار و خلوص RNA استخراج شده به واسطه جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر سنجیده شد. نتایج استخراج RNA از لحاظ غلظت و درجه خلوص، از طریق نسبت جذب در طول موج ۲۶۰ نانومتر به ۲۸۰ نانومتر، در رده سلولی K562 و نمونه بیماران مبتلا به CML و افراد نرمال مطابق جدول ۱ است.

جدول ۱: نتایج میانگین استخراج RNA در رده سلولی K562 و نمونه افراد مبتلا به CML و افراد نرمال

نمونه RNA	غلظت (ng/μl)	OD(۲۶۰/۲۳۰)	OD(۲۶۰/۲۸۰)
K562	۷۵۰	۱/۶	۱/۷۳
CML	۵۵۰ - ۲۳۰۰	۱/۴ - ۲	۱/۷ - ۲
Normal	۳۰۰ - ۱۱۵۰	۱/۱ - ۱/۸	۱/۸ - ۲

واکنش رونویسی معکوس (RT-PCR): پس از تعیین میزان خلوص RNA به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر، مقدار ۵ میکروگرم RNA برای ساخت cdNA مورد استفاده قرار گرفت. سنتز cdNA با استفاده از کیت سنتز cdNA (CinnaGen Inc, Iran) از رده سلولی K562، نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به CML و نمونه‌های خون محیطی افراد سالم با استفاده از آنزیم M-MLV و پرایمر Oligo (dt) انجام گرفت.

واکنش زنجیره‌ای پلیمرز (PCR): بیان ژن کیفی HOTAIR در رده‌ی سلولی K562، بر روی نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به CML و نمونه‌های خون محیطی افراد سالم با استفاده از EmeraldAmp MAX PCR (Takara Inc., Japan) انجام گردید. توالی پرایمرهای رفت و برگشت مورد نیاز، مطابق جدول ۲ بر اساس استفاده از نرم‌افزار AlellID طراحی و سنتز گردید. از β-Actin به عنوان کنترل داخلی PCR استفاده گردید. حجم نهایی واکنش ۱۳ میکرولیتر بود. فرآیند

انتهایی ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه صورت پذیرفت. محصول نهایی PCR در ژل آگارز ۲ درصد الکتروفورز شده و با اتیدیوم بروماید مورد ارزیابی قرار گرفت.

PCR نیز بدین ترتیب انجام شد: ۹۵ درجه سانتی‌گراد ۱ دقیقه، ۴۰ چرخه شامل ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد ۴۰ ثانیه، دمای آنیلینگ (Annealing) به مدت ۴۰ ثانیه و ۷۲ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه برنامه‌ریزی شده و نهایتاً دمای بسط

جدول ۲: توالی پرایمرهای به کار رفته در این مطالعه برای Real-time PCR

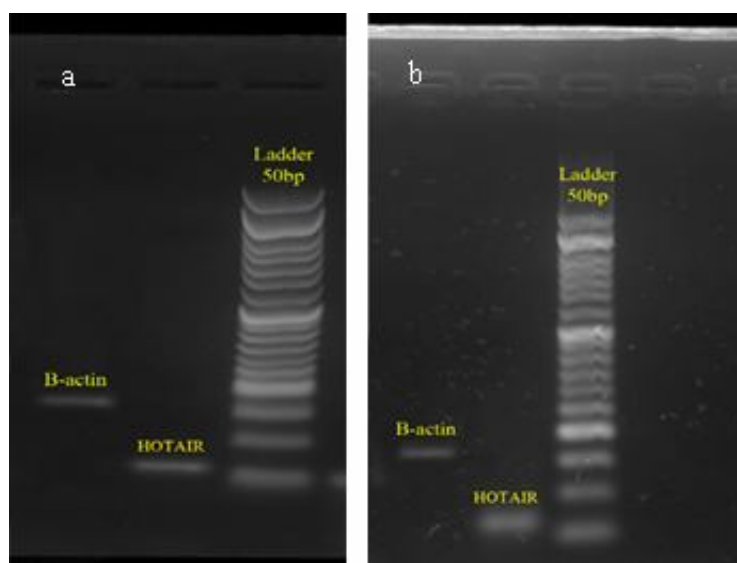
پرایمر	توالی پرایمر	دمای انیلینگ (C°)	طول محصول (bp)
HOTAIR (F)	5' GAAAGCTTCCACAGTGAGGACT 3'	۶۰	۶۸
HOTAIR (R)	5' AAATCCGTTCCATTCCACTG 3'		
β -Actin(F)	5' TGAAGATCAAGATCATTGCTCCC 3'	۶۰	۱۶۸
(R) β -Actin	5' AGTCATAGTCCGCCTAGAAGC 3'		

و نتایج Quantitative Reverse Transcriptase PCR به صورت بیان نسبی ژن گزارش گردید. میانگین Ct ها با استفاده از نرم‌افزار SSPS۲۱ مورد بررسی قرار گرفت و از آزمون t-test مستقل برای تمامی داده‌ها و در نظر گرفتن $P < 0.05$ برای معناداری نتایج استفاده شد. برای بررسی میزان اختلاف داده‌ها از میانگین از شاخص پراکندگی انحراف معیار (SD) استفاده شد.

یافته‌ها

نتایج حاصل از بررسی کیفی بیان ژن‌های HOTAIR و β -actin: بیان کیفی ژن HOTAIR و β -actin، با استفاده از تکنیک RT-PCR ارزیابی گردید. طول محصول PCR برای HOTAIR با توجه به پرایمر طراحی شده ۶۸ bp و طول ژن β -actin با توجه به پرایمر طراحی شده ۱۶۸ bp است که تصویر باندهای مذکور در شکل ۲ قابل مشاهده است. نتایج نشان داد که رده‌ی سلولی K562 و همچنین نمونه بیماران CML دارای بیان ژنی HOTAIR می‌باشند.

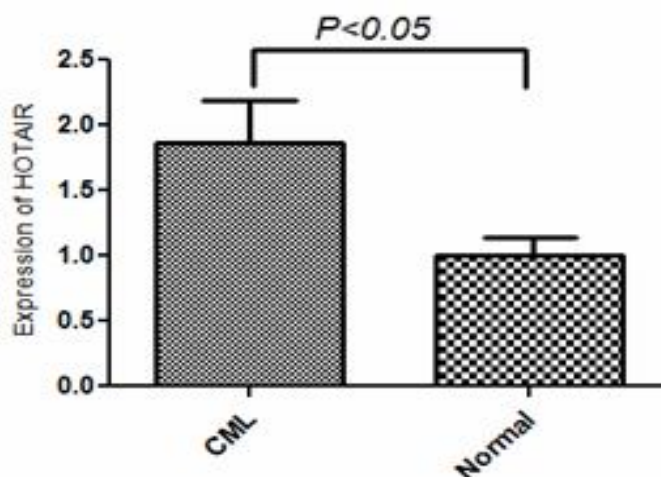
واکنش زنجیره‌ای پلیمرز کمی (Real-time PCR): بیان کمی ژن HOTAIR در رده سلولی K562، نمونه‌های خون محیطی افراد مبتلا به CML و نمونه‌های خون محیطی افراد سالم، با استفاده از RealQ (Ampliqon, Denmark) SYBR PCR 2 x Master Mix و StepOne system، به Real Time PCR Applied BioSystem, USA) صورت دو بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت. توالی پرایمرهای مورد استفاده در Real Time PCR برای ژن HOTAIR همان توالی مورد استفاده در RT-PCR است که در جدول ۲ آورده شده است. همچنین ژن بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی و نرمالایزر مورد استفاده قرار گرفت. حجم نهایی واکنش ۱۳ میکرولیتر بود و مطابق برنامه‌ی تغییرات دمایی به شرح زیر انجام گرفت: ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۱۵ ثانیه و ۶۰ درجه‌ی سانتی‌گراد به مدت ۶۰ ثانیه. اختصاصی بودن محصولات PCR از طریق آنالیز منحنی ذوب مورد تایید قرار گرفت. برای بررسی‌های آماری داده‌های به دست آمده از Real Time PCR، در ابتدا با فرمول $2^{-\Delta\Delta CT}$ میزان بیان ژن HOTAIR نسبت به β -Actin نرمال سازی شد



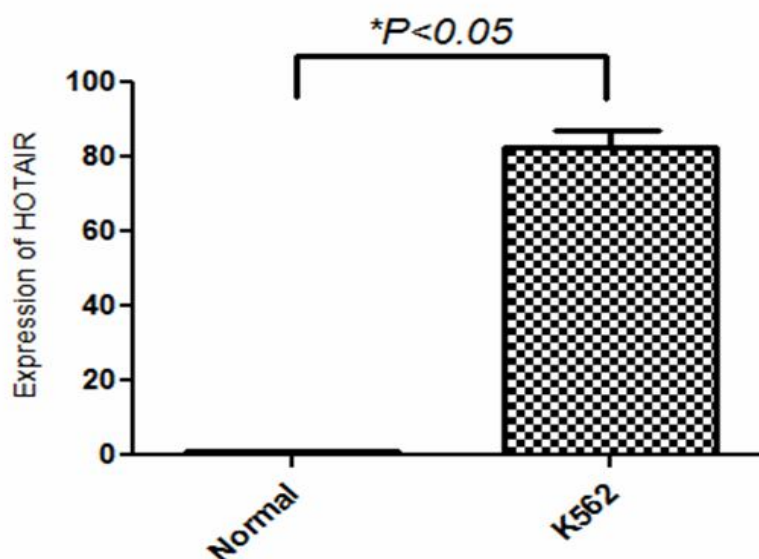
شکل ۲: بررسی کیفی بیان ژن HOTAIR و β -actin در رده سلولی K562 (a) و نمونه بیمار CML (b)

نتایج حاصل از بررسی کمی بیان ژن HOTAIR: در مطالعه حاضر پس از استخراج RNA از رده‌ی سلولی K562، نمونه‌های افراد مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن و نمونه‌های نرمال، سنتز cDNA انجام شد. واکنش Real time PCR برای بررسی کمی ژن HOTAIR و ژن بتا اکتین

بروی cDNA های تهیه شده، انجام شد. نتایج حاصل از Real time PCR نشان داد که بیان ژن HOTAIR در بیماران CML در مقایسه با افراد سالم دارای افزایش بیانی معادل ۱/۸۶ برابر بوده و نیز معناداری آماری در سطح $P < 0.05$ وجود دارد (شکل ۳).



شکل ۳: بررسی کمی بیان ژن غیرکدکننده HOTAIR در سلول‌های بیماران CML



شکل ۴: بررسی کمی بیان ژن غیرکدکننده *HOTAIR* در رده سلولی K562

هم از طریق تنظیم تومورسایپرسورها و هم تنظیم مسیرهای انکوژنتیک را نشان می دهد (۲۶). یکی از اهداف کلیدی برای پیشرفت های آینده، شناسایی LncRNA هایی است که می توانند به صورت بالقوه به عنوان بیومارکرهایی برای وضعیت های خاص بیماری استفاده شوند (۱۶-۱۴).

در مطالعه ی حاضر، سطح بیان ژن *HOTAIR* با توجه به نقش مهاری آن در ارتباط با ژن *PTEN*، در لوسمی میلوئیدی مزمن (CML) بررسی گردید. تا کنون مطالعه ی مشابهی که به بررسی بیان ژن *HOTAIR* در لوسمی میلوئیدی مزمن پرداخته شده باشد، انجام نگرفته است. نتایج به دست آمده در مطالعه ی حاضر مشابه آنچه در سرطان های سینه، کبد، کولورکتال، حنجره و ریه گزارش شده است، تایید کننده این حقیقت است که میزان بیان ژن *HOTAIR* در بیماران مبتلا به لوسمی میلوئیدی مزمن نسبت به افراد سالم دارای افزایش (up-regulated) معنی داری است. این الگوی بیان در CML می تواند نشان دهنده ی وجود نقش بالقوه این RNA تنظیمی در بیولوژی این سرطان باشد و لذا یافته های این مطالعه که

همچنین آنالیز بیان ژن *HOTAIR* در رده ی سلولی K562 در مقایسه با CT میانگین افراد سالم با استفاده از فرمول $2^{-\Delta\Delta Ct}$ انجام گرفت. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود، افزایش بیانی معادل ۸۲/۶ برابر در K562 نسبت به میانگین افراد سالم وجود دارد ($P < 0.05$).

بحث

اختلال در انکوژن ها یا غیرفعال شدن ژن های سرکوبگر تومور نقش محوری در پاتوژن بیماری های بدخیم دارد. در بسیاری از انواع سرطان ها، مخصوصا لوسمی ها و لنفوم ها، توصیف دقیق این اختلالات می تواند مبنایی بر طبقه بندی این اختلالات و فهم درستی از پیش آگهی این بیماری ها در اختیار محققین قرار دهد. علاوه بر این شناسایی دقیق اهداف این اختلالات درک ما را از مکانیسم تومورزایی بالا می برد و منجر به طراحی روش های مولکولی در تشخیص بیماری ها و نظارت بر درمان آن ها می گردد. مطالعاتی که تاکنون انجام شده شواهد روبه رشدی از نقش های مهم ncRNA ها در سرطان،

HOTAIR می‌تواند در بیولوژی لوسمی میلوئیدی مزمن دخالت داشته باشد. اثبات این موضوع با انجام آزمایشات بیشتر در سطح سلولی و ملکولی، می‌تواند موضوع مطالعات آینده باشد.

تقدیر و تشکر

نویسندگان مقاله بر خود لازم می‌دانند از ریاست و کلیه پرسنل مرکز تحقیقات فناوری بن یاخته که همکاری صمیمانه در این پژوهش داشته‌اند، تقدیر و تشکر به عمل آورند.

به‌عنوان اولین قدم در بررسی این RNA تنظیمی در سرطان‌های خون انجام شد، می‌تواند از نقش احتمالی ژن HOTAIR خبر داده و نیاز به بررسی بیشتر این RNA در این نوع سرطان را قوت بخشد. این الگوی بیان می‌تواند دریچه‌ای برای انجام مطالعات بیشتر در راستای کشف عملکرد این RNA تنظیمی باشد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان داد که تغییر در بیان ژن

References

- Hoffbrand V, Higgs DR, Keeling DM, Mehta AB. Postgraduate haematology. New Jersey: John Wiley & Sons; 2016.
- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2002; 2: 489-501.
- Stambolic V, Suzuki A, De La Pompa JL, et al. Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell*. 1998; 95: 29-39.
- Peng C, Chen Y, Yang Z, et al. PTEN is a tumor suppressor in CML stem cells and BCR-ABL-induced leukemias in mice. *Blood*. 2010; 115: 626-35.
- Blume-Jensen P, Hunter T. Oncogenic kinase signalling. *Nature*. 2001; 411: 355-65.
- Sawyers CL. Chronic myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1999; 340: 1330-40.
- Sokal JE, Cox EB, Baccarani M, et al. Prognostic discrimination in "good-risk" chronic granulocytic leukemia. *Blood*. 1984; 63: 789-99.
- O'Dwyer ME, Mauro MJ, Druker BJ. Recent advancements in the treatment of chronic myelogenous leukemia. *Annu Rev Med*. 2002; 53: 369-81.
- Andersson LC, Nilsson K, Gahrberg CG. K562—a human erythroleukemic cell line. *Int J Cancer*. 1979; 23: 143-7.
- Klein E, Vánky F, Ben - Bassat H, et al. Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *Int J Cancer*. 1976; 18: 421-31.
- Khalil AM, Collier J. Molecular Biology of Long Non-coding RNAs: Springer; 2013.
- Zuckerandl E, Cavalli G. Combinatorial epigenetics, "junk DNA", and the evolution of complex organisms. *Gene*. 2007; 390: 232-42.

- 13- Lu J, Getz G, Miska EA, et al. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*. 2005; 435: 834-8.
- 14- Gibb EA, Brown CJ, Lam WL. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol Cancer*. 2011; 10: 1-17.
- 15- Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Song Y. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett*. 2013; 339: 159-66.
- 16- Ponting CP, Oliver PL, Reik W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*. 2009; 136: 629-41.
- 17- Szymanski M, Barciszewska MZ, Erdmann VA, Barciszewski J. A new frontier for molecular medicine: noncoding RNAs. *Biochim Biophys Acta*. 2005; 1756: 65-75.
- 18- Woo CJ, Kingston RE. HOTAIR lifts noncoding RNAs to new levels. *Cell*. 2007; 129: 1257-9.
- 19- Yang Z, Zhou L, Wu L-M, et al. Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann Surg Oncol*. 2011; 18: 1243-50.
- 20- Nakagawa T, Endo H, Yokoyama M, et al. Large noncoding RNA HOTAIR enhances aggressive biological behavior and is associated with short disease-free survival in human non-small cell lung cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013; 436: 319-24.
- 21- Kogo R, Shimamura T, Mimori K, et al. Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res*. 2011; 71: 6320-6.
- 22- Tang L, Zhang W, Su B, Yu B. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *BioMed Res Int*. 2013; 2013.
- 23- Sun G, Alzayady K, Stewart R, et al. Histone demethylase LSD1 regulates neural stem cell proliferation. *Molec Cell Biol*. 2010; 30: 1997-2005.
- 24- Tsai M-C, Manor O, Wan Y, et al. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*. 2010; 329: 689-93.
- 25- Li D, Feng J, Wu T, et al. Long Intergenic Noncoding RNA HOTAIR Is Overexpressed and Regulates PTEN Methylation in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. *Am J Pathol*. 2013; 182: 64-70.
- 26- Han B-W, Chen Y-Q. Potential pathological and functional links between long noncoding RNAs and hematopoiesis. *Sci Signal*. 2013; 6: re5-re.

Evaluating the Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR in Patients with Chronic Myeloid Leukemia

Aghamohammadhossein Tajrishi M¹, Atashi A², Soleimani M¹, Sajjadi E¹, Fallah P³, Kaviani S¹, Abroun S¹

¹Dept. of Hematology, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

²Dept. of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

³Dept. of Laboratory Sciences, Faculty of Allied Medicine, Alborz University of Medical Sciences, Karaj, Iran

Corresponding Author: Atashi A, Dept. of Basic Medical Sciences, Faculty of Medicine, Shahroud University of Medical Sciences, Shahroud, Iran

E-mail: atashia@shmu.ac.ir

Received: 21 Nov 2015 **Accepted:** 7 Nov 2016

Background and Objective: Long noncoding RNAs (lncRNAs) are a new class of non-coding RNAs that are currently being studied extensively. LncRNAs have many biological roles in gene expression, cell development and diseases. Recent studies showed that lncRNAs have an important role in cancers, including hematopoietic disorders which can be a tool for easier diagnosis and prognosis of many diseases and also a possible alternative treatment. This study investigates the expression of long non-coding RNA HOTAIR, in chronic myelogenous leukemia (CML).

Materials and Methods: Peripheral blood samples were collected from 30 patients with CML and 20 healthy controls. The selected patients had no history of treatment and all patients were positive for BCR-ABL. Healthy controls were chosen based on similarity with the patients' age and gender and had no history of disease. Total RNA was extracted from the patients and healthy controls and HOTAIR gene expression levels were measured using qRT-PCR technique.

Results: Quantitative comparison of gene expression between the patients and normal controls showed that HOTAIR gene expression in patients with CML is significantly increased compared to healthy individuals ($p < 0.05$).

Conclusion: Our findings showed that changes in the expression of HOTAIR gene can be involved in the biology of chronic myeloid leukemia.

Keyword: LncRNAs, HOTAIR, Chronic Myeloid Leukemia, qRT-PCR