Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

خون
فصلنامه پژوهشی
دوره ۱۵ شماره ۲ تابستان ۹۷ (۱۴۳-۱۳۳)

مقاله پژوهشی

اهمیت مسیر پروتئازوم ـ یوبی کوئیتین در ایجاد مقاومت به گلوکوکورتیکوئیدها در لوسمی لنفوبلاستیک حاد

نسرین دهقان نیری[۱]، پیمان عشقی[۲]، کوروش گودرزی‌پور[۳]، مینا درویشی[۴]، احمد قره‌باغیان[۵]

چکیده

سابقه و هدف

لوسمی لنفوبلاستیک حاد(ALL)، شایع‌ترین سرطان در سنین کودکی محسوب می‌شود. حدود ۲۰٪ کودکان مبتلا، به داروهای موجود مقاومت نشان می‌دهند. یکی از عوامل اصلی پیش‌آگهی ضعیف در بیمارانی که دچار عود شدند، مقاومت به گلوکوکورتیکوئیدها می‌باشد. لذا شناسایی نشانگرهای مقاومت یا حساسیت به گلوکوکورتیکوئیدها و بررسی چگونگی تعامل این پروتئین‌ها می‌تواند ابزاری مفید به منظور بهبود استراتژی‌های تعیین پیش‌آگهی بیماری باشد.

مواد و روش‌ها

در یک مطالعه تجربی، شبکه تعامل پروتئینی بین ۱۴ پروتئین شناسایی شده در پروتئوم سلول‌های ALL تیمار شده با گلوکوکورتیکوئیدها بررسی شدند. برای این منظور از روش شبکه ژنی و پایگاه داده آنلاین STRING، به عنوان ابزار جستجوی بازیابی تعامل ژن‌ها و پروتئین‌ها، استفاده گردید.

یافته‌ها

با استفاده از روش‌های پروتئومیکی، ۱۴ پروتئین تغییر بیان یافته به نام‌های SRSF3، CNBP، VDAC1، SNX3 ، PFDN6، PSMB2، STMN1، PPP4R4، DUT، CAPZA1، CAPZB، PNP، CLIC1 و PSME1 بعد از تیمار با پردنیزلون و دگزامتازون در دو رده سلولی حساس(Nalm-6) و مقاوم(Reh) به گلوکوکورتیکوئیدها شناسایی شدند. ارتباط بین پروتئین‌های مذکور در پایگاه داده STRING مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتیجه گیری

به طور کلی یافته‌ها نشان می‌دهد که مسیر پروتئازوم- یوبی‌کوئیتین نقش عملکردی در القاء مکانیسم مقاومت به گلوکوکورتیکوئید در ALL ایفا می‌کند. لذا بررسی پروتئین‌های کلیدی کنترل‌کننده مسیر مذکور می‌تواند نقش مهمی در روشن‌سازی مکانیسم القاء مقاومت به گلوکوکورتیکوئیدها و به تبع آن پیش‌آگهی بیماری داشته باشد.

کلمات کلیدی: لوسمی لنفوبلاستیک حاد، مقاومت دارویی، گلوکوکورتیکوئیدها، نشانگرهای زیستی

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۵
تاریخ پذیرش : ۹۷/ ۲/۱۹

۱- PhD پروتئومیکس ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۲- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استاد مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان ـ بیمارستان کودکان مفید ـ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۳- فوق تخصص هماتولوژی و انکولوژی کودکان ـ استادیار مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان ـ بیمارستان کودکان مفید ـ دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۴- کارشناس ارشد خون‌شناسی آزمایشگاهی و بانک خون ـ دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران
۵- مؤلف مسئول: PhD ایمونوهماتولوژی بالینی ـ استاد دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ مرکز تحقیقات بیماری‌های خونی مادرزادی کودکان دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی ـ تهران ـ ایران ـ کد پستی: ۴۹۹۴۱-۴۹۱۵۸

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

مقدمه

علی‌رغم این که امروزه میزان بقاء در مبتلایان به لوسمی لنفوبلاستیک حاد به بیش از حدود ۸۰٪ رسیده است، اما هنوز ۲۰٪–۱۵٪ از بیماران با دستورالعمل‌های درمانی فعلی به درمان پاسخگو نیستند(۲، ۱). درمان در بیماران تازه تشخیص داده شده معمولاً توسط رژیم‌های شیمی‌درمانی ترکیبی شامل گلوکوکورتیکوئیدها انجام می‌گیرد.

گلوکوکورتیکوئیدها به طور گسترده‌ای برای درمان انواع بیماری‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند و چندین دهه است که در انکولوژی بالینی با ارزش و مورد استفاده هستند(۳). گلوکوکورتیکوئیدها باعث اختلال در چرخه سلولی شده و سبب القاء مرگ سلولی در سلول‌های خونی از طریق فعال‌سازی ژن‌های القاء کننده آپوپتوز و مهار رونویسی ژن‌های بقا می‌گردند، از این رو آن‌ها به بخش جدایی ناپذیر رژیم‌های شیمی‌درمانی برای سرطان‌های لنفوئیدی به ویژه ALL تبدیل شده‌اند(۵، ۴). پردنیزولون و دگزامتازون معمول‌ترین آنالوگ‌های مصنوعی گلوکوکورتیکوئیدها هستند و در مراحل مختلف درمان ALL مورد استفاده قرار می‌گیرند(۶). پاسخ به گلوکوکورتیکوئید، یکی از فاکتورهای مهم برای پیش‌بینی نتیجه درمان و عوارض جانبی بلند مدت ناشی از شیمی درمانی در ALL دوران کودکی محسوب می‌شود(۷). تا به امروز، مکانیسم دقیق این که پردنیزولون چگونه سلول‌های ایمنی و یا سلول‌های لوسمی را هدف قرار می‌دهد، کاملاً مشخص نشده است. اثبات شده است که پردنیزولون می‌تواند به دلیل ساختار چربی دوست خود به طور غیر فعال از غشای سلولی عبور کند و به گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی سیتوزولی(nuclear = GR/NR3C1 receptor subfamily 3 group C member 1) متصل شود. گلوکوکورتیکوئیدها عملکردشان را از طریق اتصال به گیرنده‌های گلوکوکورتیکوئیدی معروف به GR (Glucocorticoid receptor) یا NR3C1 اعمال می‌کنند. مطالعه ها نشان داده است که بیان غیرطبیعی ایزوفرم‌های GR و ژن‌های پاسخ به گلوکوکورتیکوئید و هم چنین پلی‌مورفیسم‌های ژنتیکی و یا مسیر سیگنالینگ پایین دست NR3C1 می‌توانند در مقاومت به درمان درگیر باشند(۸).

با توجه به اهمیت پاسخ به گلوکوکورتیکوئیدها در تعیین پیش‌آگهی بیماران، شناسایی پنل نشانگرهای زیستی پیش‌بینی کننده حساسیت یا مقاومت به درمان با گلوکوکورتیکوئیدها در روز تشخیص بیماری، می‌تواند آزمایشی ارزشمند در کنار سایر آزمایش‌های تعیین‌کننده فاکتورهای خطر باشد(۹). علاوه بر این، استفاده از شبکه برهمکنش پروتئین- پروتئین و آنالیز ویژگی‌های ساختاری و عملکردی پروتئین‌ها می‌تواند به فهم بهتر بیولوژی بیماری، درک بهتر مکانیسم‌های مولکولی درگیر و هم چنین معرفی نشانگرهای زیستی کمک کند. از این‌رو در این مطالعه به شناسایی نشانگرهای پروتئینی پیش‌آگهی‌دهنده مقاومت درمانی به گلوکوکورتیکوئیدها در لوسمی لنفوبلاستیک حاد پرداخته شده است. در این پژوهش، از روش پروتئومیکی و بیوانفورماتیکی به منظور کشف مکانیسم‌های دخیل در مقاومت و بررسی تعامل پروتئین‌های تغییر بیان یافته استفاده شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در مطالعه‌های قبلی تکمیل کننده مطالعه حاضر، طی یک مطالعه مداخله‌ای، از رده سلولی Nalm-6 به عنوان رده سلولی حساس به گلوکوکورتیکوئیدها و Reh به عنوان رده سلولی مقاوم به گلوکوکورتیکوئیدها استفاده شده بود. در این مطالعه تجربی، سلول‌ها از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران (تهران، ایران) تهیه شدند. هر یک از رده‌های سلولی به تعداد ۳۰۰۰۰۰ سلول در هر میلی لیتر محیط کشت RPMI-1640 (جیبکو، آمریکا) و در فلاسک‌های ۱۷۵ میلی‌لیتری با دوز ۱ میکرومولار پردنیزولون و ۲۰۰ نانومولار دگزامتازون (آمریکا، سیگما، D ۴۹۰۲) به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. سپس سلول‌های تیمار شده مورد آنالیز پروتئومیکی قرار گرفتند(۱۰، ۹).

آنالیز پروتئومیکی:

پس از استخراج مخلوط پروتئینی از سلول‌ها، جداسازی پروتئین‌ها با استفاده از روش الکتروفورز دو بعدی بر اساس نقطه ایزوالکتریک صورت گرفت. سپس با

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

استفاده از نرم افزار Image Master ، پروتئین‌های دارای تغییر بیان قابل توجه قبل و بعد از تیمار با دارو با استفاده از روش ژل الکتروفورز دو بعدی جداسازی شدند. لکه‌های پروتئینی از ژل خارج شده و مورد هضم آنزیمی با تریپسین قرار گرفتند.

سپس مخلوط پپتیدی حاصل به وسیله طیف سنجی جرمی بررسی شد. جرم پپتیدهای حاصل از هضم آنزیمی با جرم تئوریکی پپتیدهای حاصل از هضم فرضی پروتئین های موجود در بانک اطلاعات مقایسه شد. اگر تعداد کافی از پپتیدهای موجود در طیف واقعی با پپتیدهای حاصل از هضم تئوریکی از نظر جرمی هم پوشانی داشته باشند، می‌توان پروتئین را با قطعیت شناسایی کرد(۱۰، ۹).

آنالیز شبکه پروتئینی:

در این مطالعه پروتئین‌های شناسایی شده در مطالعه‌های پیشین که توسط همین گروه انجام شده، استخراج شد و سپس شبکه برهم‌کنش پروتئینی مورد ارزیابی و تحلیل قرار گرفت. برای این منظور از روش شبکه ژنی و ابزار جستجوی بازیابی تعامل ژن‌ها و پروتئین‌ها و از پایگاه داده آنلاین STRING نسخه ۱۰/۵ که یک پایگاه داده از اثرات متقابل پروتئینی شناخته و پیش‌بینی شده است، استفاده شد. اطلاعات به دست آمده از این پژوهش در قالب شبکه بر-هم‌کنش پروتئین- پروتئین ارائه شد.

یافته‌ها

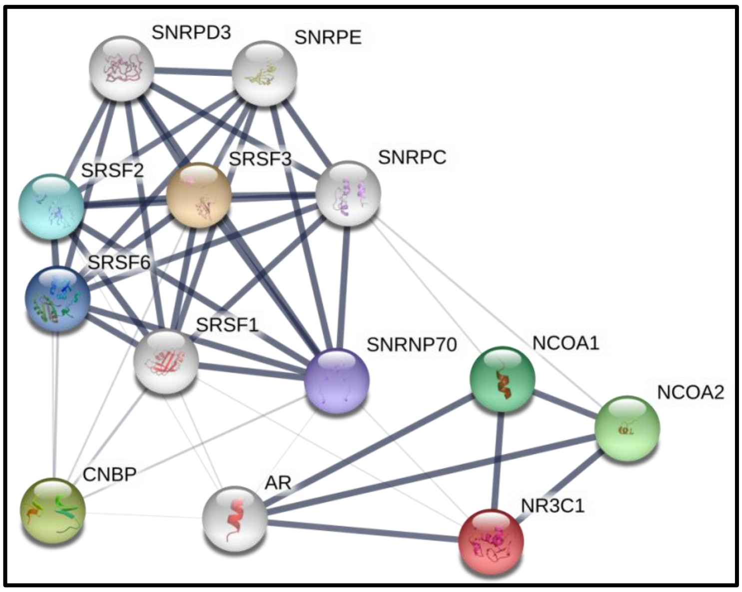
آنالیز پروتئومیکی:

پروتئین‌های شناسایی شده، پروتئین‌هایی هستند که طی تیمار سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Reh و Nalm-6) با دو داروی گلوکوکورتیکوئید(پردنیزولون و دگزامتازون) تغییر بیان داشتند(جدول ۱).

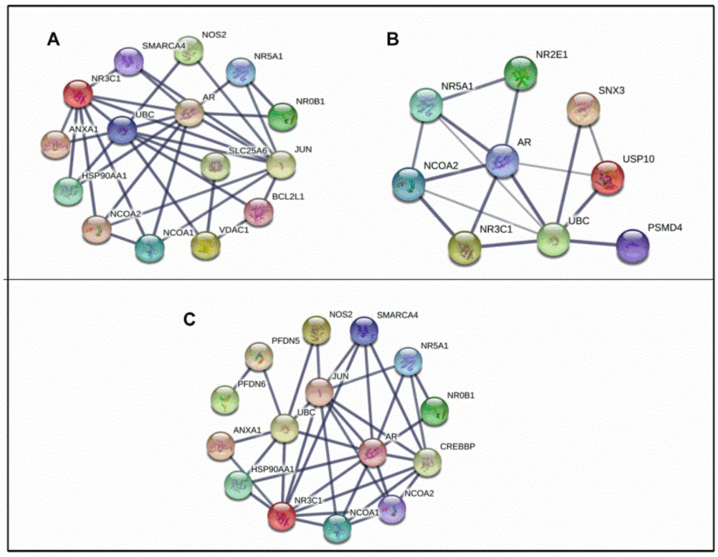
جدول ۱: پروتئین‌های شناسایی شده در سلول‌های Reh و Nalm-6 تیمار شده با داروهای پردنیزلون و دگزامتازون به روش طیف سنجی جرمی

شماره لکه	نام پروتئین	Uniprot code	Mascot score	تنظیم بیان	Fold change
پروتئین‌های شناسایی شده در سلول Reh تیمار شده با پردنیزولون					
۱	SRSF3	P84103	۱۴۰	کاهش	-۲/۲
۲	CNBP	P62633	۶۲	کاهش	-۲
پروتئین‌های شناسایی شده در سلول Reh تیمار شده با دگزامتازون					
۱	VDAC1	P21796	۳۹۸	کاهش	-۲/۳
۲	SNX3	O60493	۹۹	کاهش	-۳/۵
۳	PFDN6	O15212	۱۷۵	کاهش	-۳/۷
پروتئین‌های شناسایی شده در سلول Nalm-6 تیمار شده با پردنیزولون					
۱	PSMB2	P49721	۷۰	کاهش	-۲/۱
۲	PPP4R4	Q6NUP7	۳۷	افزایش	+۳/۶
۳	DUT	P33316	۱۴۶	افزایش	+۴
۴	STMN1	P16949	۵۰	کاهش	-۲/۶
پروتئین‌های شناسایی شده در سلول Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون					
۱	CAPZA1	P49721	۱۸۸	کاهش	-۲/۳
۲	CAPZB	Q6NUP7	۴۴	کاهش	-۳/۸
۳	PNP	P33316	۱۳۱	کاهش	-۲/۸
۴	CLIC1	P33316	۱۳۰	کاهش	-۲/۲
۵	PSME1	P16949	۱۵۹	کاهش	-۲/۸

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019



شکل ۱: شبکه برهم‌کنش پروتئینی SRSF3 و CNBP با NR3C1. سطح بیان هر دو پروتئین در سلول‌های Reh تیمار شده با پردنیزلون در مقایسه با نمونه‌های کنترل کاهش بیان داشته است. SRSF3 در کنترل سیکل سلولی، پیرایش RNA و بیان ژن نقش دارد. CNBP نیز دارای فعالیت چاپرونی است. با توجه به نقش این پروتئین‌ها به نظر می‌رسد سطح آستانه‌ای از این پروتئین‌ها برای حفظ تعادل تکثیر و آپوپتوز لازم است. با توجه به ارتباط این دو پروتئین با NR3C1 به عنوان گیرنده GR، نقش احتمالی این پروتئین‌ها و فرآیند پیرایش RNA در مقاومت به GR در سلول Reh نیز مطرح است.



شکل ۲: A) شبکه برهم‌کنش پروتئینی VDAC1/NR3C1. کاهش بیان VDAC1 بعد از تیمار سلول Reh با دگزامتازون و در نتیجه کاهش برهم‌کنش این پروتئین با BCL2 باعث مقاومت این سلول به آپوپتوز شده است. B) شبکه برهمکنش پروتئینی SNX3/NR3C1. SNX3 در فرآیند اندوسیتوز و نقل و انتقال پروتئین‌ها دخالت دارد. اختلال عملکرد SNX3 می‌تواند منجر به تغییر رسپتورهای سطح سلولی و اختلال در سیگنالینگ و تومورژنز شود. در این مطالعه کاهش بیان SNX3 بعد از تیمار سلول Reh با دگزامتازون مشاهده شد. با توجه به ارتباط ایـن پروتئین با NR3C1 ، نقش احتمالی SNX3 در مقاومت دارویی نیز مطرح می باشد. C) شبکه برهم کنش پروتئینی PFDN6/NR3C1. PFDN6 در عملکرد توبولین‌ها حین میتوز و تنظیم چرخه سلولی نقش دارد. با توجه به کاهش بیان PFDN6 بعد از تیمار سلول Reh با دگزامتازون و ارتباط آن با NR3C1 به عنوان گیرنده GR احتمال ارتباط آن با مقاومت دارویی نیز مطرح است.

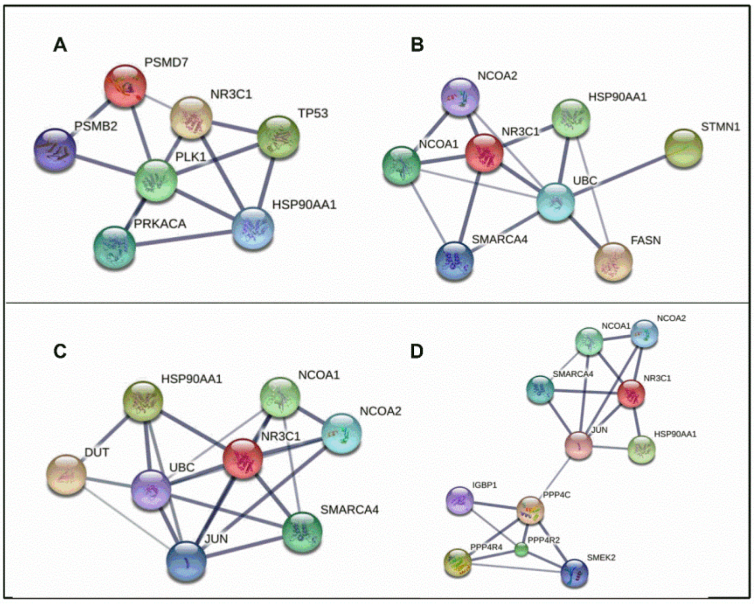
در این مطالعه با توجه به اهمیت مسیرهای سیگنالینگ گیرنده GR در القای مقاومت، به بررسی اینتراکشن‌های پروتئینی گیرنده GR (NR3C1) با سایر تارگت‌های دارویی پردنیزولون و دگزامتازون پرداخته شده است(۴).

شبکه اینتراکشن پروتئینی تارگت‌های دارویی پردنیزولون در رده سلولی Reh و NR3C1:

در این بخش از پژوهش حاضر، نتایج پروتئومیکی بر اساس تغییرات در سطوح بیان پروتئین‌ها در سلول Reh ، به عنوان یک مدل از بیمارانی که پاسخ ضعیف به پردنیزولون می‌دهند(بیماران با خطر بالا)، قبل و بعد از تیمار با پردنیزولون گزارش شد. از ترکیب داده‌های حاصل از آنالیز پروتئوم با اطلاعات بر هم‌کنش پروتئین- پروتئین، جهت تشخیص مسیر سیگنالینگ دخیل در مقاومت پردنیزولون بهره گرفته شد(شکل ۱).

شبکه اینتراکشن پروتئینی تارگت‌های دارویی دگزامتازون در رده سلولی Reh و NR3C1:

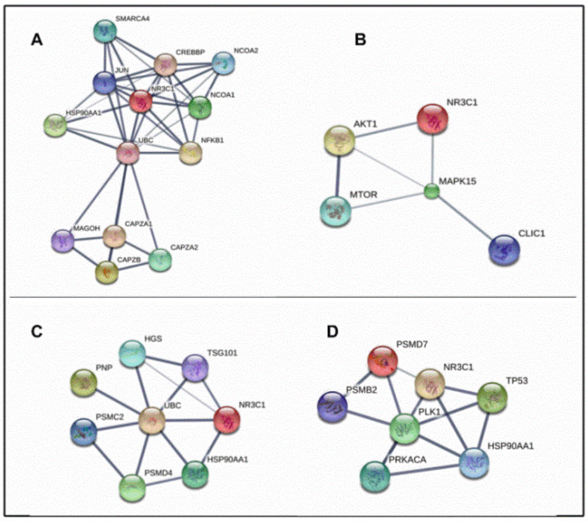
در این بخش از پژوهش حاضر، نتایج پروتئومیکی بر اساس تغییرات در سطوح بیان پروتئین‌ها در سلول Reh، به عنوان یک مدل از بیمارانی که پاسخ ضعیف به دگزامتازون نشان می‌دهند(بیماران با خطر بالا)، قبل و بعد از تیمار با دگزامتازون گزارش شده است. از ترکیب داده‌های حاصل از آنالیز پروتئوم با اطلاعات پروتئین ـ پروتئین اینتراکشن، جهت تشخیص مسیر سیگنالینگ دخیل در مقاومت دگزامتازون بهره گرفته شد(شکل ۲).



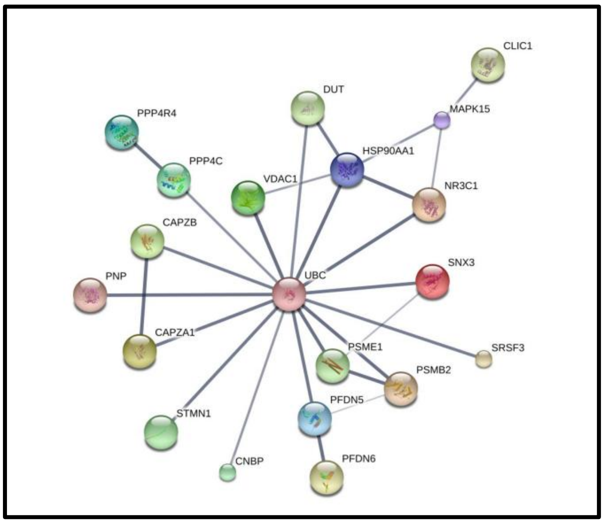
شکل ۳: A) شبکه برهم کنش پروتئینی PSMB2/NR3C1. بیان PSMB2 در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با پردنیزلون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. PSMB2 جزئی از پروتئوزوم بوده و این سیستم به عنوان یک تنظیم کننده مسیر های متابولیکی و چرخه سلولی است. ارتباط این پروتئین با گیرنده GR، NR3C1 در تصویر فوق نشان داده شده است. B) شبکه برهم کنش پروتئینی STMN1/NR3C1. بیان STMN1 در سلول های Nalm-6 تیمار شده با پردنیزولون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. STMN1 تنظیم‌کننده میکروتوبول‌ها حین تقسیم سلولی و تحرک است. ارتباط این پروتئین با گیرنده GR، NR3C1 در تصویر فوق نشان داده شده است. C) شبکه برهم‌کنش پروتئینی DUT/NR3C1. بیان DUT در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با پردنیزولون در مقایسه با نمونه کنترل افزایش داشته است. DUT آنزیم ضروری در متابولیسم نوکلئوتیدهاست. افزایش بیان آن نیز به عنوان یک مکانیسم مقاومت دارویی شناخته شده است. D) شبکه برهم‌کنش پروتئینی PPP4R4/NR3C1. بیان PPP4R4 در سلول‌های Nalm-6 تیمار شده با پردنیزولون در مقایسه با نمونه کنترل افزایش داشته است. PPP4R4 نیز در فرآیند آپوپتوز و سازماندهی میکروتوبول‌ها نقش دارد. هم چنین در تنظیم سیگنالینگ سایتوکاین‌ها و بقای لنفوسیت نیز دخیل است. داده‌های این مطالعه نشان می‌دهد پروتئین PPP4R4 با NR3C1 به عنوان گیرنده GR مرتبط است.

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019



شکل ۴: A) شبکه برهم کنش پروتئینی CAPZB/CAPZA1/NR3C1. بیان این دو پروتئین در سلول های Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. CAP ها برای ایجاد ساختار اسکلت سلولی پایدار لازم اند. در تصویر فوق ارتباط این پروتئین با NR3C1 نشان داده شده است. **B)** شبکه برهم کنش پروتئینی CLIC1/NR3C1. بیان CLIC1 در سلول های Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. CLIC1 نقش مهمی در تنظیم پتانسیل غشا، چرخه سلولی و تکثیر و تمایز آن ایفا می کند. ارتباط این پروتئین با NR3C1 با استفاده از پایگاه داده STRING در تصویر فوق نشان داده شده است. **C)** شبکه برهم کنش پروتئینی PNP/NR3C1. بیان PNP در سلول های Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. PNP در فسفریلاسیون نوکلئوزید های پورین نقش دارد. اختلال در این آنزیم بر بقا و عملکرد سلول تاثیر می گذارد. ارتباط این پروتئین با NR3C1 در تصویر فوق نشان داده شده است. **D)** شبکه برهم کنش پروتئینی PSME1/NR3C1. بیان PSME1 در سلول های Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون در مقایسه با نمونه کنترل کاهش داشته است. PSME1 نیز از اجزای پروتئازوم بوده و اختلال در بیان آن بر بقای سلول اثر دارد. افزایش بیان آن مارکر مهم مقاومت دارویی است. در تصویر فوق ارتباط این پروتئین با NR3C1 نشان داده شده است.



شکل ۵: شبکه بر هم کنش ۱۴ پروتئین شناسایی شده در اثر تیمار سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Reh و Nalm-6) با گلوکوکورتیکوئیدها. گلوکوکورتیکوئیدها ترکیباتی با اهداف چندگانه هستند که اثرات ضد سرطانی آن‌ها به مسیر پروتئازوم- یوبی کوئیتین مرتبط است. نتایج آنالیز شبکه بر هم کنش پروتئینی هم چنین بیانگر این ادعاست که احتمالاً یوبی کوئیتینه شدن، مکانسیم مولکولی دخیل در تعیین پاسخ به درمان در ALL است.

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

شبکه اینتراکشن پروتئینی تارگت‌های دارویی پردنیزولون در رده سلولی Nalm-6 و NR3C1:

در این بخش از پژوهش حاضر، نتایج پروتئومیکی بر اساس تغییرات در سطوح بیان پروتئین‌ها در سلول‌های Nalm-6 ، به عنوان یک مدل از بیمارانی که نه حساسیت و نه مقاومت مطلق به پردنیزولون را نشان دادند، (بیماران با خطر متوسط)، قبل و بعد از تیمار با پردنیزولون گزارش شد. از ترکیب داده‌های حاصل از آنالیز پروتئوم با اطلاعات بر هم‌کنش پروتئین - پروتئین، جهت تشخیص مسیر سیگنالینگ دخیل در مقاومت پردنیزولون بهره گرفته شد (شکل ۳).

شبکه اینتراکشن پروتئینی تارگت‌های دارویی دگزامتازون در رده سلولی Nalm-6 و NR3C1:

در این بخش از پژوهش حاضر، نتایج پروتئومیکی بر اساس تغییرات در سطوح بیان پروتئین‌ها در سلول‌های Nalm-6، به عنوان یک مدل از بیمارانی که حساسیت به پردنیزولون را نشان دادند(بیماران با خطر پایین)، قبل و بعد از تیمار با دگزامتازون گزارش شد. از ترکیب داده‌های حاصل از آنالیز پروتئوم با اطلاعات بر هم‌کنش پروتئین - پروتئین، جهت تشخیص مسیر سیگنالینگ دخیل در مقاومت دگزامتازون بهره گرفته شد(شکل ۴).

در مجموع مطالعه شبکه برهم‌کنش پروتئینی نشان داد که این ۱۴ پروتئین می‌توانند از طریق پروتئین ubiquitin-conjugating enzyme (UBC) با NR3C1 به عنوان گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی(GR)، برهم‌کنش داشته باشند. این موضوع نشان‌دهنده نقش این پروتئین در مسیر پروتئازوم - یوبی کوئیتین است که احتمالاً می‌تواند نقش مهمی در مکانیسم مقاومت به GC در ALL ایفا کند(شکل ۵).

بحث

یافته‌ها نشان داده است که ۱۴ پروتئین تغییر بیان یافته که در مطالعه‌های قبلی در زمینه مقاومت سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد به GC شناسایی شدند، در مسیرهای بیولوژیکی مهمی از جمله مسیر پروتئازوم - یوبی‌کوئیتین نقش ایفا می‌کنند. در طی سال‌های اخیر، تحقیقات بسیاری برای روشن شدن و تعدیل مقاومت گلوکوکورتیکوئیدی صورت گرفته است. اولین مطالعه‌ها بر روی کلیرنس پردنیزولون و یا بیان ناقص گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی معطوف شد. سطح بیان واریانت‌های مختلف هم در سطح پایه و هم بعد از هشت ساعت قرارگیری در معرض پردنیزولون اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد این مقدار با مقاومت پردنیزولون در شرایط *in vitro* در نمونه‌های کودکان مبتلا به ALL ارتباط نداشت(۱۱). علاوه بر این، مشخص شد پلی‌مورفیسم‌ها و یا جهش‌ها در ژن *GR*، از مشارکت‌کنندگان اصلی مقاومت گلوکوکورتیکوئیدی در کودکان مبتلا به ALL نمی‌باشند(۱۲). مطالعه‌ها نشان داده است که مسیرهای سیگنالینگ درگیر در مسیرهای پایین دست یا بالادست گیرنده گلوکوکورتیکوئیدی در ایجاد مقاومت به گلوکوکورتیکوئیدها نقش مهمی دارند. به طور کلی این اطلاعات نشان می‌دهد که مقاومت به گلوکوکورتیکوئیدها می‌تواند ناشی از مکانیسم‌های مؤثر بر مسیر سیگنالینگ درون‌سلولی گیرنده GR باشد(۱۴، ۱۳، ۴). لذا با یافتن مارکرهای مقاومت یا حساسیت به پردنیزولون و دگزامتازون و ارتباط آن‌ها با NR3C1 به عنوان گیرنده GR، می‌توان مسیرهای سیگنالینگ درون سلولی پایین‌دست را شناسایی نمود. ابزارهای پروتئومیکی دریچه‌ای جدید را در شناسایی نشانگرهای زیستی مقاومت دارویی با هدف بهبود درمان فراهم می‌کنند. از این رو در مطالعه‌های پیشین گروه حاضر، به ارزیابی اهداف دارویی گلوکوکورتیکوئیدها شامل پردنیزولون و دگزامتازون در ALL به روش پروتئومیکی پرداخته شد(۱۰، ۹).

بررسی پروتئومیکی سلول‌های تیمار شده با گلوکوکورتیکوئیدها در مقایسه با کنترل نشان از تغییر بیان ۲۸ لکه پروتئینی داشت، که از این تعداد تنها ۱۴ پروتئین به روش طیف‌سنجی جرمی مورد شناسایی قرار گرفتند(جدول ۱). پروتئین‌های شناسایی شده، در مسیرها و فرآیندهای پیرایش جایگزین (SRSF3 = Serine/Argenin-Rich Splicing Factor 3 و CNBP = CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein)،

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

مسیر پروتئازوم (PSMB2 = Proteasome subunit beta 2 ، PSME1 = Proteasome activator complex subunit 1 و STMN1 = Stathmin 1)، مسیر سازماندهی اسکلت سلولی (CAPZA1 = F-actin-capping protein subunit alpha-1، CAPZB ، PPP4C ، STMN و PFDN6)، ترانسپورترها(VDAC1، CLIC1 و SNX3) و متابولیسم نوکلئوتیدها(DUT و PNP) مشارکت داشتند(۲۵-۱۵). در این مطالعه با توجه به اهمیت مسیرهای سیگنالینگ گیرنده GR در القای مقاومت، به بررسی اینتراکشن‌های پروتئینی گیرنده GR (NR3C1) با سایر تارگت‌های دارویی پردنیزولون و دگزامتازون پرداخته شد.

سطح بیان دو پروتئین SRSF3 و CNBP در سلول Reh تیمارشده با پردنیزولون کاهش داشته است(جدول ۱). نتایج حاصل از بررسی برهم‌کنش پروتئین - پروتئین هر دو پروتئین فوق با NR3C1 به عنوان گیرنده هدف پردنیزلون، نقش مسیر سیگنالینگ اسپلایزوم را آشکار نمود(شکل ۱). به عبارتی پیرایش جایگزین در تنظیم GR ها از جمله NR3C1 اهمیت زیادی دارد و از طرفی SRSF3 و CNBP در پیرایش جایگزین نقش کلیدی دارند. اختلال در پیرایش، واریانت‌هایی را تولید می‌کند که در ابعاد مختلف متابولیسم سرطان، متاستاز، آنژیوژنز و مقاومت دارویی دخیل هستند(۲۶). از طرفی داروهای شیمی‌درمانی نیز می‌توانند فرآیندهای پیرایش جایگزین را تغییر دهند(۲۷).

سطح بیان سه پروتئین VDAC1، SNX3 و PFDN6 در سلول Reh تیمارشده با دگزامتازون کاهش معنادار داشته است(جدول ۱). به علاوه نتایج حاصل از بررسی برهم‌کنش پروتئین - پروتئین، برهم‌کنش BCL2-VDAC1-UBC-NR3C1 را نشان داده است. به عبارتی VDAC1 با پروتئین‌های تنظیم‌کننده آپوپتوز و هم چنین گیرنده هدف داروی دگزامتازون، NR3C1، ارتباط دارد(شکل ۲A). این یافته‌ها پیشنهاد می‌دهد که القای افزایش بیان VDAC1 می‌تواند به عنوان یک مکانیسم القای آپوپتوز در تحقیقات مرتبط با مقاومت به داروی دگزامتازون استفاده شود. هم چنین بررسی‌ها نشان داد که NR3C1 احتمالاً توسط عملکرد مرتب‌سازی(sorting function) SNX3 تنظیم می‌شود، بنابراین این پروتئین می‌تواند به عنوان کاندید بالقوه ایجاد مقاومت در این مسیر محسوب شود (شکل ۲B). آنالیز STRING نشان داد که اهداف پایین‌دست مسیر وابسته به PFDN6 شامل PFDN5-UBC-HSP90-NR3C1–PFDN6 ممکن است به دلیل اختلال عملکرد در پرفولدین (Prefoldin) در ایجاد ALL دخالت داشته باشند (شکل ۲C). پرفولدین دارای عملکردهایی همچون تاخوردگی پروتئین، بازسازی اسکلت سلولی و تنظیم چرخه سلولی می‌باشد(۲۰).

هم چنین سطح بیان پروتئین‌های PSMB2 و STMN1 در سلول Nalm-6 تیمار شده با پردنیزلون نسبت به کنترل کاهش داشته است و در مقابل دو پروتئین PPP4R4 و DUT افزایش بیان نشان دادند(جدول ۱). PSMB2 جزئی از پروتئوزوم بوده و این سیستم به عنوان یک تنظیم‌کننده مسیرهای متابولیکی و چرخه سلولی است. STMN1 نیز تنظیم‌کننده میکروتوبول‌ها حین تقسیم سلولی و تحرک است(۱۸، ۱۷). شبکه برهم‌کنش این پروتئین‌ها و ارتباط آن‌ها در مسیرهای پیام‌رسانی القاکننده مقاومت به GR مورد بررسی قرار گرفت. بین PSMB2 و STMN1 با NR3C1 نیز ارتباط معناداری برقرار است که در شکل ۳ نشان داده شده است. DUT آنزیم ضروری در متابولیسم نوکلئوتیدها است. افزایش بیان آن نیز به عنوان یک مکانیسم مقاومت دارویی شناخته شده است(۲۵). PPP4R4 نیز در فرآیند آپوپتوز و سازماندهی میکروتوبول‌ها نقش دارد. هم چنین در تنظیم سیگنالینگ سایتوکاین‌ها و بقای لنفوسیت نیز دخیل است(۲۰). بررسی شبکه برهم‌کنش پروتئین DUT نیز ارتباط بین DUT/UBC/NR3C1 را نشان داد (شکل ۳C). علاوه بر این، ارتباط بین PPP4R4-PPP4C-JUN-NR3C1 هم نشان‌دهنده بر هم‌کنش پروتئین PPP4R4 با NR3C1 می‌باشد(شکل ۳D).

سطح بیان پنج پروتئین به نام‌های CAPZA1، CAPZB، PNP، CLIC1 و PSME1 در سلول Nalm-6 تیمار شده با دگزامتازون نسبت به کنترل کاهش داشته است(جدول ۱). CAP ها برای ایجاد ساختار اسکلت سلولی پایدار لازم‌اند (۱۹). CLIC1 نقش مهمی در تنظیم پتانسیل غشا، چرخه

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

سلولی و تکثیر و تمایز آن ایفا می‌کند(۲۱). PNP در فسفریلاسیون نوکلئوزیدهای پورین نقش دارد. اختلال در این آنزیم بر بقا و عملکرد سلول تاثیر می‌گذارد(۲۴). PSME1 نیز از اجزای پروتئازوم بوده و اختلال در بیان آن بر بقای سلول اثر دارد. افزایش بیان آن به عنوان مارکر مهم مقاومت دارویی مطرح است(۱۸). نتایج حاصل از بررسی برهم‌کنش پروتئین - پروتئین، ارتباط بین CAPZA1 و CAPZB با NR3C1 را نشان داد(شکل ۴A). هم چنین برهم‌کنش پروتئین‌های CLIC1، PNP و PSME1 با NR3C1 نیز در شکل ۴ نشان داده شده است.

در مجموع به نظر می‌رسد GC ها ترکیباتی با اهداف متعدد هستند که اثرات ضدسرطانی آن‌ها با مسیر پروتئازوم- یوبی‌کوئیتین مرتبط است. مطالعه‌های پیشین حاکی از این است که یوبی‌کوئیتیناسیون انکوژن‌ها و ژن‌های سرکوبگر تومور از ویژگی‌های مهم تنظیم در سلول‌های انسانی طبیعی و بدخیم است. UBC در برخی سرطان‌ها مثل سرطان تخمدان به عنوان تارگت مقاومت دارویی معرفی شده است(۲۸). به طور کلی شناخت بیشتر اجزای مسیر پیام‌رسانی وابسته و نقش آن‌ها در ادامه تکثیر سلول‌های سرطانی در حضور GC ضروری است. هم چنین کشف عامل یا عوامل دخیل در افزایش بیان و افزایش فعالیت این اجزا در طی کسب مقاومت به GC، راهگشای ما در مسیر توسعه راه‌کارهای درمانی اثر بخش‌تر خواهد شد.

نتیجه‌گیری

یافته‌های این مطالعه نشان می‌دهد که ۱۴ پروتئین تغییر بیان یافته که در مطالعه‌های پیشین در زمینه مقاومت سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد به GC شناسایی شدند، در مسیرهای بیولوژیکی مهمی از جمله مسیر پروتئازوم- یوبی‌کوئیتین نقش مشترک دارند. لازم است مطالعه‌های بیشتری به منظور بررسی بیان پروتئین‌های دخیل در مسیر پروتئازوم-یوبی‌کوئیتین و نقش بیان یا عدم بیان آن‌ها بر مقاومت به GC و یا به عنوان اهداف بالقوه نشان‌دهنده پیش‌آگهی و درمان ALL صورت پذیرد.

References:

1- Carroll WL, Raetz EA. Clinical and laboratory biology of childhood acute lymphoblastic leukemia. J Pediatr 2012; 160(1): 10-8.
2- Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. Pediatr Clin North Am 2015; 62(1): 61-73.
3- Lin KT, Wang LH. New dimension of glucocorticoids in cancer treatment. Steroids 2016; 111: 84-8.
4- Greenstein S, Ghias K, Krett NL, Rosen ST. Mechanisms of glucocorticoid-mediated apoptosis in hematological malignancies. Clin Cancer Res 2002; 8(6): 1681-94.
5- Linka Y, Ginzel S, Krüger M, Novosel A, Gombert M, Kremmer E, *et al*. The impact of TEL-AML1 (ETV6-RUNX1) expression in precursor B cells and implications for leukaemia using three different genome-wide screening methods. Blood Cancer J 2013; 3(10): e151.
6- Inaba H, Pui CH. Glucocorticoid use in acute lymphoblastic leukaemia. Lancet Oncol 2010; 11(11): 1096-106.
7- Möricke A, Lauten M, Beier R, Odenwald E, Stanulla M, Zimmermann M, *et al*. Prediction of outcome by early response in childhood acute lymphoblastic leukemia. Klin Pädiatr 2013; 225(S 01): S50-6.
8- Jiang N, Kham SKY, Koh GS, Lim JYS, Ariffin H, Chew FT, *et al*. Identification of prognostic protein biomarkers in childhood acute lymphoblastic leukemia (ALL). J Proteomics 2011; 74(6): 843-57.
9- Dehghan-Nayeri N, Rezaei-Tavirani M, Omrani MD, Gharehbaghian A, Pour KG, Eshghi P. Identification of potential predictive markers of dexamethasone resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. J Cell Commun Signal 2017; 11(2): 137-45.
10- Dehghan-Nayeri N, Eshghi P, Pour KG, Rezaei-Tavirani M, Omrani MD, Gharehbaghian A. Differential expression pattern of protein markers for predicting chemosensitivity of dexamethasone-based chemotherapy of B cell acute lymphoblastic leukemia. Cancer Chemother Pharmacol 2017; 80(1): 177-85.
11- Tissing W, Lauten M, Meijerink J, den Boer ML, Koper JW, Sonneveld P, *et al*. Expression of the glucocorticoid receptor and its isoforms in relation to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphocytic leukemia. Haematologica 2005; 90(9): 1279-81.
12- Tissing WJ, Meijerink JP, den Boer ML, Brinkhof B, van Rossum EF, van Wering ER, *et al*. Genetic variations in the glucocorticoid receptor gene are not related to glucocorticoid resistance in childhood acute lymphoblastic leukemia. Clin Cancer Res 2005; 11(16): 6050-6.

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

13- Lewis-Tuffin LJ, Cidlowski JA. The physiology of human glucocorticoid receptor β (hGRβ) and glucocorticoid resistance. Ann N Y Acad Sci 2006; 1069(1): 1-9.
14- Shahidi H, Vottero A, Stratakis CA, Taymans SE, Karl M, Longui CA, *et al*. Imbalanced expression of the glucocorticoid receptor isoforms in cultured lymphocytes from a patient with systemic glucocorticoid resistance and chronic lymphocytic leukemia. Biochem Biophys Res Commun 1999; 254(3): 559-65.
15- He X, Zhang P. Serine/arginine-rich splicing factor 3 (SRSF3) regulates homologous recombination-mediated DNA repair. Mol Cancer 2015; 14(1): 158.
16- Calcaterra NB, Armas P, Weiner AM, Borgognone M. CNBP: a multifunctional nucleic acid chaperone involved in cell death and proliferation control. IUBMB Life 2010; 62(10): 707-14.
17- Yip YY, Yeap YY, Bogoyevitch MA, Ng DC. cAMP-dependent protein kinase and c-Jun N-terminal kinase mediate stathmin phosphorylation for the maintenance of interphase microtubules during osmotic stress. J Biol Chem 2014; 289(4): 2157-69.
18- Schmidt M, Finley D. Regulation of proteasome activity in health and disease. Biochim Biophys Acta 2014; 1843(1): 13-25.
19- Mi N, Chen Y, Wang S, Chen M, Zhao M, Yang G, *et al*. CapZ regulates autophagosomal membrane shaping by promoting actin assembly inside the isolation membrane. Nat Cell Biol 2015; 17(9): 1112-23.
20- Miyoshi N, Ishii H, Mimori K, Nishida N, Tokuoka M, Akita H, *et al*. Abnormal expression of PFDN4 in colorectal cancer: a novel marker for prognosis. Ann Surg Oncol 2010; 17(11): 3030-6.
21- Averaimo S, Milton RH, Duchen MR, Mazzanti M. Chloride intracellular channel 1 (CLIC1): Sensor and effector during oxidative stress. FEBS Lett 2010; 584(10): 2076-84.
22- Overduin M, Rajesh S, Gruenberg J, Lenoir M. Secondary structure and 1H, 13C, 15N resonance assignments of the endosomal sorting protein sorting nexin 3. Biomol NMR Assign 2015; 9(2): 355-8.
23- Shoshan-Barmatz V, Ben-Hail D, Admoni L, Krelin Y, Tripathi SS. The mitochondrial voltage-dependent anion channel 1 in tumor cells. Biochim Biophys Acta 2015; 1848(10 Pt B): 2547-75.
24- Giuliani P, Zuccarini M, Buccella S, Rossini M, D'Alimonte I, Ciccarelli R, *et al*. Development of a new HPLC method using fluorescence detection without derivatization for determining purine nucleoside phosphorylase activity in human plasma. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci 2016; 1009-1010: 114-21.
25- Ladner RD. The role of dUTPase and uracil-DNA repair in cancer chemotherapy. Curr Protein Pept Sci 2001; 2(4): 361-70.
26- Ghigna C, Valacca C, Biamonti G. Alternative splicing and tumor progression. Curr Genomics 2008; 9(8): 556-70.
27- Shkreta L, Froehlich U, Paquet ER, Toutant J, Elela SA, Chabot B. Anticancer drugs affect the alternative splicing of Bcl-x and other human apoptotic genes. Mol Cancer Ther 2008; 7(6): 1398-409.
28- Yin F, Liu X, Li D, Wang Q, Zhang W, Li L. Tumor suppressor genes associated with drug resistance in ovarian cancer. Oncol Rep 2013; 30(1): 3-10.

Downloaded from bloodjournal.ir at 0:55 +0330 on Tuesday February 19th 2019

Original Article

The Significance of Ubiquitin-Proteasome Pathway in Glucocorticoid Resistance Development in Acute Lymphoblastic Leukemia

Dehghan-Nayeri N.[1], Eshghi P.[2,3], Goudarzi Pour K.[2,3], Darvishi M.[1], Gharehbaghian A.[1,2]

[1]School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2]Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[3]Mofid Children's Hospital, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives
ALL is the most common malignancy in childhood. Presently, approximately 20% of patients do not respond to treatment due to the resistance of leukemia blasts. Response to GCs is considered as the strongest independent factor in predicting ALL patients outcome. Therefore, identification of GCs resistance markers are the beneficial tools for improvement of prognostic strategies in ALL.

Materials and Methods
In this experimental study, the protein-protein interaction network of fourteen significant down or up-regulated proteins in the proteome of human lymphoblastic cell treated with prednisolone and dexamethasone were analyzed by using the STRING online database.

Results
By using proteomics methods, fourteen down or up-regulated proteins, SRSF3, CNBP, VDAC1, SNX3, PFDN6, PSMB2, STMN1, PPP4R4, DUT, CAPZA1, CAPZB, PNP, CLIC1 and PSME1 were recognized in both the sensitive and resistant GC cell lines. Correlation between these proteins were analyzed by using the STRING database.

Conclusions
Overall, the findings showed that the Ubiquitin-Proteasome pathway plays a pivotal role in inducing resistance to GC in ALL. Therefore, the study of key controlling proteins in this pathway can play an important role in clarifying the mechanisms of induction of resistance to GC and consequently the prognosis of the disease.

Key words: Lymphoblastic Leukemia، Acute, Drug Resistance, Glucocorticoids, Biomarkers

Received: 4 Feb 2018
Accepted: 9 May 2018

Correspondence: Gharehbaghian A., PhD in Clinical Immunohematology. School of Allied Medical Sciences, Shahid Beheshti University of Medical Sciences and Pediatric Congenital Hematologic Disorders Research Center, Shahid Beheshti University of Medical Sciences.
P.O.Box: 15468-15514, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 22721150; Fax: (+9821) 22731999
E-mail: *gharehbaghian@sbmu.ac.ir*