

Hücre Serilerinde Kilitli Nükleik Asitler İle *MIR223* Gen Sessizleştirilmesi

MIR223 Gene Silencing via Locked Nucleic Acids in Cell Lines

Orçun Taşar^{1,2} , Müge Sayitoğlu² , Özden Hatırnaz Ng^{2,3} 

ÖZ

Amaç: Kodlama yapmayan küçük RNA'lar hücre farklılaşması, büyümesi, gelişmesi, immün reaksiyonlar, stres adaptasyonu gibi fizyolojik süreçlerin yanı sıra, kanser, kalp hastalıkları gibi kompleks hastalıklarla da ilişkilendirilmiştir. *MIR223*, hematopoetik sisteme özgü bir miRNA'dır. T-hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) patogenezinde katkıda bulunan miRNA'lar arasında yüksek anlatıma sahip olduğu ve onkomiir olarak aktivite gösterdiği tespit edilmiştir. Bu çalışmada *MIR223* geninin T-ALL hücre serilerinde alternatif bir yaklaşım olarak özgün kilitli nükleik asit (KNA) kullanılarak baskılanması ve gen sessizleştirme etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Kültüre edilen T-ALL hücre serilerine (Jurkat ve Molt4), 24 ve 48 saatlik sürelerde, 100 ve 150pmol konsantrasyonda *MIR223*'e özgü KNA uygulanmıştır. Her iki zaman aralığında RNA izolasyonu sonrası, stem loop polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile cDNA sentezlenerek, kantitatif gerçek zamanlı PZR (QRT-PZR) ile miRNA anlatım düzeyleri belirlenmiştir.

Bulgular: Her iki hücre serisinde de 24. saatte, 150pmol KNA, sadece transfeksiyon ajanı uygulanmış (Mock) hücrelerle karşılaştırıldığında *MIR223* düzeyinin yüksek oranda baskılandığı gözlenmiştir (Jurkat %73, $p=0,001$ ve Molt4%80 $p=0,04$). Molt 4 hücre serisinde anlamlı düzeyde baskılanma 48. saatte devam etse de ($p=0,005$), Jurkat hücre serisinde 48. saatteki baskılanma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Sonuç: *MIR223* onkogenik etki gösteren bir miRNA olarak tanımlanmıştır ve antisense oligolar ile *MIR223* geninin sessizleştirilmesi T-ALL gibi artmış *MIR223* anlatımı gösteren kanserlerde hastalığın seyrini ve tedavi alternatiflerini araştırma imkanı sağlamaktadır. Bu çalışmada T-ALL hücrelerinde alternatif bir RNA interferans (sessizleştirme) uygulaması olarak KNA kullanılmıştır ve bu moleküllerin çok etkin ancak kısa süreli olarak kullanılabileceği görülmüştür.

Anahtar Kelimeler: T-ALL, *MIR223*, kilitli nükleik asitler (KNA), gen sessizleştirilmesi

ABSTRACT

Objective: Noncoding small RNAs play roles in physiological processes such as cell differentiation, growth, development, immune reactions, stress adaptation as well as complex diseases such as cancer and heart diseases. *MIR223* is a specific miRNA to the hematopoietic system. Among the miRNAs associated with the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL), *MIR223* was shown to have the highest expression level and functions as an oncomir. In this study we aimed to suppress *MIR223* gene expression by using locked nucleic acid (LNA) in T-ALL cell lines as an alternative gene silencing technique and to show the silencing efficacy.

Material and Methods: T-ALL cell lines (Jurkat and Molt4) were cultured and *MIR223* specific LNA was applied in 100pmol and 150pmol concentrations for 24 hours and 48 hours. RNA was isolated from cells at both time points, followed by a stem loop polymerase chain reaction (PCR) for cDNA synthesis and the miRNA expression levels were evaluated by quantitative real time PCR.

Results: In both cell lines a 150pmol application of LNA was compared to mock cells and the *MIR223* expression was already suppressed at 24hours (73% in Jurkat ($p=0,001$) and 80% in Molt4 ($p=0,04$)). The suppression was continued at 48 hours in Molt4 cell line ($p=0,005$) where as there was no statistical significant difference in Jurkat at 48 hours.

Conclusion: *MIR223* has been identified as an oncomir and silencing the *MIR223* with synthetic antisense oligos provide the opportunity to investigate the course and alternative therapy options of cancers with increased *MIR223* expression, such as T-ALL. In this study LNA was used as an alternative RNA interference application in T-ALL cells and showed that LNA can effectively suppress gene expression when used in the short term.

Keywords: T-ALL, *MIR223*, locked nucleic acid (LNA), Gene silencing

¹ İstanbul Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, Türkiye

² İstanbul Üniversitesi, Aziz Sançar Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü, Genetik Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

³ Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

ORCID: O.T. 0000-0002-1504-4669;
M.S. 0000-0002-8648-213X;
Ö.H.N. 0000-0001-7728-6527

Sorumlu yazar/Corresponding author:
Özden Hatırnaz Ng,
Acıbadem Mehmet Ali Aydınlar Üniversitesi,
Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı,
İstanbul, Türkiye
E-posta: ozden.hatirnaz@acibadem.edu.tr

Başvuru/Submitted: 18.02.2020
Kabul/Accepted: 23.06.2020

Atf/Citation: Taşar O, Sayitoğlu M, Hatırnaz Ng O.
MIR223 Gene Silencing via Locked Nucleic Acids in Cell Lines. Sağlık Bilimlerinde İleri Araştırmalar Dergisi 2020; 3(2): 45-50.
<https://doi.org/10.26650/JARHS2020-739221>

GİRİŞ

RNA interferans (RNAi), mRNA düzeyinde gen anlatımının susturulmasını ifade eder. RNAi, genlerin anlatımlarını durdurabilme ve bunun sonucunda meydana gelen fenotipik değişimleri gözlemleyebilme imkanını vermektedir. Bu yöntem ilk defa *Caenorhabditis elegans* (*C.elegans*) modelinde bazı genlerin küçük RNA'lar aracılığıyla susturulmasında denenmiştir (1). RNAi yaklaşımında farklı kodlama yapmayan küçük RNA'lar (miRNA, siRNA, piRNA, rasiRNA, shRNA, scnRNA) kullanılmaktadır. Kodlama yapmayan RNA'lar içerisinde en büyük grubu endojen kökenli miRNA ya da genellikle ekzojen kökenli siRNA'lar oluşturmaktadır (2-4).

MikroRNAlar (miRNA) 17-25 nükleotid uzunluğunda, genomun kodlanmayan bölgesinde yer alan düzenleyici küçük RNA molekülleridir. miRNA'lar post transkripsiyonel aşamada hedef mRNA'ların 3' translasyona uğramayan bölgelerinde (untranslated region, UTR) bulunan, kendilerine komplementer olan dizilere bağlanarak gen anlatımını baskılar. miRNA'ların ilk keşfinden bu yana ökaryotlarda yüzlerce daha tanımlanmış ve hücre farklılaşması, büyümesi, gelişmesi, immün reaksiyonlar, stres adaptasyonu gibi fizyolojik; kanser, kalp hastalıkları gibi patofizyolojik olaylarla ilişkilendirilmişlerdir (5).

MIR223, bioinformatik tahmin araçları ile tespit edilmiş, hematopoetik sisteme özgü bir miRNA'dır (6). Yapılan araştırmalarda lösemi, pankreas, kolorektal, meme, mide, over gibi kanser çeşitleri ve lupus eritematozus, romatoid artrit, glioblastoma, kronik astım, tip 2 diyabet gibi hastalıklarla ilişkilendirilmiştir (7, 8). Ayrıca *MIR223*'ün hücre döngüsü, tümör yayılımı, hematopoetik farklılaşma ve hücrelerin immün fonksiyonlarında da rol aldığı saptanmıştır (9).

MIR223'ün, T-Hücreli Akut Lenfoblastik Lösemi (T-ALL) patogenezine katkıda bulunan miRNA'lar arasında en yüksek anlatıma sahip olduğu ve onkormir olarak aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (10).

mirRNA'ların hedeflenerek baskılanması, son yıllarda gündemde olan ve farklı kanser türlerinde de uygulanan bir tedavi yöntemidir. Bu çalışmada T-ALL'de yüksek anlatımı gösterilmiş *MIR223*'ün, T-ALL hücre serilerinde kilitli nükleik asitler (KNA) kullanılarak baskılanması gerçekleştirilmiş ve gen sessizleştirmesinin etkinliği değerlendirilmiştir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Hücre Kültürü

Çalışmada T-ALL hücre hatları Jurkat ve Molt4 kullanılmıştır. Hücreler, içinde çoğalacakları %10 FBS (Fetal Bovine Serum) ile zenginleştirilmiş ve %1 penisilin/streptomisin eklenmiş RPMI 1640 medyum içinde, 37°C'de %5 CO₂ şartlarında büyütülmüştür.

Kilitli Nükelik Asit (KNA) Anti-MIR223 ile MIR223 Gen Baskılanması

KNA Anti-MIR223 muamelesi için 24 kuyulu plaklar kullanılmıştır. Öncelikle 3X10⁵ hücre, 24. ve 48. saat ölçümleri için FBS içeren 300µl RPMI besi yeri içinde kuyulara dağıtılmıştır. Karşılaştırma için kontrol grupları olarak; muamele edilmemiş (untreated, Unt) ve boş transfeksiyon ajanı ile muamele edilen (Mock) hücreler kullanılmıştır. Daha önceki gen susturma çalışmalarımıza dayanılarak hücre serileri 100pmol ve 150pmol KNA ile muamele edilmiştir (*hakem değerlendirmesinde*).

Yeterli miktarda çoğaldığı gözlenen hücreler üzerine, iki farklı dozda ana stoğu 5000 pmol olan KNA ve transfeksiyon ajanı (FuGENE® 6 Transfection Reagent (Promega, Madison, WI, USA)) 100 µl FBS içermeyen besi yeri ile birlikte kuyulara ilave edilmiştir. Altı saat inkübasyonun ardından kuyulara son bir kez daha 100µl FBS içeren RPMI 1640 besi yeri eklenmiştir. Oluşturulan reaksiyon karışımları Tablo 1'de gösterilmiştir. 24 ve 48. saatlerde hücreler kuyulardan toplanarak PBS ile 1/10 oranında dilüe edildikten sonra (100 µl Medyum + 900 µl PBS) hücre canlılığı belirlenmiştir.

Tablo 1. KNA Anti-MIR223 konsantrasyonlarına göre hazırlanan reaksiyon karışımları

LNA-Son Konstrasyon	LNA Anti-miR	Transfeksiyon Ajanı	FBS İçermeyen Medyum	Toplam hacim (µl)
10 pmol	1 µl (5000 pmol)	3 µl	97 µl	100 µl
50 pmol	5 µl (5000 pmol)	3 µl	92 µl	100 µl

Stem Loop PZR ve Kantitatif Gerçek Zamanlı PZR (QRT-PZR)

Toplanan hücreler, 1 ml trizol ile homojenize edilmiş ve trizol protokolü ile RNA izolasyonu gerçekleştirilmiştir. RNA'ların kalitesini ve konsantrasyonunu tayin edebilmek için spektrofotometre (nd-1000, NanoDrop Technologies, Inc., Wilmington, USA) kullanılmıştır. *MIR223* gen anlatım düzeyini tespit edebilmek için öncelikle spesifik primerler kullanılarak *SNORD24* (endojen kontrol miRNA) ve *MIR223* için stem-loop cDNA sentezi yapılmıştır. Stem-loop cDNA sentezi için 1000 ng total RNA, 10 mM dNTP, 5 pmol *MIR223* RT Primer, 5 pmol *SNORD24* RT Primer, 0,1M DTT (1,4-ditiotreitil), 40 ünite RNaz, 5X tampon çözeltisi ve 200 ünite ters transkriptaz enzimi Superscript II (Invitrogen Life Technologies, USA) kullanılmıştır. Reaksiyonun uygulandığı sıcaklık ve ilişkili süreleri; 42°C'de 50 dakika ve 70°C'de 15 dakikadır.

Gen anlatım baskılanma düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif PZR (LightCycler 480, Roche Diagnostics GmbH, Germany) ile belirlenmiştir. *MIR223* için F 5'-TCGCGGTGTCAGTTTGTCAA-3' ve R 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3' primerleri ve referans miRNA olarak kullanılan *SNORD24* için F 5'-TGCGGTGCAGATGATGTA-AAA-3' ve R 5'-GTGCAGGGTCCGAGGTATTC-3' primer çiftleri kullanılmıştır. Hedef ve referans genler için final konsantrasyonda 1X ana karışım (Roche Diagnostic, Almanya), 200nM primer, 0,04 ünite prob (*universal probe library* (UPL) prob no:21, Roche) olacak şekilde PZR reaksiyon karışımları hazırlandıktan sonra 96 kuyulu plak içerisine, her bir kuyuya karışımdan 10 µl paylaştırılmıştır. Üzerine 200ng cDNA örneği ilave edilmiştir. Her örnek üç kopya olacak şekilde çalışılmıştır. Rölatif kantifikasyon algoritması ile gen anlatım düzeyleri belirlenmiştir. PZR'nin döngü sıcaklık ve süreleri; 95 °C'de 10 dak inkübasyon (1 döngü), 95 °C'de 10 sn, 60 °C'de 20sn, 72 °C'de 1sn (45 döngü) ve 40 °C'de 10 sn soğutma (1 döngü) olacak şekildedir.

Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmalarda GraphPad Software Inc. (La Jolla, California, US) kullanılmıştır. Sadece transfeksiyon ajanı içeren mock hücreleri ile uygulama yapılan hücre grupları arasındaki

rölatif gen anlatımının istatistiksel analizi için student-t test kullanılmıştır ve $P \leq 0.05$ (hipotezler çift yönlü olarak) istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

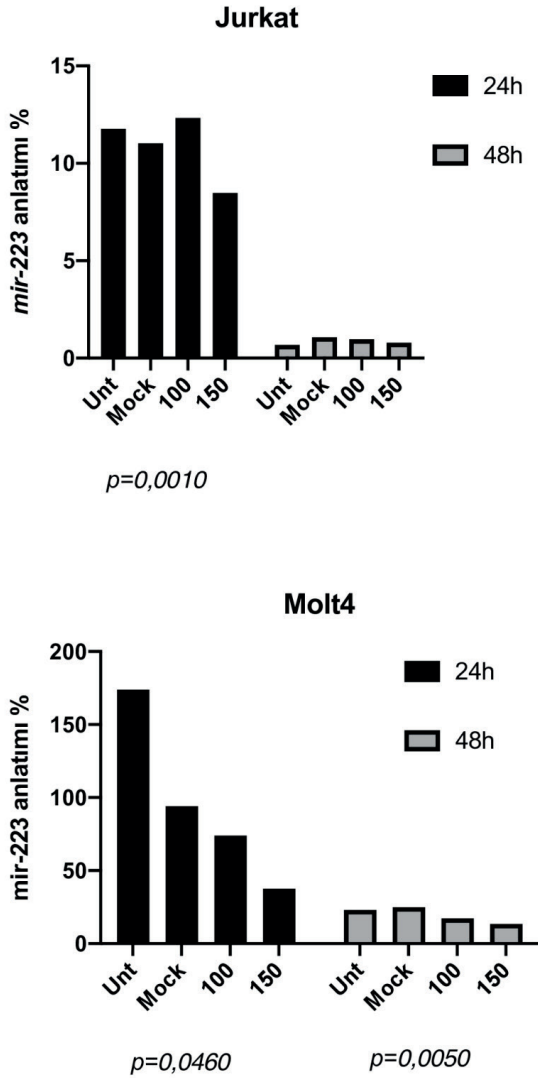
Jurkat ve Molt4 hücre serilerinde, 100 ve 150 pmol konsantrasyonlarda *MIR223*'e özgün KNA ile 24. ve 48. saatlerde uygulama yapılarak *MIR223* gen anlatımları incelenmiştir (Şekil 1A ve 1B). Muamelenin yapıldığı ilk 24. saat içinde hem Jurkat hem de Molt4 hücre serilerinde *MIR223* geni anlatımının, sadece transfeksiyon ajanı içeren hücrelere göre Jurkat hücre serisinde %70 ve Molt4 hücre serisinde %80'den fazla baskılandığı belirlenmiştir.

Her iki hücre serisinde de 24. saatte, 100 pmol ve 150 pmol konsantrasyonlarda *MIR223* anlatımlarının azaldığı ve istatistiksel olarak anlamlılık gösteren baskılanmanın 150 pmol konsantrasyonda olduğu belirlendi. Jurkat ve Molt4 hücrelerinde 24. saat baskılanma için KNA ile muamele edilmemiş hücrelere oranla anlamlı derecede *MIR223* anlatım düzeylerinin azalmış olduğu (sırasıyla, $p=0.001$ ve $p=0.046$) saptanırken, 48. saatte baskılanmanın özellikle Jurkat hücre serilerinde etkin olarak gerçekleşmediği belirlenmiştir ($p=0.3$). Molt4 hücrelerinde ise 48. saatte baskılanma devam etse de 24. saate göre daha düşük oranlarda olmuştur ($p=0.005$).

SONUÇ ve TARTIŞMA

miRNA'ların anlatımında meydana gelebilecek düzensizlikler hematopoietik sistemin düzenini bozarak lösemilerin ortaya çıkmasına sebebiyet verebilmektedir. miRNA anlatımı hedeflenerek geliştirilen tedavi yöntemleri henüz emekleme aşamasındadır. Bununla beraber miRNA biyolojisi hakkında bilgilerimiz arttıkça bu biyolojik moleküllerin hematolojik kanserlerden akut lösemilerin tanı ve tedavisinde etkin bir şekilde kullanılabileceği öngörülmektedir (11).

Yapılan çalışmalarda miRNA'ların aşırı veya az anlatımlarının ya da tamamen delesyona uğramalarının lösemi tiplerinde tümör baskılayıcı ya da onkogen benzeri rolleri gösterilmiştir (12, 13). Bu çalışmalardan birinde *MIR-92a*'nın, AML hücre hattı olan CD32 hücrelerinin kontrolsüzce çoğalmasına



Şekil 1. KNA Anti-MIR223 baskılanması sonrasında, A) Jurkat ve B) Molt4 hücre serisinde 24. ve 48. saatlerdeki MIR223 anlatımının gerçek zamanlı kantitatif PZR ile belirlenmesi. Her deney üç kez tekrarlandı ve örnekler triplicate olarak çalışıldı. SNORD24 referans geni ile normalize edildi (A, $p=0,001$; B, $p=0,046$ ve $p=0,005$ - t-test)

sebeplere olacak şekilde, *p63* geninin anlatımını baskıladığı gösterilmiştir (14, 15). Bir diğer çalışmada farelerin hematopoietik sisteminde *MIR-155* ve *MIR-29a*'nın anlatımındaki artışın myeloproliferatif hastalıklar ve lösemiler ile ilişkili olduğu saptanmıştır (16, 17). *MIR223*'ün ektopik anlatımının hematopo-

ietik kök hücrelerinin %30-50 oranında T hücrelerine farklılaşmasını sağladığı gösterilmiştir (18). Bu yönde yapılan bir diğer çalışmada, tetiklenmiş myeloid öncülleri enjekte edilen farelerde *MIR223* anlatımının, lenfosit hücrelerini B yönüne değil, sadece T yönüne farklılaştırdığını ortaya koymuştur. Bu da *MIR223*'ün daha çok T lenfosit soyuna özgü hücrelerde aktif olduğunu göstermektedir (19).

KNA'lar komplementer RNA'ya yüksek afinite ile bağlanabilen çok özgün RNA analoglarıdır. Dolayısıyla son yıllarda KNA'lar miRNA baskılamalarında tercih edilmeye başlanan moleküller arasındadır (20). Etkin gen sessizleştirme potansiyelleri, düşük toksisite ve yüksek metabolik stabilitelelerinden dolayı yeni nesil antisens oligo tedavi yaklaşımlarında da ilgi odağı olmuştur. KNA oligolar riboz kalıntılarını sabitleyen fazladan metilen köprüsüne sahip nükleik asit bloklardır (21, 22). Bildiğimiz kadarıyla ilk defa bu çalışmada, *in vitro* KNA kullanılarak T-ALL hücre serilerinde *MIR223* baskılanması ve etkinliği araştırıldı. Antisens oligo tedavi yaklaşımı için ön araştırma sonuçları olarak, ilk 24. saat içinde yüksek konsantrasyonlu uygulamada hem Jurkat hem de Molt4 hücre serilerinde farklı oranlarda *MIR223* geni anlatımının etkin olarak baskılandığı ve 48. saatte bu etkilerin azaldığı gözlemlendi. İki hücre serisinde birbirinden farklı oranlarda etkinin gözlenmesi iki hücre serisinin birbirinden farklı T-ALL alt gruplarını temsil etmesinden kaynaklanıyor olabilir. Ayrıca, bu çalışma, hedef miRNA'yı sessizleştirmenin ilk 24 saatteki etkinliğinin 48 saat sonra azalması KNA'ların daha çok, kısa süreli ama etkin olarak tedavi planlarında kullanılabileceği ile ilgili ön bulguların eldesini sağlamıştır. Daha uzun baskılama sürelerinin değerlendirileceği çalışmalarda her uygulama zamanında (24. saat, 48. saat vb) besiyerinin yenilerek KNA'nın yeniden eklenmesi ya da KNA'nın bir viral vektör içine klonlanarak, sabit anlatımının sağlanması daha uygun olabilir. İleride bu amaçla dizayn edilecek araştırmalarda, elde edilen ön bulgular ışığında hem zamansal hem konsantrasyon çeşitlilikleri kullanılması hem de transfeksiyonda kullanılabilecek vektörlerin güvenlik testleri ile birlikte değerlendirilmesi öngörülmüştür.

MIR223 onkogenik etki gösteren bir miRNA olarak tanımlanmıştır (23) ve antisens oligolar ile *MIR223* geninin susturulması T-ALL gibi artmış *MIR223* anlatımı gösteren kanserlerde hastalığın seyrini araştırma imkanı sağlayabilir. Bu çalışmadan elde edilen ön bulgularda, T-ALL hücrelerinde alternatif bir RNA interferans uygulaması olarak kullanılacak KNA'nın, kısa süreli ancak etkin olduğu gösterilmiş ve hastalık patogenezi araştırılmaya yönelik yapılacak çalışmalarda etkili bir in vitro model olarak bu yaklaşımın kullanılabilceği belirlenmiştir.

Hakem Değerlendirmesi: Dış bağımsız.

Peer Review: Externally peer-reviewed.

Yazar Katkıları: Çalışma Konsepti/Tasarım- Ö.H.N., M.S.; Veri Toplama- O.T., Ö.H.N.; Veri Analizi/Yorumlama- O.T., Ö.H.N.; Yazı Taslağı- Ö.H.N., M.S.; İçeriğin Eleştirel İncelemesi- Ö.H.N., M.S.; Son Onay ve Sorumluluk- Ö.H.N., M.S., O.T.

Author Contributions: Conception/Design of Study- Ö.H.N., M.S.; Data Acquisition- O.T., Ö.H.N.; Data Analysis/Interpretation- O.T., Ö.H.N.; Drafting Manuscript- Ö.H.N., M.S.; Critical Revision of Manuscript- Ö.H.N., M.S.; Final Approval and Accountability- Ö.H.N., M.S., O.T.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması beyan etmemişlerdir

Conflict of Interest: Authors declared no conflict of interest.

Finansal Destek: Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir. (Proje numarası: 40487)

Financial Disclosure: This study was supported by Istanbul University Scientific Research Projects Unit. (Project No: 40487)

KAYNAKLAR/REFERENCES

1. Lee RC, Feinbaum RL and Ambros V. The *c. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993;75:843-54.
2. Mochizuki K, Fine NA, Fujisawa T, Gorovsky MA. Analysis of a piwi-related gene implicates small RNAs in genome rearrangement in tetrahymena. *Cell* 2002;110:689-99.
3. Peragine A, Yoshikawa M, Wu G, Albrecht HL, Poethig RS. SG3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans acting siRNAs in Arabidopsis. *Genes Dev* 2004;18:2368-79.
4. O'Donnell KA and Boeke JD. Mighty Piwis defend the germline against genome intruders. *Cell* 2007;129:37-44.
5. Vishnoi A, Rani S. MiRNA Biogenesis and Regulation of Diseases: An Overview. *Methods Mol Biol* 2017;1509:1-10.
6. Sun W, Shen W, Yang S, Hu F, Li H, Zhu TH. MIR223 and miR-142 attenuate hematopoietic cell proliferation, and MIR223 positively regulates miR-142 through LMO2 isoforms and CEBP- β . *Cell Res* 2010;20(10):1158-69.
7. Fulci V, Scappucci G, Sebastiani GD, Giannitti C, Franceschini D, Meloni F. et. al. MIR223 is overexpressed in T-lymphocytes of patients affected by rheumatoid arthritis. *Hum Immunol* 2010;71(2):206-11.
8. Han L, Rachel B, Stuart C. MicroRNA-223 regulates Glut4 expression and cardiomyocyte glucose metabolism. *Cardiovasc Res* 2010;86(3):410-20.
9. Haneklaus M, Gerlic M, O'Neill LAJ, Masters SL. MIR223: infection, inflammation and cancer. *J Intern Med* 2013;274(3):215-26.
10. Mansour MR, Sanda T, Lawton LN, Li X, Kreslavsky T, Novina CD, Brand M et.al. The TAL1 complex targets the FBXW7 tumor suppressor by activating MIR223 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Exp Med* 2013;210(8):1545-57.
11. Yimei C, Xiaomin Y, Songnian H, Jun Yu. A brief review on the mechanisms of miRNA regulation. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2009;7(4):147-54.
12. Mardani R, Abadi MHJN, Taghizadeh-Boroujeni S, Bayat A, Farsinezhad A, Hayat SMG. et. al. MicroRNA in Leukemia: Tumor Suppressors and Oncogenes with Prognostic Potential. *J Cell Physiol* 2018;234(6):8465-86.

13. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E. et.al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99(24):15524-29.
14. Tanaka M, Oikawa K, Takanashi M, Kudo M, Ohyashiki J, Ohyashiki K. et.al. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS One* 2009;4(5):e5532.
15. Ohyashiki JH, Umezu T, Kobayashi C, Hamamura RS, Tanaka M, Kuroda M. Impact on cell to plasma ratio of miR-92a in patients with acute leukemia: in vivo assessment of cell to plasma ratio of miR-92a. *BMC Res Notes* 2010;3:347.
16. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheok MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST et. al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol* 2009;10(2):125-34.
17. Schotte D, Akbari-Moqadam F, Lange-Turenhout EA, Chen C, Pieters R, Den Boer ML. Discovery of new microRNAs by small RNAome deep sequencing in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 2011;25(9):1389-99.
18. Bellon M, Yves L, Hermine O. and Nicot C. Dereglulation of micorRNA involved in hematopoiesis and the immune response in HTLV-I adult T-cell leukemia. *Blood* 2009;113(20):4914-17.
19. Chen C, Li L, Lodish HF. MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 2004;303(5654):83-6.
20. Stenvang J, Silahtaroglu AN, Lindow M, Elmen J, Kauppinen S. The utility of KNA in microRNA based cancer diagnostics and therapeutics. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):89-102.
21. Grünweller A, Hartmann RK. Locked nucleic acid oligonucleotides: the next generation of antisense agents? *BioDrugs* 2007;21(4):235-43.
22. Nedaeinia R, Avan A, Ahmadian M, Nia SN, Ranjbar M, Sharifi M. et al. Piroozmand A, Nourmohammadi E, Manian M, Ferns GA, Ghayour-Mobarhan M, Salehi R. Current Status and Perspectives Regarding KNA-Anti-miR Oligonucleotides and microRNA miR-21 Inhibitors as a Potential Therapeutic Option in Treatment of Colorectal Cancer. *J Cell Biochem* 2017;118(12):4129-40.
23. Landgraf, P., M. Rusu, R. Sheridan, et al. A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 2007;129(7):1401-14.