

## بررسی ارتباط بین اثر افزایشی mir-210 و بیان زنجیره گاما هموگلوبین

دکتر سید امیرحسین امامی<sup>۱</sup>، شاهین محمدی<sup>۲</sup>، دکتر سعید کاویانی<sup>۳</sup>

دکتر مسعود سلیمانی<sup>۳</sup>، دکتر شعبان علیزاده<sup>۴</sup>، احترام دژبخش<sup>۵</sup>

فاطمه کوهکن<sup>۶</sup>، مجید مصاحبی<sup>۷</sup>، دکتر حسین درگاهی<sup>۸</sup>

### چکیده

**زمینه و هدف:** microRNA ها دسته‌ای از RNAهای کوچک غیر کدکننده‌ای هستند که در فرآیندهای متعدد سلولی از قبیل تکثیر، تمایز، آپوپتوز و سرطان نقش دارند. مطالعات اخیر افزایش miR-210 را در طی تمایز پیش سازهای خونی به رده اریترئیدی نشان داده‌اند. هدف از مطالعه حاضر بررسی تاثیر افزایشی MiR-210 بر تغییر بیان هموگلوبین گاما در رده سلولی k562 می‌باشد.

**روش بررسی:** ابتدا رده سلولی k562 در محیط RPMI1640 کشت داده شد. pre-miR-210 توسط لیپوفکتامین به سلول K562 انتقال داده شد. افزایش بیان pre-miR-210 با miRNA real time-PCR تایید شد سپس تغییر الگوی بیان هموگلوبین گاما در روز ۷ و ۱۴ با RT-PCR و real time pcr بررسی گردید.

**یافته‌ها:** نتایج نشان دادند که افزایش miR-210 در رده سلولی K562 باعث ۲۵٪ برابر افزایش بیان هموگلوبین گاما نسبت به نمونه کنترل می‌شود. آنالیز داده‌ها معنی دار بودن الگوی تغییرات بیان هموگلوبین گاما نسبت به سلول کنترل را نشان داد ( $p \leq 0.002$ ).

**نتیجه گیری:** بر اساس یافته‌ها افزایش miR-210 می‌تواند بیان زنجیره گاما را به طور چشمگیری افزایش دهد. از این رو پس از مطالعات تکمیلی، افزایش miR-210 می‌تواند هدف مناسبی در بهبود آنمی داسی و تالاسمی بتا باشد.

واژه‌های کلیدی: microRNA، miR-210، K562

\* نویسنده مسئول :

دکتر حسین درگاهی ؛

دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم

پزشکی تهران

Email :

Hdargahi@sina.tums.ac.ir

- پذیرش مقاله : آبان ۹۰

- دریافت مقاله : خرداد ۹۰

### مقدمه

علی رغم عملکرد اساسی miRNA ها در بیولوژی، ملکول‌های مذکور تا سال ۱۹۹۳ برای جهان علم ناشناخته بودند تا زمانی که Lin-4 در کرم C.Elegans توسط Lee شناسایی گردید. هفت سال بعد Let 7 در C.Elegans و توالی‌های مشابه در ژنوم یوکاریوتها شناسایی شدند. در سال ۲۰۰۱ برای اولین بار واژه miRNA برای نامگذاری این RNAهای کوچک بکار گرفته شد. تاکنون بالغ بر ۱۰۰۰ عدد miRNA در پروکاریوت‌ها و یوکاریوت‌ها شناخته شده‌است. سهم ژنوم انسان از این تعداد قریب به ۷۰۰ عدد می‌باشد. miRNA های بالغ ۲۴-۱۹ نوکلئوتید طول

Micro RNA ها ملکول‌های کوچکی از خانواده RNA هستند که دسته‌ای از مکانیسم‌های اپی ژنتیکی را پیش می‌برند.

<sup>۱</sup> دانشیار گروه خون و آنکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۲</sup> کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۳</sup> استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۴</sup> استادیار گروه هماتولوژی و بانک خون دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

<sup>۵</sup> کارشناس ارشد ایمونولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی شیراز

<sup>۶</sup> دانشجوی دکتری ژنتیک مولکولی دانشکده علوم زیستی دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۷</sup> کارشناس ارشد هماتولوژی و بانک خون دانشکده پزشکی دانشگاه تربیت مدرس

<sup>۸</sup> دانشیار گروه مدیریت خدمات بهداشتی درمانی دانشکده پیراپزشکی عضو مرکز تحقیقات

مدیریت اطلاعات سلامت دانشگاه علوم پزشکی تهران

(mitermysin) افزایش سطح mir-210 با افزایش تمایز اریترئیدی و بیان ژن هموگلوبین F مرتبط می‌باشد(۸).

رده سلولی K562 یک لاین سلولی برگرفته از لوسمی میلوئیدی مزمن بوده و این سلول‌ها خصوصیات اولیه اریتروسیستی نیز دارند. برخی از کلون‌های این رده سلولی قابلیت بیان میزان کمی از هموگلوبین‌های جنینی را دارند.

از آنجا که تغییرات میزان بیان زنجیره‌های هموگلوبین‌های مختلف به عنوان یکی از شایع‌ترین اختلالات ژنی انسان بوده و بیماری‌های گسترده را شامل می‌شوند، بنابراین شناسایی عواملی که قادر به افزایش بیان زنجیره‌های هموگلوبین‌های مختلف و اصلاح این اختلالات شوند، بسیار ارزشمند خواهند بود. لذا، در تحقیق مذکور، رده سلولی K 562 به عنوان مدلی برای مطالعه تاثیر افزایش بیان miR-210 در تغییرالگوی بیان زنجیره گاما انتخاب گردید تا در صورت کسب نتایج رضایت بخش مطالعات تکمیلی بعدی طراحی و اجرا شود.

## روش بررسی

### کشت سلولی

در تحقیق حاضر رده سلولی K562 جهت مطالعه از بانک سلولی ایران تهیه گردید.

سلولهای مذکور در محیط RPMI1640(Gibco,USA) حاوی FBS(Gibco) ۱۰٪ و در شرایط مناسب دمای ۳۷ درجه سانتیگراد، رطوبت حدود ۹۵٪ و CO2 ۵٪ پاساژ داده شدند.

پس از چند پاساژ سلولها از نظر درصد زنده بودن با تریپان بلو ارزیابی شدند که درصد زنده بودن آنها رضایت بخش و حدود ۹۸٪ بود. قبل از انتقال(Transfection) سلول‌ها به تعداد ۸۰۰۰۰ در

داشته، تک رشته‌ای و غیرکد بوده و بیان ژن هدف را از طریق اتصال به 3'UTR و احتمالاً 5'UTR mRNA تنظیم می‌کنند. در انسان حدود ۳۰-۱۰ درصد ژنوم توسط miRNA کنترل می‌گردد.

مولکول‌های مذکور در روندهای حیاتی سلول مانند تکثیر، پیری سلولی، آپوپتوز، متابولیسم و تمایز سلولی نقش دارند. الگوی بیان miRNA ها در بافت‌های مختلف متفاوت می‌باشد. تحقیقات اخیر نشان داده است که miRNA ها نقش اساسی در تنظیم خونسازی داشته و این کار را از طریق کنترل تنظیمات کلیدی مانند فاکتورهای خونسازی، گیرنده فاکتورهای رشد، گیرنده کموکین‌ها انجام می‌دهند و در نتیجه هرگونه بدتنظیمی یا مشکل در بیان آنها منجر به اختلالات خونی خواهد شد(۵-۱).

مطالعات متعددی بیان miRNA های مختلف را در طی تمایز اریترئیدی بررسی نمودند، اما اخیراً به نقش miR-210 به عنوان یک miRNA کلیدی در تمایز اریترئیدی توجه عمده‌ای معطوف شده است. miR-210 در بخش ایترونی یک ژن غیر کد کننده در کروموزم ۱۱ کد می‌شود. توالی mir-210 بالغ 66-CUGUGCGUGUGACAGCGGCGUGA-87 می‌باشد. این miRNA در طول بلوغ اریتروستی دچار افزایش بیان می‌شود.

Kosaka و همکاران(۲۰۰۸) با بررسی پروفایل بیانی بیش از ۳۰۰ miRNA مختلف نشان دادند که متعاقب افزودن اریتروپوئین بیان mir-188, 210,360 در رده سلولی UT7/Epo افزایش می‌یابد(۶).

Yang و همکاران(۲۰۰۹) با القای اریتروپوئز بواسطه همین رده سلولی K562 و سلولهای CD34+ بند ناف دریافتند که mir-126 در این سلول‌ها افزایش داشته و 18b, 130a,210, mir-103 با کاهش بیان مواجه است(۷). Bianchi و همکارانش نشان دادند که در سلولهای k562 درمان شده با میترمایسین

### استخراج RNA

روز هفتم پس از انتقال، نمونه‌های تست، کنترل منفی و کنترل جمع آوری گردیده و با استفاده از معرف استخراج (iNtRON) Biotechnology, Inc easy-blue RNA طبق پروتکل انجام گردید. سپس برای اطمینان از کمیت و کیفیت RNA استخراج شده، جذب نوری آن در طول موج‌های ۲۶۰/۲۸۰ قرائت گردید. برای جلوگیری از آلودگی با DNA ژنومی، RNA های استخراج شده بوسیله آنزیم DNaseI مطابق دستورالعمل (Fermentas) تیمار شدند.

### سنتز cDNA

سنتز cDNA با استفاده از کیت سنتز (Bioer) cDNA انجام شد. به این منظور 20ng از RNA به مخلوطی از ۱ میکرولیتر پرایمر oligodt، ۰/۵ میکرولیتر آنزیم AMV، ۴ میکرولیتر بافر 4x، ۰/۵ میکرولیتر مهارکننده RNase، ۱ میکرولیتر dNTP mix اضافه شده و با آب عاری از نوکلئاز به حجم ۲۰ میکرولیتر رسانده شد و سپس با برنامه زیر در دستگاه ترموسیکلر قرار گرفت (جدول ۱).

گروه‌های (تست و کنترل) جداگانه شمارش و در پلیت‌های ۱۲ خانه تقسیم گشتند. پیش ساز miR-210 (از شرکت Ambion) تهیه و طبق پروتکل کیت آماده گردید. همچنین از کنترل منفی Ambion نیز به منظور جلوگیری از گزارش تاثیر غیر اختصاصی احتمالی pre-miR استفاده گردید.

### انتقال Pre-miR به سلولهای K562

Pre-miR-210 با استفاده از لیپوفکتامین ۲۰۰۰ (Invitrogen, USA) به صورت زیر به سلولهای K562 انتقال داده شدند که ابتدا ۴ میکرولیتر لیپوفکتامین و pre miR-210 به میزان ۳۰ pmol هر کدام در ۲۰۰ میکرو لیتر از محیط OPTIMEM (اوپتیمم) (Gibco, USA) رقیق شدند و ۵ دقیقه در دمای محیط انکوبه گردیدند. سپس محتوای دو لوله با هم مخلوط شده و پس از ۳۰ دقیقه انکوبه در دمای محیط، به پلیت سلولی از قبل آماده شده اضافه گردید. انتقال کنترل منفی با همین روش انجام گرفت. به منظور نگهداشتن قدرت افزایشی، انتقال pre miR هر ۳ روز یکبار تکرار شد.

جدول ۱: پرفه دمایی سنتز cDNA سلول رده K562

زمان (دقیقه)	دما (درجه سانتی گراد)
۱۰ دقیقه	دمای اتاق (۲۵)
۴۵ دقیقه	۶۰-۴۲ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	۹۵ درجه سانتی گراد
۵ دقیقه	حمام یخ (۴ درجه)

### واکنش QRT-PCR برای زنجیره گاما

برای مطالعه تغییر در بیان زنجیره گاما هموگلوبین cDNA سنتز شده روز ۷ و ۱۴ با استفاده

از پرایمرهای زیرتحت واکنش Real time-PCR قرار گرفتند (جدول ۲). در این واکنش GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید.

جدول ۲: توالی پرایمرهای هموگلوبین  $\gamma$  و GAPDH

Hemoglobin $\gamma$	F: GGAGGACAAGGCTACTATCA R: GAATTCTTTGCCGAAATGGA
GAPDH	F: GCTGAGTACGTCGTGGAGTC R: GCAGGAGGCATTGCTGATG

## یافته‌ها

جهت انتقال بهینه از غلظت‌های مختلف اسکرامبل (scramble) استفاده گردید تا غلظت بهینه که بیشترین کارایی و کمترین سمیت را داشته باشد انتخاب شود. سپس با استفاده از فلوسیتومتری میزان انتقال به سلول‌های K562 ارزیابی گردید. در حالت بهینه میزان انتقال premiR-210 با لیپوفکتامین حدود ۰/۰۷٪ بدست آمد.

جهت بررسی سطح pre-mir-210 پس از انتقال pre-mir از شرکت stratagene می‌RNA گیری miRNA شرکت stratagene استفاده شد. در این کیت از پرایمر U6 RNA به عنوان کنترل داخلی استفاده گردید. بعد از گذشت ۳ روز از انتقال pre miR سطح miR-210 در مقایسه با سلولهای کنترل ۱۷ برابر افزایش یافته بود. همانطور که قبلاً ذکر شد جهت بالا نگهداشتن سطح mir در محیط انتقال pre miR هر ۳ روز یکبار تکرار شد.

از آنجایی که سلولهای K562 از منشاء CML با خصوصیات اریترولوومی می‌باشند، بنابراین پس از انتقال miRNA با روش RT-PCR نمی‌توان بطور کمی تغییرات ناشی از تاثیر افزایشی miRNA را تخمین زد، زیرا در رده K562 تمامی باندهای هموگلوبین و همچنین فاکتورهای GATA-1 را بیان می‌کند. بنابراین، برای مقایسه کمی بیان زنجیره گاما در تست و کنترل از روش Relative Real Time PCR استفاده گردید.

نمودار ۱ بررسی الگوی بیان زنجیره گاما با واکنش real Time PCR را نشان می‌دهد که بیان زنجیره گاما در نمونه انتقال یافته با mir-210 در مقایسه با نمونه کنترل ۲۴ مرتبه افزایش دارد که این تفاوت به لحاظ آماری معنی دار می‌باشد. value با روش student t-test مورد بررسی قرار گرفت و سطوح P value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ

پس از انتقال پیش ساز، از نمونه‌های روز سوم و هفتم به منظور بررسی میزان افزایش و کاهش بیان Pre-miR-210 مطالعه شدند. به دلیل کوتاه بودن طول miRNA ها ردیابی آنها با استفاده از real time PCR معمولی امکان پذیر نمی‌باشد بنابراین از کیت miRNA QPCR(stratgene) استفاده گردید.

## واکنش miRNA QRT-PCR

بوسیله کیت سنتز cDNA 1st-Strand miRNA ابتدا miRNA ها پلی آدنیلاسیون شده و سپس به cDNA تبدیل می‌شود.

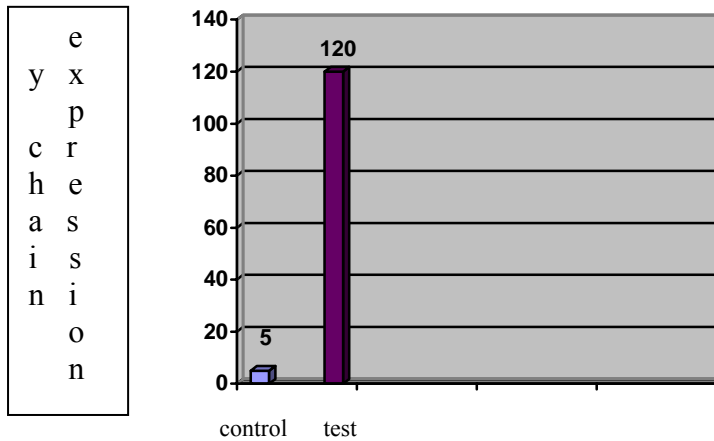
در مرحله بعد این cDNA با استفاده از پرایمر عمومی (Universal) و پرایمر اختصاصی (طراحی شده) تحت QPCR قرار گرفت. دمای بهینه برای اتصال هر دو پرایمر ۶۰ درجه می‌باشد. برنامه ترموسیکلر بر اساس دستورالعمل سازنده کیت به صورت زیر در جدول ۳ تنظیم گردید.

جدول ۳: برنامه ترموسیکلر

تکرار	زمان	دما [درجه سانتیگراد]
۱ سیکل	۵ دقیقه	۹۴
۲ ۳ ۴	۱۰ ثانیه	۹۴
	۳ ثانیه	۶۰ (قراحت)

## محاسبات آماری

بیان نسبی ژن گاما در نمونه‌های کنترل و تست با استفاده از رابطه  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  محاسبه گردید. نتایج نشان داده شده میانگین ۳ بار آزمایش مستقل و بصورت دوبار تکرار می‌باشند تفاوت بیان زنجیره گاما در نمونه کنترل و تست با روش student t-test مورد بررسی قرار گرفت و سطوح P value کمتر از ۰/۰۵ از لحاظ آماری معنی دار فرض گردید.



نمودار ۱: مقایسه بیان هموگلوبین گاما گروه تست و کنترل

در دهه اخیر شبکه جدیدی از RNA های غیر کد کننده جهت بیان ژنها مورد توجه قرار گرفته است که از جمله آنها microRNA ها هستند. همچنین microRNA ها در درون گلبولهای قرمز یافت شده است. بدین سبب miRNA ها به عنوان کاندید مناسبی جهت تنظیم فرایندهای تکثیر و تعیین سمت تمایز سلولهای خونی قوت گرفته است. miRNA ها مولکولهای کوچکی هستند که توسط RNA POI II رونویسی شده و باعث تنظیم بیان ژن در سطح پس از رونویسی می‌شوند. نقش این مولکولها در روندهای فیزیولوژیک و پاتولوژیک متعددی از قبیل تکثیر، تمایز، آپوپتوز و بدخیمی‌ها به اثبات رسیده است. تمایز اریتروئیدی روند پیچیده‌ای است که نقش miRNA های متعدد در آن به اثبات رسیده است این مولکولها معمولاً از طریق برداشتن اثر مهاري از ژنهای اختصاصی اریتروئیدی و یا القای اثر مهاري بر روی ژنهای سایر رده‌ها عمل می‌کنند (۱۴-۱۲). miRNA های افزایش یافته در طی تمایز رده اریتروئیدی می‌توان به miR های ۲۱ و ۲۱۰ و ۱۴۴ و ۱۶ و ۱۷ و ۱۵a و miRNA های کاهش یافته به ۲۴ و ۲۱ و ۲۲۳ و ۲۲۳ و ۱۵۵ و ۱۵۰-mir اشاره کرد (۱۴-۱۲).

آماري معنی دار فرض گردید ( $P \leq 0.002$ ).

## بحث

خونسازی فرایند بسیار پیچیده و چند مرحله‌ای است که طی آن از یک سلول مادری واحد (HSC) سلولهای مختلف خونی با خصوصیات و وظایف مختلف تولید می‌گردد. این روند ناشی از تعامل و همکاری فاکتورهای رشد، فاکتورهای رونویسی و بسیاری از مولکولهای دیگر می‌باشد. تولید گلبولهای قرمز یک فرایند دینامیک و به شدت تنظیم شده است. محل تولید این سلولها در بزرگسالان، مغز استخوان می‌باشد که طی یک روند تمایزی با گذر از مراحل پرونورموبلاست تا گلبول قرمز بالغ وارد خون می‌شوند.

اصلی‌ترین سیتوکین دخیل در اریتروپوئز فاکتور مترشحه از کلیه اریتروپوئتین نام داشته و فاکتورهای رونویسی مهم دیگر در این روند نیز شامل SCL, EPO, HIF, GATA-1, GATA2, FOG-1, EKLF, IL3, IL9, CBP, PU1, LMO2, HoxB4, Ikarus, GM-CSF, IGF-1 می‌باشد (۹-۱۱).

دلیل این ناهمخوانی در حال حاضر معلوم نیست، اما به طور کلی می‌توان گفت که به دلیل نوپا بودن این شاخه و با پیشرفت تکنولوژی و دانش می‌توان نتایج مطمئن تری به دست آورد.

### نتیجه گیری

دست یافتن به مکانیسم‌های دقیق ژنتیکی و اپی ژنتیکی که سبب تنظیم بیان ژنها در سلولهای خونی رویان، جنین و بزرگسالان می‌شوند باعث توسعه آگاهی ما در تشخیص، درمان و مدیریت بیماریهای مختلف خونی و از جمله آنمی‌ها بویژه تالاسمی‌ها، هموگلوبینوپاتی‌ها و بدخیمی‌های خونی مانند MDS خواهد شد. توانایی miRNA ها در القاء تمایز به سمت یک رده خاص و یا توانایی آنها در بیان ژنهای خاصی مانند ژنهای هموگلوبین، نقش بالقوه آنها را در ژن درمانی یاد آور می‌سازد. ناگفته پیداست که بیماریهای ناشی از اختلال گلبولهای قرمز گروه عظیمی از بیماریهای انسان و حیوانات را به خود اختصاص داده است که درصد عظیمی از آنها تنها ناشی از یک جهش یا بدتنظیمی است. miRNA ها با توجه به هدف قرار دادن ژنهای متعدد کاندید خوبی در این زمینه هستند. شاید در آینده بشر بتواند با مطالعات تکمیلی و دقیق از این مولکولهای کوچک و توانمند در پزشکی و مهندسی بافت به شایسته ترین نحو بهره ببرد.

### تشکر و قدردانی

این مقاله نتیجه طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی تهران به شماره ۱۰۸۴۹ مورخ ۱۳۸۹/۲/۳۱ می‌باشد.

در مطالعات متعددی بر روی رده سلول K562 انجام شده از فاکتورهای مختلفی نظیر Epo، IL-3، Hemine و mitermysin به منظور القای تمایز به سمت رده اریتروئیدی استفاده گردیده است. هر چند هنوز مطالعه‌ای مبنی بر تاثیر افزایشی miR-210 در تمایز اریتروئیدی منتشر نشده است. در مطالعه حاضر تاثیر افزایشی miR-210 در القای تمایز به سمت رده اریتروئیدی در سلول K562 بدون فاکتورهای رشد هماتوپوئیتیک بررسی شد (۱۶-۱۵).

Bianchi (۲۰۰۹) پرو فایل بیان miRNA ها را در سلولهای پیش ساز رده اریتروئیدی شخص نرمال و دو بیمار مبتلا به تالاسمی که یکی از آنها فنوتیپ HPFH داشتند را از طریق آرایه (Micro array) بررسی نمود و نشان داد که بیان miR-210 به میزان زیادی در سلولهای پیش ساز اریتروئیدی فرد مبتلا به HPFH افزایش می‌یابد. از سوی دیگر، پس از انجام RT-PCR بر روی سلولهای K562 تحریک شده با میتراامپسین، افزایش بیان miR-210 و کاهش بیان miRNA های ۱۵۵، ۲۲۲ و ۲۲۱-miR مشاهده گردید که در نتیجه مشخص شد القای miR-210 وابسته به زمان و میزان دارو است که با افزایش بیان ژن زنجیره گامای هموگلوبین همراه می‌باشد. مطالعه حاضر با مطالعه Bianchi همخوانی دارد. یافته‌های ما با یافته‌های حاصل از مطالعه Kosaka و همکاران که نشان دادند بیان miR-210 در سلولهای TER119 رده سلولی با منشا اریتروئید موشی به میزان زیادی افزایش می‌یابد و در مدل آنمی القا شده موشی کاهش بیان دارد، مشابهت دارد (۸). علیرغم اینکه نقش miRNA در کنترل اریتروپوئز مشخص شده است ولی چگونگی دخالت برخی miRNAها واضح نیست و مطالعات انجام شده اغلب دارای تناقض هستند.

1. Du T, Zamore PD. Micro Primer: the biogenesis and function of microRNA. *Development* 2005 Nov; 132(21): 4645-52.
2. Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet* 2008 Feb; 9(2): 102-14.
3. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005 May; 6(5): 376-85.
4. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993 Dec; 75(5): 843-54.
5. Wightman B, Ha I, Ruvkun G. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C elegans*. *Cell* 1993Dec; 75(5): 855-62.
6. Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miazaki H, Komatsu N, et al. Identification of erythropoietin induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *British Journal of Haematology* 2008 Jun; 142(2): 293-300.
7. Yang GH, Wang F, Yu J, Wang XS, Yuan JY, Zhang JW. MicroRNAs are involved in erythroid differentiation control. *Journal of Cellular Biochemistry* 2009 Jun; 107(3): 548-56.
8. Bianchi N, Zuccato C, Lampronti I, Borgatti M, Gambari R. Expression of miR-210 during erythroid differentiation and induction of gamma-globin gene expression. *BMP Rep* 2009Aug; 42(8): 493-9.
9. Tenen DG. Disruption of differentiation in human cancer: AML shows the way. *Nat Rev Cancer* 2003 Feb; 3(2): 89-101.
10. 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 May; 105(9): 3480-7.
11. Ferreira R, Wai A, Shimizu R, Gillemans M, Rottier R, Von Lindern M, et al. Dynamic regulation of Gata factor levels is more important than their identity. *Blood* 2007 June; 109(12): 5481-90.
12. Lawrie CH. microRNA expression in erythropoiesis and erythroid disorders. *Br J Haematol* 2010 Jul; 150(2): 144-51.
13. Zhan M, Miller CP, Papayannopoulou T, Stamatoyannopoulos G, Song CZ. MicroRNA expression dynamics during murine and human erythroid differentiation. *Exp Hematol* 2007 Jul; 35(7): 1015-25.
14. Zhao H, Wang D, Du W, Gu D, Yang R. MicroRNA and leukemia: tiny molecule, great function. *Crit Rev Oncol Hematol* 2010 Jun; 74(3): 149-55.
15. Fujimi A, Matsunaga T, Kobune M, Kawano Y, Nagaya T, Tanaka I, et al. Ex vivo large-scale generation of human red blood cells from cord blood CD34+ cells by co-culturing with macrophages. *Int J Hematol* 2008 May; 87(4): 339-50.
16. Feng Q, Lu SJ, Klimanskaya I, Gomes I, Kim D, Chung Y, et al. Hemangioblastic derivatives from human induced pluripotent stem cells exhibit limited expansion and early senescence. *Stem Cells* 2010 Apr; 28(4): 704-12.