

القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمیک پرومیلوسیتی (NB4) توسط الیگونوکلوئید ضد آنزیم تلومراز

لیلا اصغری کیا^۱، داود بشاش^۲، سید حمیداله غفاری^۳، محسن حمیدپور^۴، اردشیر قوام‌زاده^۵

چکیده

سابقه و هدف

به دلیل فعالیت بالای آنزیم تلومراز در تکثیر اغلب سرطان‌ها از جمله لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد (APL)، مهار تلومراز روش مناسبی جهت درمان می‌باشد. در این مطالعه به بررسی اثر الیگونوکلوئید ضد تلومراز بر روی القای مرگ سلولی و آپوپتوز سلول‌های NB4 پرداختیم.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، به منظور بررسی اثر الیگونوکلوئید آنتاگونیست تلومراز، سلول‌ها تحت دوزهای مختلف الیگونوکلوئید قرار گرفتند. جهت بررسی اثر این دارو بر زنده‌مانی سلول‌ها، آزمایش MTT انجام شد و جهت بررسی مولکولی القای آپوپتوز، بیان ژن‌های دخیل در این روند به روش Real-Time PCR ارزیابی گردید.

یافته‌ها

الیگونوکلوئید قادر به کاهش درصد زنده‌مانی و القای مرگ سلولی می‌باشد. تیمار سلول‌ها با الیگونوکلوئید در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میکومولار، به صورت وابسته به دوز پس از طی ۴۸ ساعت باعث کاهش درصد زنده‌مانی سلول‌ها و مرگ سلولی گردید. شایان ذکر است میانگین درصد زنده‌مانی در غلظت ۴۰ میکومولار، ۶۴٪ بود، در حالی که این درصد در تیمار سلول‌ها با الیگونوکلوئید کنترل ۹۴٪ می‌باشد. علاوه بر این، نتایج حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که مرگ سلولی القا شده با این الیگونوکلوئید با افزایش بیان ژن Bax و کاهش بیان Bcl-۲ همراه می‌باشد.

نتیجه‌گیری

با توجه به طول تلومر کوتاه و فعالیت بالای آنزیم تلومراز در بیماران APL و همچنین اثربخشی الیگونوکلوئید در القای مرگ سلولی در سلول‌های پرومیلوسیتیکی NB4، می‌توان درمان‌های مبتنی بر استراتژی مهار آنزیم تلومراز را به عنوان راه‌کار مناسب در این بیماران مدنظر قرار داد.

کلمات کلیدی: لوسمی پرومیلوسیتیکی حاد، آپوپتوز، مرگ سلولی

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۲۷

تاریخ پذیرش: ۹۴/۸/۶

۱- کارشناس ارشد خون‌شناسی و بانک خون - گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۲- PhD خون‌شناسی و بانک خون - استادیار گروه هماتولوژی دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۳- مؤلف مسئول: PhD ژنتیک مولکولی - دانشیار مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - کارگر شمالی - تهران - ایران - کدپستی: ۱۴۱۱۱

۴- PhD خون‌شناسی و بانک خون - دانشیار دانشکده پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی - تهران - ایران

۵- فوق تخصص خون و انکولوژی - استاد مرکز تحقیقات خون، انکولوژی و پیوند سلول‌های بنیادی بیمارستان شریعتی و دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران - تهران - ایران

مقدمه

لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، زیر گروهی از لوسمی‌های میلوئیدی حاد (Acute Myeloid Leukemia) است که با جابه‌جایی کروموزومی (15:17) t در ۹۰٪-۸۵٪ موارد همراه بوده و منجر به تشکیل انکوپروتئین PML-RAR α می‌شود (۱، ۲). تاکنون پنج ترانسلوکیشن کروموزومی در ارتباط با این بیماری شناسایی شده‌اند که همگی با درگیری ژن گیرنده رتینوئیک اسید (متابولیت فعال ویتامین A) یا همان RAR α همراه هستند (۳). این بیماری یکی از شدیدترین انواع بیماری AML همراه با خونریزی بوده و در کمتر از چندین هفته می‌تواند سبب مرگ بیماران شود (۳). در بیماران تازه تشخیص داده شده، شیمی‌درمانی خط اول دفاعی در این بیماران را تشکیل می‌دهد. با این رژیم درمانی فقط ۴۵٪-۳۵٪ بیماران به بهبودی کامل حدود ۲۵-۱۱ ماه رسیده و خونریزی‌های شدید در بعضی موارد مرگ بیماران را نیز به دنبال دارد. در سال ۱۹۸۵ معرفی ATRA سبب تحولی عظیم در درمان بیماری APL شد. ATRA که ایزومری از ویتامین A می‌باشد، با القای تمایز و پیشبرد مراحل بلوغ باعث افزایش بهبودی کامل به حدود ۸۵٪ می‌شود. با این حال درمان با ATRA در بعضی از بیماران حالت مقاومت دارویی را ایجاد می‌کند که سبب عود بیماری، بالا رفتن تعداد گلبول‌های سفید و ایجاد سندرم کشنده رتینوئیک اسید (RAS) می‌شود (۴).

مشخص شده است که مهم‌ترین تفاوت بین سلول‌های سرطانی و طبیعی، توانایی تکثیر و رشد غیرقابل کنترل، تهاجم به بافت‌ها و انتشار متاستاتیک این سلول‌ها می‌باشد. فعالیت تلومراز و حفظ طول تلومرها، کلید اصلی توانایی سلول‌های سرطانی برای نامیرا شدن می‌باشد (۵). تلومرها توالی‌های تکراری TTAGGG می‌باشند و به عنوان کلاهکی در انتهای DNA، از کروموزوم سلول‌های یوکاریوتی محافظت می‌کنند. مشخص شده است که از دست رفتن تلومر به بی‌ثباتی ژنتیکی، پیری و آپوپتوز منجر شده و وجود آنزیم تلومراز مانع از کوتاهی و فرسایش تلومرها شده و مسئول نامیرایی سلول‌های تومورال و قابلیت تکثیر نامحدود این سلول‌ها است (۶). این آنزیم در بسیاری از سلول‌های سوماتیک بیان نمی‌شود، اما در سلول‌های

سریع‌التکثیر مانند استم سل‌ها (HSC)، سلول‌های جنسی مردان و سلول‌های سرطانی بیان می‌شود (۵). این آنزیم از دو زیر واحد کاتالیتیک تحت عنوان hTERT و یک جزء RNA به نام hTERC تشکیل شده است (۶). با توجه به افزایش فعالیت آنزیم تلومراز در بیش از ۸۵٪ بدخیمی‌های انسان، این آنزیم به عنوان هدف درمانی بسیار امیدوار کننده جهت درمان سرطان‌ها معرفی شده و اخیراً مهارکنندگان تلومراز به عنوان راه‌کارهای درمانی جدید مورد توجه شایانی قرار گرفته‌اند (۷).

از مهم‌ترین داروهای مهارکننده تلومراز می‌توان به ترکیبات الیگونوکلوئیدی مهارکننده hTERT اشاره کرد. ترکیبات الیگونوکلوئیدی هم چون GRN163L با هدف قراردادن ۱۱ نوکلئوتید واحد RNA تلومراز و با مهار رقابتی، از تشکیل کمپلکس hTERT با واحد کاتالیتیک TERT جلوگیری به عمل می‌آورد؛ روندی که با کوتاه شدن طول تلومر، الحاق کروموزومی، شکست‌های کروموزومی و توقف تقسیم میتوزی همراه می‌شود (۸، ۹). تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که GRN163L، داروی مناسبی در مهار تلومراز و جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی در بدخیمی‌هایی هم چون CLL، سرطان پروستات، سرطان مری، مالتیپل میلوما و بسیاری دیگر از بدخیمی‌ها می‌باشد (۹، ۱۰).

علی‌رغم این که درمان بیماران APL با سه استراتژی ATRA، ATO و داروهای شیمی‌درمانی موجب تحولی عظیم در درمان بیماران شده است، با این حال مواردی از بیماری مشاهده می‌شود که در برابر این درمان‌ها مقاومت می‌کنند (۱۱، ۱۲). مطالعه‌های قبلی نشان داده‌اند که نزدیک به ۹۰٪ از بیماران APL، به طور قابل توجهی دارای تلومرهای کوتاه (متوسط TRF: kb ۳/۵) می‌باشند که این امر بازگوکننده افزایش فعالیت پرولیفراتیو سلول‌ها در این بیماری است (۱۳). هم چنین بیان شده‌است که طول تلومری کوتاه و افزایش فعالیت تلومراز در بیماران APL، با پیشرفت و عود بیماری مرتبط بوده و نشان‌دهنده زیر مجموعه‌ای از بیماران با بیماری تهاجمی‌تر و علائم بالینی شدیدتر است (۱۴، ۱۳). از طرفی دیگر تحقیقات مختلف نشان می‌دهند که سلول‌هایی با تلومر کوتاه‌تر و فعالیت

اسیدی و در برابر نوکلئازها می‌شود. در ضمن لازم به ذکر است که با تغییر در سکانس نوکلئوتیدی، الیگونوکلئوتید دیگری به عنوان الیگونوکلئوتید کنترل طراحی شد.

تیمار دارویی سلول‌ها با الیگونوکلئوتید به روش ترانسفکشن:

برای تیمار دارویی سلول‌ها با الیگونوکلئوتید طراحی شده از روش ترانسفکشن با لیپوفکتامین ۲۰۰۰ تهیه شده از شرکت اینویترژن استفاده شد. در این روش سلول‌های NB4 به تعداد ۷۰۰۰ سلول با استفاده از محیط RPMI حاوی FBS بدون آنتی بیوتیک در هر چاهک پلیت ۹۶ خانه ریخته شدند. طبق دستورالعمل ارائه شده توسط شرکت اینویترژن، عمل ترانسفکشن با الیگونوکلئوتید در غلظت‌های مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار و غلظت ثابت ۲۵ μL / ۰/۲۵ لیپوفکتامین بر روی سلول‌های NB4 انجام گرفت؛ سلول‌ها در انکوباتور ۳۷ درجه سانتی‌گراد حاوی ۵٪ CO₂ انکوبه شده و پس از گذشت ۶ ساعت محیط کشت سلول‌ها که حاوی الیگونوکلئوتید بود با محیط RPMI حاوی FBS بدون آنتی‌بیوتیک جایگزین شده و سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت دیگر انکوبه شدند.

کسب غلظت بهینه الیگونوکلئوتید و بررسی درصد زنده‌مانی سلول‌ها:

در این مطالعه به منظور به‌دست آوردن غلظت بهینه الیگونوکلئوتید طراحی شده مهارکننده تلومراز و همچنین بررسی تاثیر سایتوتوکسیک الیگونوکلئوتید بر میزان زنده‌مانی سلول‌ها، از روش MTT استفاده شد. برای این کار از پلیت ۹۶ چاهکی و با مقادیر متفاوت ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلئوتید و ۰/۲۵ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ استفاده شد. پلیت‌ها در انکوباتور قرار داده شدند و ۶ ساعت بعد از ترانسفکشن، محیط سلول‌ها با محیط RPMI دارای FBS ۱۰٪ تعویض شد و ۴۸ ساعت بعد از ترانسفکشن، آزمون MTT انجام شد. به هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول MTT اضافه شده و پلیت به مدت ۵ دقیقه شیک و به مدت ۳ ساعت دیگر انکوبه شد. سپس پلیت به مدت ۱۰ دقیقه با دور ۳۵۰g سانتریفوژ گردید.

تلومراز بالاتر، بیشتر از درمان ضد تلومراز بهره‌مند خواهند شد (۱۵)؛ لذا چشم‌انداز اضافه کردن درمان‌های مبتنی بر مهار تلومراز می‌تواند در بیماران APL امیدوارکننده باشد و به نظر می‌رسد این بیماران، کاندید مناسبی برای درمان با مهارکنندگان تلومراز باشند (۱۶). به این منظور و برای بررسی کارایی استفاده از استراتژی درمان آنتی‌تلومراز در بیماری APL، نوعی الیگونوکلئوتید در این مطالعه طراحی و نتایج حاصل از تیمار سلول‌های NB4 با غلظت‌های متفاوت این الیگونوکلئوتید مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی:

در این مطالعه تجربی، سلول‌های NB4 (رده سلولی انسانی APL) به صورت سوسپانسیون در محیط کشت RPMI ۱۶۴۰ حاوی ۲mM از L-گلوتامین، FBS ۱۰٪، پنی‌سیلین به میزان ۱۰۰ U/mL و استرپتومایسین به میزان ۱۰۰ μg/mL در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و فشار ۵٪ از CO₂ کشت داده شدند. سلول‌های NB4 از بانک سلولی انستیتو پاستور تهیه شد و برای بررسی حضور (۱۷:۱۵)، روش استاندارد کاربوتایپینگ انجام شد. هم‌چنین این رده سلولی برای حضور mRNA ژن ترکیبی PML/RARα نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

طراحی الیگونوکلئوتید:

در این مطالعه با توجه به تحقیق و مطالعه فراوان بر روی ساختار الیگونوکلئوتیدهای تجاری و اعمال تغییرات بر روی ساختار شیمیایی آن‌ها، الیگونوکلئوتید جدیدی برای مهار آنزیم تلومراز طراحی شد. بدین ترتیب که الیگونوکلئوتید از ۱۳ واحد نوکلئوتیدی 3'-5' TAGGGTTAGACAA- اصلاح شده با ساختار N3'→P5' تیوفسفرآمید (phosphothioate linkage) تشکیل شده که مکمل منطقه RNA تلومراز می‌باشد. شایان ذکر است اصلاح جایگاه‌های تیوفسفرآمید، ارتباط داخل نوکلئوزیدی با RNA را برای ثبات ترمودینامیکی بالا و نیمه عمر طولانی الیگونوکلئوتید فراهم می‌کند؛ همچنین اصلاحات تیوفسفرآمید سبب مقاومت الیگونوکلئوتید در شرایط

سپس مایع رویی را دور ریخته و به رسوب سلولی ته هر چاهک ۱۰۰ میکرولیتر محلول DMSO اضافه گردید. پس از مخلوط نمودن به مدت ۵ دقیقه، پلیت را به مدت ۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه نمودیم. سپس جهت خواندن جذب نوری چاهک‌ها، پلیت را در دستگاه الیزا ریدر قرار داده و در طول موج ۵۷۰ نانومتر جذب نوری قرائت شد. به منظور افزایش بهره‌وری و بررسی مقایسه‌ای، تمامی آزمایش‌ها برای هر دوز به صورت تری‌پلیکیت انجام شد. میزان زنده‌مانی ایجاد شده با توجه به میانگین مقادیر OD از پلیت MTT که توسط دستگاه الیزا ریدر به دست آمده است طبق فرمول زیر محاسبه شد:

تعداد سلول‌های زنده

$$100 \times \frac{\text{درصد زنده‌مانی سلول‌ها}}{\text{مجموع سلول‌های زنده و مرده}}$$

استخراج RNA:

برای استخراج RNA ابتدا سلول‌ها با لیوفکتامین ۲۰۰۰ و الیگونوکلوئید مهارکننده تلو‌مراز ترانسفکت شده و بعد از ۶ ساعت از ترانسفکشن، با محیط RPMI60 حاوی FBS 10% تعویض محیط صورت گرفت و به مدت ۴۸ ساعت در ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. پس از تیمار، سلول‌ها جمع‌آوری شده و RNA سلول‌ها با استفاده از کیت High Pure RNA Isolation شرکت روش استخراج شد و مقدار RNA با روش تعیین جذب نوری (OD) و میزان جذب در طول موج ۲۶۰ nm توسط دستگاه نانودراپ ND-1000 (نانودراپ تکنولوژیس - ویل مینگتون) اندازه‌گیری شد. هم‌چنین برای بررسی کیفیت RNA استخراج شده، ۲ میکرولیتر از RNA استخراج شده را بر روی ژل آگاروز ۱/۵٪ با ولتاژ ۱۴۰ ولت در تانک الکتروفورز به مدت ۱۵ دقیقه الکتروفورز کردیم.

ساخت cDNA:

برای ساخت cDNA در این تحقیق از کیت PrimeScript™ RT reagent (تاکارا بیو) استفاده شد. برای هر نمونه استخراج شده RNA، یک لوله نیم میلی‌لیتری انتخاب شد. برای ساخت cDNA با توجه به تعداد نمونه‌ها میزان مورد نیاز Master Mix تهیه گردید. حجم مورد نظر

برای ساخت cDNA، ۲۰ میکرولیتر بوده و محتویات Master Mix برای هر واکنش شامل ۴ μL بافر ۵X، PrimeScript™ RT Enzyme، ۱ μL از Oligo dT (۵۰ μM)، ۱ μL از ۶ mers، ۱ μL از Random (۱۰۰ μL) و ۱ μg از RNA مورد نظر می‌باشد که در نهایت با آب DEPC حجم مورد نظر به ۲۰ میکرولیتر رسانده می‌شود. سپس لوله‌ها ۱۵ دقیقه در ۳۷ درجه سانتی‌گراد جهت انجام رونویسی معکوس و ۵ ثانیه در ۸۵ درجه سانتی‌گراد جهت غیرفعال شدن آنزیم نسخه‌بردار معکوس توسط تیمار حرارتی در دستگاه PCR قرار گرفتند. cDNA ساخته شده در ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی بیان ژن با Real-Time PCR:

آزمون Real-Time PCR با استفاده از دستگاه Applied Biosystems StepOnePlus™ و در حجم ۲۰ میکرولیتر انجام شد. به ازای هر واکنش، ۱۰ μL از SYBR® Premix (2X)، Ex Taq™ (2X)، ۲ μL از محصول cDNA، ۰/۵ μL از هر یک از آغازگرها (۱۰ pMol) و ۷ μL آب عاری از نوکلئاز اضافه شد (جدول ۱). شرایط دمایی مورد استفاده شامل یک مرحله آماده‌سازی اولیه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ ثانیه و سپس ۴۰ چرخه برای دناتوراسیون (۵ ثانیه در ۹۵ درجه سانتی‌گراد) و مرحله آنیلینگ/اکستنشن توأم (۲۰ ثانیه در ۶۰ درجه سانتی‌گراد) بود. برای بررسی اختصاصیت محصول تکثیر شده، منحنی ذوب مورد بررسی قرار گرفت. از جمله مزایای Real-Time PCR، ترسیم منحنی ذوب است که این عمل پس از اتمام فرآیند PCR انجام می‌شود و در واقع نوعی بررسی کیفی محسوب می‌گردد. دمایی که در آن DNA دو رشته‌ای دناتوره یا از هم باز می‌شود، نقطه ذوب خوانده می‌شود. از آن جایی که SYBR Green نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد، می‌توان با استفاده از منحنی ذوب (Melting Curve) تنوع محصولات را در فرآیند PCR مشخص کرد. در این آزمون از ژن HPRT به عنوان ژن مرجع استفاده شد. از آن جایی که سایبرگرین نمی‌تواند بین محصولات مختلف تفاوتی قائل باشد، با استفاده از منحنی

جدول ۱: توالی آغازگرهای به کار رفته در مطالعه جهت آزمون Real-Time PCR

اندازه (bp)	آغازگر معکوس (5'-3')	آغازگر جلوپرنده (5'-3')	ژن
۱۱۱	CCAGCAGGTCAGCAAAGAATTTA	TGGACAGGACTGAACGTCTTG	HPRT
۲۴۲	GTGGGCGTCCCAAAGTAGG	CGAGAGGTCTTTTCCGAGTG	Bax
۹۰	CGGTTCAGGTACTCAGTCATCC	CGGTGGGGTCATGTGTGTG	Bcl-۲

تاثیر الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز بر روی بیان ژن Bax و Bcl-۲:

به دنبال اثرات سایتوتوکسیک الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز، در این مطالعه به بررسی ژنهای کلیدی دخیل در القای مرگ سلولی و آپوپتوز پرداختیم. پس از انجام Real-Time PCR، آنالیز منحنی ذوب نشان می‌دهد که هیچ گونه آغازگر دایمر و یا تکثیر DNAهای اضافی وجود نداشته و رشته DNA تکثیر شده به طور اختصاصی رشته DNA ژن هدف (Bax) می‌باشد (شکل ۱). غلظت بهینه ۴۰ pMol /μL به دست آمده از الیگونوکلوئوتید طراحی شده سبب افزایش بیان ژن Bax به میزان ۱/۲ برابر در مقایسه با سلولهای تیمار نشده NB4 شده است، این در حالی است که تغییر معناداری در بیان این ژن به واسطه تیمار سلولها با الیگونوکلوئوتید کنترل مشاهده نمی‌شود (نمودار ۲). هم چنین بررسی بیان ژنها نشان داد که غلظت بهینه ۴۰ pMol الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز، موجب کاهش بیان ژن Bcl ۲ به میزان ۰/۳ برابر شده است، این در حالی است که الیگونوکلوئوتید کنترل تاثیری در کاهش بیان این ژن نداشته است (نمودار ۲). به منظور بررسی تغییر بیان ژنهای Bax و Bcl ۲ در تعیین سرنوشت سلول، نسبت Bax/Bcl ۲ اندازه گیری شد. نتیجه به دست آمده نشان داد که نسبت Bax/Bcl-۲ در سلولهای NB4 تیمار شده با الیگونوکلوئوتید به میزان ۱/۷ برابر افزایش داشته است، ولی در تیمار این سلولها با الیگونوکلوئوتید کنترل، افزایشی مشاهده نشد (نمودار ۳). هر چند که تغییرات ژنهای Bax و Bcl ۲ به تنهایی تفاوت چشمگیری با کنترل نداشته است اما نسبت Bax/Bcl ۲ که تعیین کننده بقا یا مرگ سلول می‌باشد، به طور معناداری افزایش پیدا کرده است که بیانگر القای مرگ سلولی می‌باشد.

ذوب اختصاصیت محصولات در فرآیند PCR مشخص گشت. در انتها برای محاسبه تعداد نسخه mRNA تکثیر شده، از فرمول $\Delta\Delta Ct - 2$ استفاده شد.

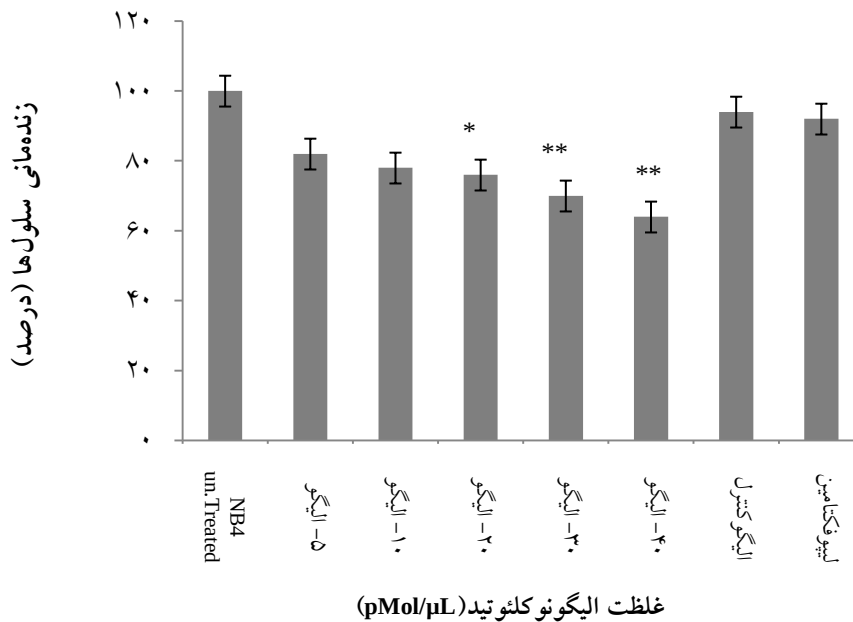
آنالیز آماری:

برای انجام مطالعه‌های آماری از SPSS ۱۸ استفاده شد. اختلاف معنادار بین متغیرهای آزمایش با استفاده از آزمون student two tailed تعیین شد. مقادیر به دست آمده با $p < ۰/۰۵$ از نظر آماری معنادار در نظر گرفته شد.

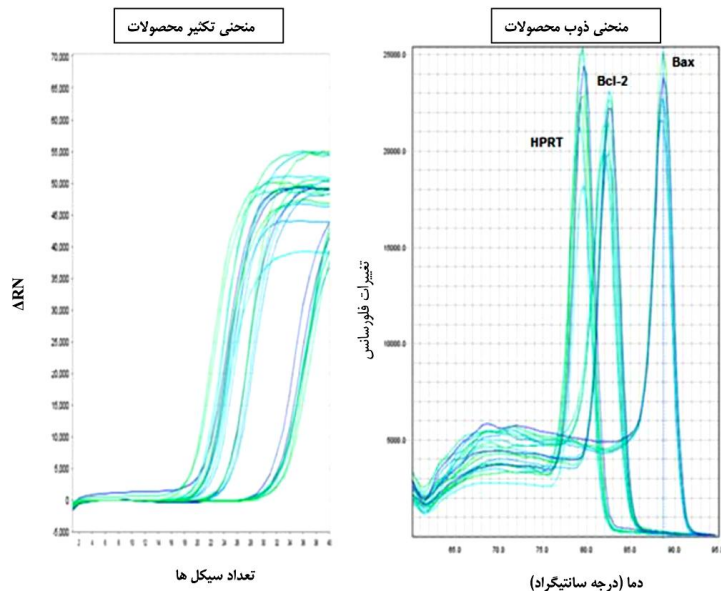
یافته‌ها

الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز به صورت وابسته به دوز باعث کاهش زنده‌مانی سلولهای NB4 می‌شود: با استفاده از روش MTT، مقادیر غلظت بهینه الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز تعیین شد. در این روش مقادیر متفاوتی از الیگونوکلوئوتید مورد استفاده قرار گرفت و زنده‌مانی سلولها پس از گذشت ۴۸ ساعت محاسبه شد. نتایج زنده‌مانی به دست آمده از MTT در غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلوئوتید به ترتیب: ۸۲٪، ۷۸٪، ۷۴٪، ۷۰٪، ۶۴٪ و ۸۹٪ بودند (نمودار ۱).

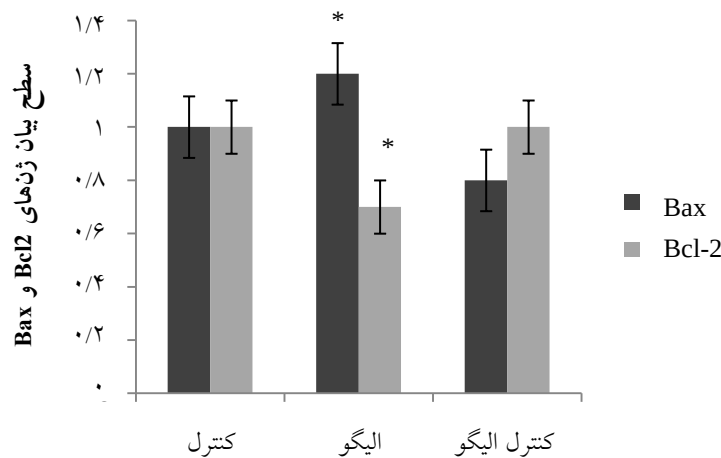
با توجه به نتایج، دوز ۴۰ pMol این مهارکننده به عنوان دوز بهینه در نظر گرفته شد. از الیگونوکلوئوتید کنترل و سلولهای NB4 که عمل تیمار بر روی آنها انجام نگرفته بود، به عنوان کنترل استفاده شد و برای بررسی اثر سمیت لیپوفکتامین بر روی سلولها، خود لیپوفکتامین نیز به تنهایی بر روی سلولها ریخته شد. طی نتایج به دست آمده مشاهده شد که لیپوفکتامین بر روی سلولها اثر سمی نداشته و نتیجه زنده‌مانی حاصل از الیگونوکلوئوتید کنترل در غلظت ۴۰ pMol نیز ۹۴٪ می‌باشد.



نمودار ۱: تعیین دوز بهینه الیگونوکلوئید مهارکننده تلوئومراز سلول های NB4 در تعداد ۷۰۰۰ سلول در پلیت ۹۶ خانه ای به روش ترانسفکشن تحت تاثیر مقادیر مختلف ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰ و ۵۰ پیکومولار الیگونوکلوئید و ۰/۲۵ میکرولیتر لیپوفکتامین ۲۰۰۰ قرار گرفته و پس از مدت زمان ۴۸ ساعت انکوباسیون، درصد زنده‌مانی آن‌ها محاسبه شد. نتایج نشان داد که با بالا رفتن غلظت الیگونوکلوئید مرگ سلولی در این سلول‌ها بیشتر شده و بیشترین مرگ سلولی در غلظت ۴۰ pMol/μL مشاهده شد. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از سه ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (p < ۰/۰۰۱؛ ***؛ p < ۰/۰۱؛ **؛ p < ۰/۰۵؛ *) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد.

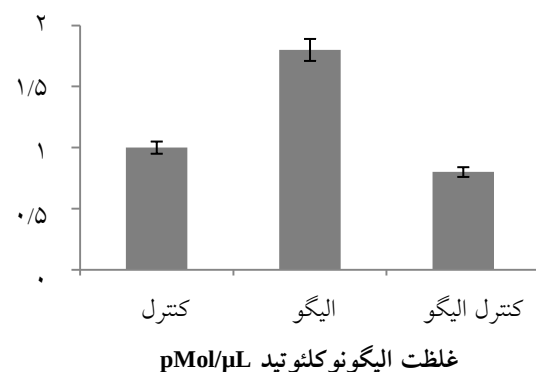


شکل ۱: منحنی ذوب (راست) و منحنی تکثیر (چپ) ژن‌های مورد بررسی: همان طور که در شکل دیده می‌شود، پس از مشتق‌گیری منحنی درجه دومی به دست می‌آید که وجود پیک‌های ذوب با نقاط ماکزیمم واحد فلورسانس دلالت بر این امر دارد که رشته DNA تکثیر شده به طور اختصاصی رشته ژن مورد هدف Bcl-۲, Bax و ژن مرجع HPRT می‌باشد. از آنجا که دمای ذوب محصولات PCR با طول و توالی‌های مختلف متفاوت است، لذا با استفاده از نمودار دمای ذوب (Melting Curve) می‌توان DNA دو رشته‌ای هدف را شناسایی کرد. ARN: افزایش فلورسانس نرمالیزه شده (Rn) در طول PCR



نمودار ۲: تغییرات سطوح mRNA ژن‌های *Bax* و *Bcl-2* در تیمار دارویی با الیگونوکلوئید مهارکننده تلومراز: نتایج به دست آمده از تیمار سلول‌ها با الیگونوکلوئید مهارکننده تلومراز و اثر آن بر روی بیان ژن‌های *Bax*, *Bcl-2* مبین این موضوع است که غلظت بهینه ۴۰ pMol /μL الیگونوکلوئید سبب افزایش بیان ژن *Bax* به میزان ۱/۲ برابر و کاهش بیان ژن *Bcl-2* به میزان ۳/۴ برابر در مقایسه با سلول‌های تیمار نشده شده است. همان طور که در این نمودار نشان داده شده است، الیگونوکلوئید کنترل در غلظت ۴۰ pMol /μL اثری بر روی بیان ژن *Bax* و *Bcl-2* نداشته است. میانگین و انحراف معیار نتایج به دست آمده از دو ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه شد. هم چنین مقادیر p value به دست آمده آزمایش (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۱ ; ** < p < ۰/۰۵ ; * < p) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. مقادیر p value به دست آمده برای ژن *Bax* و *Bcl-2* در تیمار با غلظت ۴۰ پیکومولار الیگونوکلوئید به ترتیب ۰/۰۱۲۶ و ۰/۰۳۲۴ است.

فعالیت تلومراز بالاتر، بیشتر از درمان ضد تلومراز بهره‌مند خواهند شد؛ لذا چشم‌انداز اضافه کردن درمان‌های مبتنی بر مهار تلومراز می‌تواند در بیماران APL امیدوار کننده باشد (۱۷). الیگونوکلوئیدهای مختلفی طراحی شده‌اند که به عنوان یک آنتاگونیست تلومراز عمل کرده و تمایل زیادی به منطقه الگوی RNA تلومراز (hTR) دارند. در واقع این مهارکننده‌ها با ممانعت از مونتاژ آنزیم تلومراز، مانع از فعالیت این آنزیم می‌شوند (۱۸). با توجه به مطالعات گذشته و به منظور بررسی استراتژی کارایی درمان آنتی تلومراز در لوسمی پرومیلوسیتیک حاد، در این مطالعه سلول‌های لوسمیک NB4 تحت غلظت‌های متفاوتی از الیگونوکلوئید طراحی شده قرار داده شد. پس از انجام آزمایش‌ها مشخص گردید که دوز بهینه الیگونوکلوئید قادر است در کوتاه مدت منجر به افزایش مرگ سلول‌های NB4 و کاهش درصد زنده‌مانی این سلول‌ها شود. مطالعه‌هایی که بر روی سلول‌های سرطانی مری و مالتیپل میلوما انجام گرفت نیز حاکی از این واقعیت است که تیمار کوتاه مدت سلول‌های سرطانی و توموری با



نمودار ۳: تغییرات نسبت ژن‌های *Bax/Bcl-2* در تیمار سلول‌های NB4 با الیگونوکلوئید تیمار سلول‌ها با الیگونوکلوئید مهارکننده تلومراز باعث افزایش نسبت ژن‌های *Bax/Bcl-2* در غلظت اپتیموم ۴۰ pMol /μL می‌شود. میانگین و انحراف معیار نتایج حاصل از دو ران کاری مختلف (mean ± SD) محاسبه و p value به دست آمده (۰/۰۰۱ < p < ۰/۰۱ , ** < p < ۰/۰۵ ; * < p) نشان‌دهنده معنادار بودن نتایج از نظر آماری در مقایسه با نمونه کنترل بود.

بحث

مشخص شده است که سلول‌هایی با تلومر کوتاه‌تر و

الیگونوکلوئوتید GRN163، موجب افزایش نقاط آسیب دیده و شکست های DNA (DSB) و لذا افزایش پاسخ های آسیب DNA (DDR) و در نتیجه افزایش مرگ سلولی و مهار رشد سلول های توموری این سلول ها می شود (۱۷، ۱۹). مشخص شده است که در برخی موارد، مهار تلومراز مستقل از کوتاه شدن تلومر و احتمالاً از طریق پاسخ آسیب DNA (DNA damage response) سبب القای مرگ سلولی می گردد (۲۰). تحقیقات نشان می دهند برهم خوردن آرایش ساختمانی تلومرها و باز شدن T Loop تلومر تحت تاثیر الیگونوکلوئوتیدها و در دسترس قرار گرفتن پروتئین های TRF2 و POT1 از کمپلکس شلترین (Shelterin) تلومر می تواند باعث فعال شدن مکانیسم های ترمیم آسیب DNA شود (۲۱، ۲۲). هم چنین فعال شدن این پاسخ ها باعث به خدمت گرفتن پروتئین p53 و فعال سازی پاسخ ATM می شود که به نوبه خود منجر به تشکیل کانون هایی ناشی از اختلال عملکرد تلومر و شکست هایی بر روی DNA می گردد که این مناطق موجب فعال شدن مکانیسم های ترمیم آسیب DNA و سبب القای پدیده پیری و آپوتوز در سلول ها می شود (۲۳، ۲۴). هم چنین جهت مطالعه مکانیسم مولکولی دخیل در القای مرگ سلولی در سلول های NB4، در این مطالعه به بررسی تغییرات بیان ژن *Bax* و *Bcl-2* پرداخته شد. ژن *Bax* یکی از اعضای پروآپتوتیک خانواده *Bcl-2* است که باعث پیشبرد آپوتوز با نقش آنتاگونیستی برای *Bcl-2* می شود (۲۵، ۲۶). نتایج حاصل از

این تحقیق نشان داد که الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز باعث افزایش بیان ژن *Bax* و کاهش بیان ژن *Bcl-2* در سطح mRNA می شود. بنابراین می توان متصور شد که الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز احتمالاً از طریق تنظیم فعالیت رونویسی *Bcl-2* و *Bax*، که نقش مرکزی را در تنظیم مرگ سلولی برنامه ریزی شده دارند، سبب القای آپوتوز در سلول های لوسمیک پرومیلوسیتی می گردند. هم چنین در این بررسی افزایش نسبت *Bax/Bcl-2*، بیان کننده سیر پروآپتوتیک در سلول های NB4 در اثر تیمار با این دارو می باشد. در نتیجه در مطالعه انجام شده مشخص شد که الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز در کوتاه مدت دارای اثرات سایتوتوکسیک و آپتوتیک بر روی سلول های پرومیلوسیتیک حاد NB4 می باشد که احتمالاً این اثرات می تواند به واسطه افزایش ژن های پروآپتوتیکی هم چون *Bax* و کاهش ژن های آنتی آپتوتیک کلیدی مانند *Bcl-2* در این سلول ها باشد.

نتیجه گیری

با توجه به طول تلومر بیماران APL و فعالیت بالای آنزیم تلومراز و همچنین اثر بخشی الیگونوکلوئوتید طراحی شده بر روی سلول های پرومیلوسیتیک NB4، به نظر می رسد استفاده از الیگونوکلوئوتید مهارکننده تلومراز می تواند راه کاری جدید در درمان این بیماران باشد.

References :

- 1- Grimwade D, Mistry AR, Solomon E, Guidez F. Acute promyelocytic leukemia: a paradigm for differentiation therapy. *Cancer Treat Res* 2010; 145: 219-35.
- 2- Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *New Engl J Med* 2013; 369(2): 111-21.
- 3- Sirulnik A, Melnick A, Zelent A, Licht JD. Molecular pathogenesis of acute promyelocytic leukaemia and APL variants. *Best Pract Res Clin Haematol* 2003; 16(3): 387-408.
- 4- Lou Y, Suo S, Tong H, Ye X, Wang Y, Chen Z, et al. Characteristics and prognosis analysis of additional chromosome abnormalities in newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with arsenic trioxide as the front-line therapy. *Leuk Res* 2013; 37(11): 1451-6.
- 5- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006; 12(10): 1133-8.
- 6- Blackburn EH, Collins K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011; 3(5): a003558.
- 7- Blackburn EH, Greider CW, Szostak JW. Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nat Med* 2006; 12(10): 1133-8.
- 8- Ruden M, Puri N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. *Cancer Treat Rev* 2013; 39(5): 444-56.
- 9- Olaussen KA, Dubrana K, Domont J, Spano JP, Sabatier L, Soria JC. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. *Crit Rev Oncol Hematol* 2006; 57(3): 191-214.

- 10- Buseman CM, Wright WE, Shay JW. Is telomerase a viable target in cancer? *Mutat Res* 2012; 730(1-2): 90-7.
- 11- Yang L, Wang W, Hu L, Yang X, Zhong J, Li Z, *et al.* Telomere-binding protein TPP1 modulates telomere homeostasis and confers radioresistance to human colorectal cancer cells. *PLoS One* 2013; 8(11): e81034.
- 12- De Botton S, Sanz M, Chevret S, Dombret H, Martin G, Thomas X, *et al.* Extramedullary relapse in acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Leukemia* 2006; 20(1): 35-41.
- 13- Ghaffari SH, Shayan-Asl N, Jamialahmadi AH, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. *Ann Oncol* 2008; 19(11): 1927-34.
- 14- Lo-Coco F, Ammatuna E. The biology of acute promyelocytic leukemia and its impact on diagnosis and treatment. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2006; 156-61, 514.
- 15- Ghaffari H, Jamialahmadi AH, Shayan-Asl N, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in AML-M3 patients. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research* 2009; 3(2): 5-9.
- 16- Bashash D, Ghaffari SH, Zaker F, Kazerani M, Hezave K, Hassani S, *et al.* BIBR 1532 increases arsenic trioxide-mediated apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells: therapeutic potential for APL. *Anticancer Agents Med Chem* 2013; 13(7): 1115-25.
- 17- Ghaffari S, Shayan-Asl N, Jamialahmadi A, Alimoghaddam K, Ghavamzadeh A. Telomerase activity and telomere length in patients with acute promyelocytic leukemia: indicative of proliferative activity, disease progression, and overall survival. *Ann Oncol* 2008; 19(11): 1927-34.
- 18- Akiyama M, Hideshima T, Shammas MA, Hayashi T, Hamasaki M, Tai YT, *et al.* Effects of oligonucleotide N3' --> P5' thio-phosphoramidate (GRN163) targeting telomerase RNA in human multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2003; 63(19): 6187-94.
- 19- Kedde M, le Sage C, Duursma A, Zlotorynski E, van Leeuwen B, Nijkamp W, *et al.* Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA. *J Biol Chem* 2006; 281(52): 40503-14.
- 20- Wu X, Smavadati S, Nordfjäll K, Karlsson K, Qvarnström F, Simonsson M, *et al.* Telomerase antagonist imetelstat inhibits esophageal cancer cell growth and increases radiation-induced DNA breaks. *Biochim Biophys Acta* 2012; 1823(12): 2130-5.
- 21- Ortiz R, Melguizo C, Prados J, Alvarez PJ, Caba O, Rodriguez-Serrano F, *et al.* New gene therapy strategies for cancer treatment: a review of recent patents. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2012; 7(3): 297-312.
- 22- Gryaznov SM, Jackson S, Dikmen G, Harley C, Herbert B-S, Wright WE, *et al.* Oligonucleotide conjugate GRN163L targeting human telomerase as potential anticancer and antimetastatic agent. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2007; 26(10-12): 1577-9.
- 23- Huda N, Tanaka H, Mendonca MS, Gilley D. DNA damage-induced phosphorylation of TRF2 is required for the fast pathway of DNA double-strand break repair. *Mol Cell Biol* 2009; 29(13): 3597-604.
- 24- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, von Zglinicki T, *et al.* A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 2003; 426(6963): 194-8.
- 25- Beltrami E, Plescia J, Wilkinson JC, Duckett CS, Altieri DC. Acute ablation of survivin uncovers p53-dependent mitotic checkpoint functions and control of mitochondrial apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279(3): 2077-84.
- 26- He YC, Zhou FL, Shen Y, Liao DF, Cao D. Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *Int J Mol Sci* 2014; 15(5): 8335-51.

Original Article

Induction of cell death and apoptosis in NB4 promyelocytic leukemic cells using Oligonucleotide as a telomerase antagonist

Asghari Kia L.¹, Bashash D.¹, Ghaffari S.H.², Hamidpour M.³, Ghavamzadeh A.²

¹Department of Hematology, Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center of Shariati Hospital, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Faculty of Allied Medicine, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Abstract

Background and Objectives

Acute promyelocytic leukemia (APL) is characterized by a specific t(15;17), distinct morphologic picture, and a clinical coagulopathy that contributes to the morbidity and mortality of the disease. Telomerase is consistently activated in nearly all APL patients and telomerase-mediated telomere stabilization is responsible for unlimited replicative potential of the disease. This study aimed to investigate the effects of designed oligonucleotide as a telomerase inhibitor on NB4 cells.

Materials and Methods

NB4 leukemic cells were treated with various concentrations of oligonucleotide by transfection method using lipofectamin 2000. The inhibitory effect of oligonucleotide on cell metabolic activity and cell viability was assessed by MTT assay. Quantitative real-time PCR were applied to investigate alteration of Bax and Bcl-2 mRNA levels.

Results

Oligonucleotide decreased cell viability index and exerted cytotoxic effect against NB4 leukemic cells; we found that exposing cells with Oligonucleotide at 40 pMol for 48 h induced cell death and apoptotic effects on NB4 cells. Furthermore, transcriptional suppression of Bcl-2 and upregulation of Bax were found upon NB4 treatment by oligonucleotide.

Conclusions

Based on the short telomere length and high telomerase activity in APL as well as inhibitory effect of oligonucleotide against NB4 cells, anti-telomerase-based therapy might be regarded as a successful strategy in APL therapy.

Key words: Acute Promyelocytic Leukemia, Apoptosis, Cell Death

Received: 18 Mar 2015

Accepted: 28 Oct 2015

Correspondence: Ghaffari SH., PhD of Molecular Genetics. Associate Professor of Hematology, Oncology and Stem Cell Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Shariati Hospital, Kargar Street. Postal code: 14111, Tehran, Iran. Tel: (+9821) 84902665; Fax: (+9821) 88004140 E-mail: shghaffari@tums.ac.ir