

بررسی اثر افزایش cAMP بر فسفوریلاسیون پروتئین BAD در رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز-B (NALM-6) تیمار شده با دوکسوروبیسین میثم کشیری^۱، دکتر مجید صفا^۲، دکتر احمد کاظمی^۳

نویسنده‌ی مسول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، دانشکده‌ی پیراپزشکی، گروه هماتولوژی و بانک خون majidsafa@gmail.com

دریافت: ۹۲/۱۱/۱۹ پذیرش: ۹۳/۵/۳۱

چکیده

زمینه و هدف: پروتئین BAD (*Bcl-2-associated death promoter*) عامل پروآپتوتیک بوده که در حالت فسفریله، عملکرد آپتوتوزی آن خاموش و در حالت غیرفسفریله از طریق اتصال و مهار پروتئین *BCL-XL* باعث پیشروی آپتوتوز در سلول‌ها می‌شود. ترکیبات افزایش‌دهنده‌ی cAMP، آپتوتوز القا شده توسط دوکسوروبیسین که نوعی داروی ضدتوموری است را کاهش می‌دهند. هدف از این مطالعه بررسی اثرات عوامل افزایش‌دهنده cAMP داخل سلولی فورسکولین و *IBMX* بر فسفوریلاسیون پروتئین BAD در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد بود.

روش بررسی: سلول‌های رده‌ی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز B با عوامل افزایش‌دهنده‌ی cAMP به همراه داروی دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانو مولار به مدت ۲۴ ساعت مجاور شدند. برای بررسی مرگ سلولی از رنگ آمیزی تریپان بلو و برای ارزیابی میزان آپتوتوز از رنگ آمیزی *Annexin V-FITC* با فلوسایتومتری استفاده شد. از تکنیک وسترن بلات برای بررسی بیان پروتئین BAD و تغییرات فسفوریلاسیون استفاده گردید. بررسی داده‌ها با آزمون *Paired T-Test* انجام شد.

یافته‌ها: بررسی فلوسایتومتری کاهش معنادار آپتوتوز را در نمونه‌های تیمار شده با عوامل افزایش‌دهنده‌ی cAMP و دوکسوروبیسین در مقایسه با سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین به تنهایی نشان داد. نتایج وسترن بلات نشان داد که عوامل افزایش‌دهنده‌ی cAMP سبب فسفوریلاسیون پروتئین BAD گردد، همچنین داروی دوکسوروبیسین به تنهایی قادر به تغییراتی در فسفوریلاسیون پروتئین BAD نیست. نتیجه‌گیری: یافته‌های این مطالعه نشان داد که عوامل افزایش‌دهنده‌ی cAMP آپتوتوز القا شده با دوکسوروبیسین را از طریق فسفوریلاسیون پروتئین BAD در رده سلولی NALM-6 کاهش می‌دهد.

واژگان کلیدی: cAMP، لوسمی لنفوبلاستیک حاد، دوکسوروبیسین، فورسکولین، *IBMX*.

مقدمه

بهبودی در این بیماری بسیار مهم و حیاتی است، چون شیمی درمانی باعث بقای بدون عارضه (Event Free Survival) ۵ ساله در ۸۰ درصد موارد درمان شده در کودکان و همچنین

ALL (Acute lymphoblastic leukemia) یا

لوسمی لنفوبلاستیک حاد، به‌عنوان شایع‌ترین فرم لوسمی در کودکان و بالغین جوان می‌باشد، نقش شیمی درمانی در القای

۱- کارشناس ارشد هماتولوژی بانک خون، دانشکده‌ی پیراپزشکی، گروه هماتولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

۲- دکترای تخصصی هماتولوژی، استادیار دانشگاه علوم پزشکی ایران، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه هماتولوژی بانک خون

۳- دکترای تخصصی هماتولوژی، استاد دانشگاه علوم پزشکی ایران، گروه هماتولوژی بانک خون

غیرفعال بوده، و در این حالت در سیتوپلاسم سلول و متصل به پروتئین ۳-۳-۱۴ می باشد (۸-۶). این پروتئین در حالت غیرفسفریله فعال می باشد که در این حالت از سیتوپلاسم به میتوکندری سلول منتقل شده و با اتصال به BCL-2 و BCL-XL و تشکیل هتروداپمیریزه با آن ها، فعالیت ضد آپوپتوتیک آن ها را مهار می کند (۸). عواملی که بر روی فسفوریلاسیون یا دفسفوریلاسیون این پروتئین نقش دارند در نهایت در آپوپتوز سلول دخالت دارند، این عوامل شامل سایتوکاین هایی نظیر IL-3، کینازهایی چون پروتئین کیناز A و پروتئین کیناز B می باشد (۱۰-۸). cAMP نوعی پیامبر ثانویه داخل سلولی بوده و در پاسخ به عوامل محرکی گوناگون خارج سلولی همانند هورمون ها یا انتقال دهنده های عصبی تولید می شود (۱۱). cAMP توسط آنزیم آدنیلیل سیکلاز از ATP سنتز شده و توسط فسفودی استرازها به AMP تجزیه می شود (۱۲). cAMP بر فرآیندهای گوناگون سلولی همانند تمایز سلولی، پیشروی چرخه سلولی و آپوپتوز نقش دارد و این اعمال را هم به روش وابسته به پروتئین کیناز A و هم مستقل از پروتئین کیناز A انجام می دهد. در بسیاری از رده های سلولی سرطانی، تغییری در سطح cAMP و ایزوفرم های پروتئین کیناز A مشاهده شده است که باعث شده پژوهشگران به مطالعه در مسیر پیام رسانی cAMP بپردازند و به این مسیر به عنوان یکی از راهبردهای درمانی در سرطان توجه کنند (۱۴-۱۱). مثلاً در مطالعه ای نشان داده شده است که افزایش cAMP سلولی قادر است آپوپتوز القا شده توسط داروی شیمی درمانی اتوپوزید را در سلول های لوسمی پرومونسیتیک حاد کاهش دهد (۱۴). هدف از این مطالعه بررسی اثرات افزایش cAMP سلولی بر فسفوریلاسیون پس از ترجمه پروتئین BAD در سلول های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز B- تیمار شده با دوکسوروبیسین می باشد تا مشخص گردد که آیا این پروتئین هم به عنوان هدف مسیر cAMP می باشد که

میزان بقای ۴۰ درصدی در بزرگسالان می شود (۱). داروهای سیتوتوکسیک که برای شیمی درمانی استفاده می شوند نقش مهمی را در درمان این بیماران ایفا می کنند. روش های مختلفی باعث القای آپوپتوز در رده های مختلف سلولی می شوند که یکی از این مسیرها ایجاد شکست در رشته ی DNA و به راه انداختن آبشار سیگنالینگ آسیب DNA می باشد (۲). یکی از داروهای این گروه که در طیف وسیعی از سرطان ها و به خصوص در بدخیمی های هماتولوژیک استفاده می شود، داروهای خانواده آنتراسیکلین ها می باشد که در این میان دوکسوروبیسین استفاده ی وسیعی دارد. فعالیت ضد توموری آن توسط چندین مکانیسم اعمال می شود از جمله تولید رادیکال های آزاد، پراکسیداسیون لیپید، ایجاد شکست و مهار سنتز DNA می باشد، که مهم ترین آن ها مهار سنتز DNA از طریق اتصال به DNA دو رشته ای و ممانعت از عملکرد آنزیم توپوایزومراز II می باشد و موجب القای آپوپتوز در سلول های سرطانی می گردد (۳ و ۲). مرگ برنامه ریزی شده یا آپوپتوز فرآیند پیچیده ای است که تعداد زیادی پروتئین در روند آن دخالت دارد (۵ و ۴). به طور کلی برای القای آپوپتوز دو مسیر وجود دارد، مسیر خارجی و مسیر داخلی، که در مسیر داخلی محرک های داخل سلولی مثل آسیب DNA و تنش اکسیداتیو از طریق پروتئین های BCL-2 که در غشای خارجی میتوکندری قرار دارند، آپوپتوز را القا می کنند (۵). خانواده ی BCL-2 متشکل از پروتئین هایی است که در تنظیم مسیر داخلی آپوپتوز نقش ایفا می کنند. پروتئین BAD (Bcl-2- Associated Death Promoter) عضو گروهی از پروتئین ها به نام BH3-only که زیر مجموعه ای از خانواده پروتئین های BCL-2 می باشند (۶). BAD به عنوان یک پروتئین پیش آپوپتوزی در سطح پس از ترجمه از طریق فسفوریلاسیون تنظیم می گردد (۷ و ۶). جایگاه فسفوریلاسیون این پروتئین شامل سرین ۷۵، سرین ۹۹ و سرین ۱۱۸ می باشد. پروتئین BAD در حالت فسفوریله

بتوان با شناسایی و هدف قرار دادن این مسیرهای پیام دهی باعث بهتر و موثرتر شدن پروسه درمان بیماران گردید.

روش بررسی

رده‌ی سلولی NALM-6 (لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B) از انستیتو پاستور ایران تهیه شد و سلول‌های مورد از نظر مارکرهای سطح سلولی CD19 و CD10 بررسی شدند. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco، فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Greiner خریداری شدند. فورسکولین (به‌عنوان فعال کننده آنزیم آدنیلیل سیکلاز) و IBMX (به عنوان مهارکننده فسفودی استراز که موجب مهار تجزیه cAMP به AMP می‌شود) به‌عنوان افزایش دهنده‌های cAMP استفاده شدند (خریداری شده از شرکت Sigma). سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) FBS، و ۱ درصد پنی‌سیلین - استرپتومایسین (۱۰۰U/ml و ۱۰۰µg/ml) استرپتومایسین) و در انکوباتور (Memert, Germany) با رطوبت ۹۰ درصد، CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. کشت‌ها به‌صورت روزانه به‌وسیله‌ی میکروسکوپ معکوس از نظر مورفولوژی سلول‌ها، آلودگی و تراکم رشد بررسی و در صورت نیاز کشت مجدد شدند. محیط کشت سلول‌ها هر ۴۸ ساعت تعویض شد. پس از سه مرحله پاساژ، سلول‌ها شمارش شده و در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای مقدار ۵۰۰۰۰۰ سلول با حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر ریخته شد. در چاهک‌های جداگانه با توجه به الگوی طراحی شده، غلظت ۵۰ میکرومولار فورسکولین و ۱۰۰ میکرومولار IBMX با سلول‌ها پیش تیمار شد، پس از گذشت ۳۰ دقیقه به سلول‌های ۴ چاهک که پیش از این با ترکیب فورسکولین و IBMX تیمار شده بودند، داروی دوکسوروبیسین با غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ نانو مولار

اضافه شد. لازم به ذکر است برای بررسی اثر دوکسوروبیسین به تنهایی نیز دو چاهک (یکی ۲۵۰ نانومولار و دیگری ۵۰۰ نانومولار) در نظر گرفته شد. در نهایت پس از ۲۴ ساعت سلول‌ها برای بررسی میزان زنده مانی به‌وسیله‌ی رنگ‌آمیزی تریپان بلو بررسی شدند. برای تعیین درصد سلول‌های زنده، سلول‌ها را سانتریفیوژ کرده مایع رویی را دور ریخته و با ۱ سی‌سی محیط، سلول‌ها را معلق کردیم (تا میزان یکسانی از سلول‌ها را برداریم). به میزان ۱۰ تا ۱۵ میکرولیتر از سلول برداشته، به‌همان میزان تریپان بلو اضافه کردیم و به‌مدت یک تا دو دقیقه در دمای اتاق نگه داشتیم. سپس یک قطره از این محلول را برای شمارش سلول برداشته، بر روی لام نئوبار قرار داده و در زیر میکروسکوپ محفظه‌ی ۱۶ خانه‌ای یا ۲۵ خانه‌ای لام نئوبار را شمارش کردیم. سلول‌های زنده که نسبت به رنگ تریپان بلو غشای ناتراوا دارند، بی‌رنگ و سلول‌های مرده که هیچ انتخابی برای ورود رنگ ندارند و رنگ وارد سیتوپلاسم آن‌ها می‌شود و به رنگ آبی مایل به بنفش دیده می‌شوند.

رنگ‌آمیزی تریپان بلو درصد مرگ سلولی که شامل سلول‌های نکروتیک و آپوپتوتیک می‌شود را محاسبه می‌کند و از این رو اختصاصی نیست و برای بررسی دقیق آپوپتوز از رنگ‌آمیزی آنکسین استفاده گردید. بروز فسفاتیدیل سرین در بخش خارجی غشای سلول با استفاده از رنگ‌آمیزی AnnexinV-FITC اندازه‌گیری گردید. بدین منظور سلول‌ها به تعداد 5×10^5 در هر چاهک افزوده شده و با ترکیب فورسکولین (با غلظت ۵۰ میکرومولار) و IBMX (با غلظت ۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۳۰ دقیقه مجاور شدند. سپس دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانو مولار به سلول‌های تیمار شده با ترکیب فورسکولین و IBMX (F + I) و به گروهی از سلول‌ها به‌تنهایی افزوده شد و به‌مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید (مشابه روش تریپان بلو تیمار صورت گرفت). پس از برداشت سلول‌ها، به هر پلیت سلولی ۲ میکرولیتر

این پروتئین، سلول‌های کنترل و تیمار شده پس از گذشت ۴ ساعت سانتیفریوژ و با بافر فسفات-سالین شستشو داده شدند. سپس بر روی پلت هر گروه سلولی (حاوی 5×10^6 سلول) محلول لیز کننده سلول (حاوی NP-۴۰۱ %، SDS % ۵/۰، ۱۰ میلی‌مولار $\text{pH} = 7/4$ Tris-HCl، ۱۵۰ میلی‌مولار NaCl، ۵ میلی‌مولار EDTA % ۵/۰ سدیم داکسی کولات، ۱۰۰ میکرومولار PMSF و مهارکننده پروتئاز) افزوده و نمونه‌ها بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. هر ۵ دقیقه یک بار نمونه‌ها ورتکس شدند تا خوب هموژنیزه شوند. سپس نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه سانتیفریوژ ($13000 \times$ دور در دقیقه و دمای ۴ درجه‌ی سانتی‌گراد) شدند تا پسماندهای حاصل از لیز جدا شوند. محلول رویی حاصل از سانتیفریوژ که حاوی پروتئین در دو پروتکل بود، برداشته شد و غلظت پروتئین‌ها توسط روش Bradford اندازه‌گیری شد. نمونه‌های پروتئین به حجم‌های کوچکتر مساوی تقسیم گردیده و تا زمان انجام آزمایش در دمای -80 درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری شدند. به‌منظور انجام ایمونوبلاتینگ برای سنجش مقدار پروتئین، ابتدا نمونه‌های پروتئینی با بافر $6X$ حاوی ۶۲ میلی‌مولار $\text{pH} = 6/8$ Tris-HCl، ۲ درصد SDS، ۲۵ درصد گلیسرول، ۵ درصد مرکاپتواتانول و $0/2$ درصد بروموفنول بلو مخلوط و به مدت ۵ دقیقه در ۹۵ درجه‌ی سانتی‌گراد جوشانده شدند. میزان غلظت یکسانی از پروتئین‌های استخراج شده (۱۵۰ میکروگرم) از سلول‌های کنترل و تیمار شده، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ بر روی ورقه نیتروسلولز منتقل شدند. در این بررسی SDS-PAGE و بلاتینگ به ترتیب توسط دستگاه‌های Mini-Protein 4 Cell (الکتروفورز عمودی پروتئین) و Mini-Trans Blot شرکت Bio-Rad انجام گردید. محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به طریق رنگ‌آمیزی Ponceau S بررسی و محل باند مورد نظر با

AnnexinV-FITC Reagent و ۱۰۰ میکرولیتر بافر انکوباسیون اضافه شد و سلول‌ها به مدت ۱۰ دقیقه در تاریکی در دمای اتاق انکوبه شدند. بررسی سلول‌ها با استفاده از دستگاه فلوسیتومتر با طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و طول موج بازتابش ۵۱۸ نانومتر (FL-1) برای تعیین فلوروسین FITC (Fluorescein) انجام گرفت. آنالیز داده‌ها با نرم‌افزار SPSS-16 انجام شد. تفاوت بین گروه‌ها با استفاده از آزمون آماری paired T Test مورد مطالعه قرار گرفت و p value کمتر از $0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد.

برای بررسی تغییرات بیان پروتئین BAD و همچنین جایگاه‌های فسفوریلاسیون آن شامل سرین ۷۵، سرین ۹۹ و سرین ۱۱۸ توسط تکنیک وسترن بلات، سلول‌ها با تعداد 5×10^6 و با حجم نهایی ۵ میلی‌لیتر در فلاسک‌های فیلتردار ۲۵ سانتی‌متر مربع افزوده شد. از ۴ فلاسک به عنوان ۴ نمونه مورد نظر (کنترل، فورسکولین و IBMX، دوکسوروبیسین ۲۵۰ نانومولار و دوکسوروبیسین ۲۵۰ به‌علاوه فورسکولین و IBMX) استفاده گردید. به منظور بررسی تغییرات فسفوریلاسیون و بیان پروتئین BAD ۴ فلاسک به ترتیب برای کنترل، F+I، Doxorubicin، F+I و به همراه Doxorubicin در نظر گرفته شد. با توجه به الگو، ابتدا سلول‌های دو فلاسک با ترکیب فورسکولین (غلظت ۵۰ میکرومولار) و IBMX (غلظت ۱۰۰ میکرومولار) یا به اختصار F+I تیمار شدند. پس از ۳۰ دقیقه، دوکسوروبیسین ۲۵۰ نانو مولار با سلول‌هایی که پیش از این با ترکیب فورسکولین و IBMX (F+I) تیمار شده بودند، و با گروهی از سلول‌ها به‌تنهایی به مدت ۴ ساعت مجاور شد. الگوی مورد نظر شامل کنترل، F+I، Doxorubicin، F+I به همراه Doxorubicin بود.

سپس استخراج پروتئین تام سلولی انجام پذیرفت، بدین صورت که برای بررسی تغییرات در فسفوریلاسیون جایگاه‌های سرین ۷۵، ۹۹ و ۱۱۸ پروتئین BAD و مقدار تام

جدول ۱: درصد مرگ سلولی سلول‌های NALM-6 را به روش رنگ‌آمیزی تریپان بلو

P-value*	مرگ سلولی (%)	نمونه
۰/۰۹	۳	کنترل
	۴	فورسکولین و IBMX
۰/۰۳۴	۳۲	دوکسوروبیسین (۲۵۰ نانومولار)
	۱۸	دوکسوروبیسین (۲۵۰ نانومولار) + فورسکولین و IBMX
۰/۰۳	۴۵	دوکسوروبیسین (۵۰۰ نانومولار)
	۲۹	دوکسوروبیسین (۵۰۰ نانومولار) + فورسکولین و IBMX

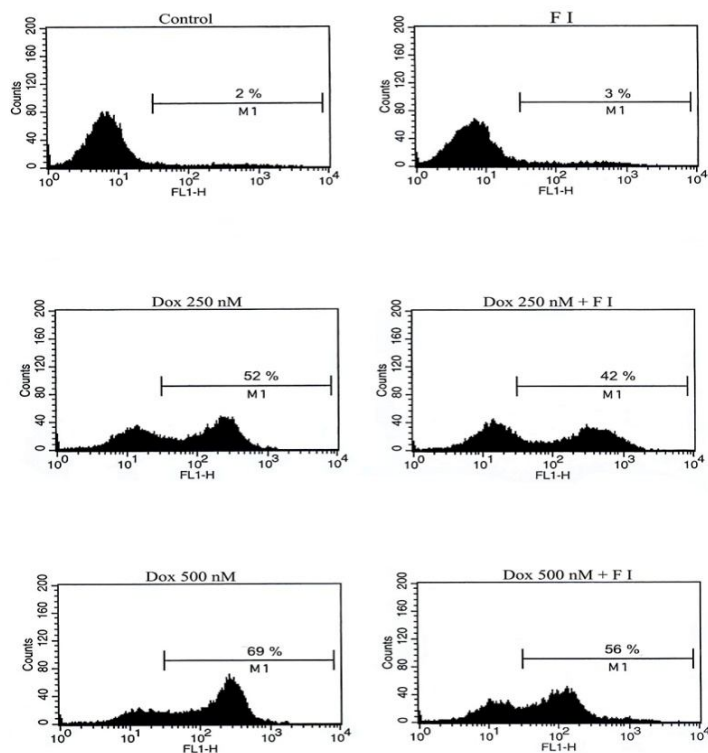
*آزمون Paired T- Test

پس از پیش تیمار سلول‌ها با غلظت ۵۰ میکرومولار فورسکولین و ۱۰۰ میکرومولار IBMX برای ۳۰ دقیقه و مجاورت با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار به مدت ۲۴ ساعت، سلول‌ها برداشت و در کانال FL1 دستگاه فلوسیتومتر آنالیز انجام شد. این آزمایش ۲ بار تکرار گردید و نتایج آن مشابه یکدیگر بودند. با توجه به نمودار ۱، نتایج بررسی هیستوگرام‌ها با فلوسایتومتری نشان داد که ترکیب فورسکولین و IBMX در همراهی با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار در مقایسه با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار باعث کاهش معناداری (به ترتیب $P=0/038$ و $P=0/031$) در جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک (سلول‌های رنگ شده با انکسین) شد (شکل ۱).

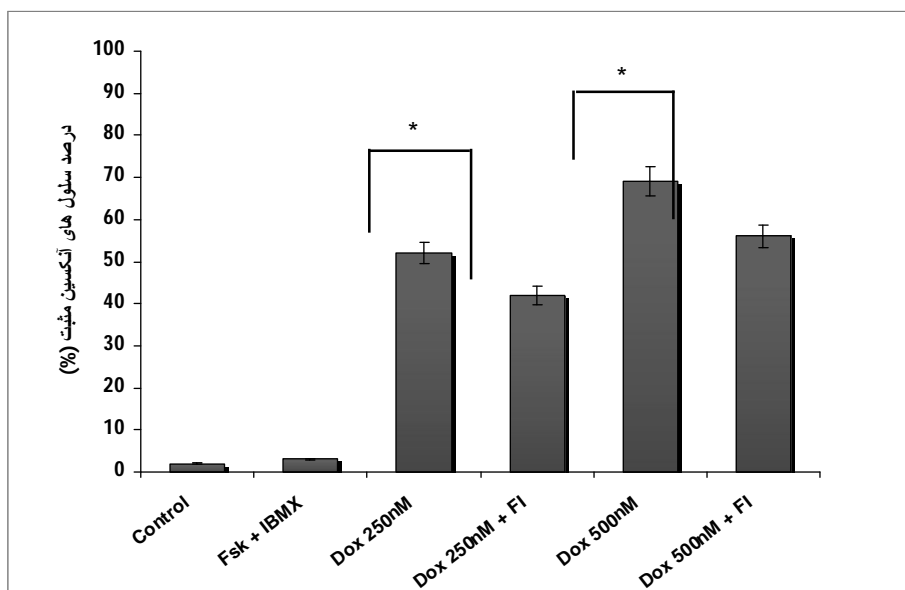
استفاده از مارکر وزن مولکولی کنترل شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین BAD و جایگاه‌های فسفوریلاسیون این پروتئین شامل سرین ۷۵، ۹۹، ۱۱۸ از آنتی‌بادی‌های اولیه (Cell signaling, USA) بر علیه این پروتئین‌ها استفاده شد. این آنتی‌بادی‌ها توسط آنتی‌بادی متصل به پراکسیداز (HRP) شناسایی و به طریق کمی لومینسانس (ECL™ Advanced Western Blotting Detection Kit, Amersham) باند پروتئینی مورد نظر بر روی فیلم ظاهر گردید. از آنتی‌بادی اولیه بر علیه بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

یافته‌ها

اثر مهارتی افزایش دهنده‌های cAMP سلولی در همراهی با دوکسوروبیسین بر مرگ سلولی سلول‌های NALM-6 برای ارزیابی تاثیر ترکیب فورسکولین و IBMX (به اختصار F+I) در همراهی با دوکسوروبیسین برای ارزیابی مرگ سلولی، سلول‌های NALM-6 ابتدا با غلظت مشخصی از فورسکولین (۵۰ میکرومولار) و IBMX (۱۰۰ میکرومولار) به مدت ۳۰ دقیقه پیش تیمار و سپس با غلظت ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار دوکسوروبیسین مجاور شدند و پس از ۲۴ ساعت با استفاده از رنگ آمیزی تریپان بلو و میکروسکوپ معکوس بررسی شدند، رنگ‌آمیزی سلول‌ها با تریپان بلو انجام گردید سه بار انجام گردید. با توجه به جدول ۱، نتایج بررسی میکروسکوپی با روش تریپان بلو نشان می‌دهد که در هر دو غلظت از دوکسوروبیسین، درصد مرگ سلولی در سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین به همراه ترکیب F+I به طور معناداری کمتر از نمونه‌ای است که تنها با دوکسوروبیسین مجاور شده است. برای بررسی دقیق آپپتوز از رنگ‌آمیزی AnnexinV - FITC جهت تشخیص بروز فسفاتیدیل سرین در سطح خارجی سلول‌های آپپتوتیک استفاده شد.



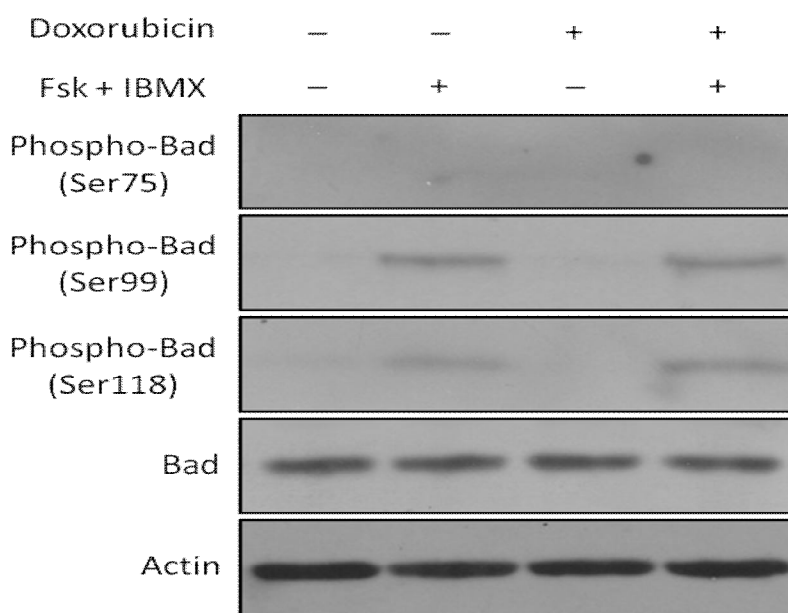
شکل ۱: هیستوگرام میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با ترکیب فورسکولین و IBMX در همراهی با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار. درصد سلول‌های آپوپتوتیک (رنگ شده با آنکسین) با نماد *M1* نمایش داده شده است.



نمودار ۱: درصد آپوپتوز سلول‌های *NALM-6* را با روش آنکسین *V* نشان می‌دهد. میزان آپوپتوز در سلول‌های تیمار شده با ترکیب فورسکولین و IBMX در همراهی با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار نسبت به سلول‌های تیمار شده با دوکسوروبیسین ۲۵۰ و ۵۰۰ نانومولار سبب کاهش معنی‌داری (به ترتیب $P=0/028$ و $P=0/031$) بر آپوپتوز سلول‌های *NALM-6* داشته است.

(شکل ۱). افزایش فسفوریلاسیون جایگاه‌های سرین ۹۹ و ۱۱۸ در نمونه سلول‌های تیمار شده با ترکیب فورسکولین و IBMX و همچنین در نمونه سلول‌های تیمار شده با ترکیب فورسکولین و IBMX با همراهی دوکسوروبیسین در مقایسه با نمونه‌ی کنترل به خوبی مشهود است. اما دوکسوروبیسین به تنهایی بر فسفوریلاسیون اسید آمینه سرین جایگاه‌های ۹۹، ۷۵ و ۱۱۸ پروتئین BAD تاثیری نداشته است. در مورد فسفوریلاسیون سرین ۷۵، در همه نمونه‌ها مورد بررسی، هیچ بانندی مشاهده نشد (شکل ۲).

افزایش فسفوریلاسیون جایگاه‌های ۹۹ و ۱۱۸ در پروتئین BAD: برای ارزیابی فسفوریلاسیون جایگاه‌های سرین ۷۵، ۹۹، ۱۱۸ و مقدار تام پروتئین BAD از تکنیک وسترن بلات استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از آپتوز سلول‌ها به روش آنکسین V غلظت ۲۵۰ نانومولار دوکسوروبیسین برای انجام ایمونوبلاتینگ انتخاب شد. نتیجه‌ی وسترن بلات حاکی از آن است که مقدار تام پروتئین BAD در زمان ۴ ساعت در همه نمونه‌ها ثابت مانده است، و ترکیب فورسکولین و IBMX چه در همراهی با دوکسوروبیسین و چه بدون آن تاثیری بر بیان پروتئین BAD نداشته است



شکل ۲. افزایش فسفوریلاسیون جایگاه‌های سرین ۹۹ و سرین ۱۱۸ در پروتئین BAD در سلول‌های تیمار شده با $F + I$ در مقایسه با نمونه‌ی کنترل در زمان ۴ ساعت. مقدار تام پروتئین BAD در طی تیمار با افزایش دهنده‌های cAMP و دوکسوروبیسین تغییری نداشته است.

بحث

دیگری که موجب این بیماری می‌شوند کمتر شناخته شده است (۱۶). بدین ترتیب تحقیقات فراوانی درباره‌ی علل، تشخیص، درمان و پیش‌آگهی لوسمی انجام شده است تا منجر به یافتن روش‌های موثرتر درمانی برای این بیماران گردد. در نتیجه شناسایی مکانیسم‌های مولکولی و عوامل دخیل در ایجاد سرطان و همچنین عوامل مداخله کننده در

هر ساله انجمن سرطان آمریکا تخمین می‌زند که ۳۰۸۰۰۰ فرد با بیماری لوسمی در ایالات متحده آمریکا تشخیص داده می‌شود و ۲۱۷۰۰ فرد نیز به دلیل این بیماری جان خود را از دست می‌دهند. از جمله عواملی که باعث ایجاد ALL می‌شوند می‌توان به بنزن و عوامل آلکیلی اشاره کرد. عوامل

(۲۱). افزایش سطح cAMP داخل سلولی سبب مهار آپوپتوز در بسیاری از رده‌های سلولی همانند سلول‌های لوکمیک که در معرض داروهای شیمی درمانی قرار گرفته‌اند، می‌شود. به‌طور مثال در مطالعه گارسیا و همکاران نشان داده شد که عوامل افزایش دهنده cAMP سبب کاهش آپوپتوز القا شده با اتوپوزاید در سلول‌های لوسمیک پروموسیت می‌گردد (۱۵). کاهش آپوپتوز توسط عوامل افزایش دهنده cAMP در ماکروفاژهایی که در معرض نیتریک اکساید قرار گرفته‌اند (۲۲) و همچنین در سلول‌های سرطان سینه (MCF-7) که در معرض سیکلوهاگزמיד قرار گرفته‌اند، نیز نشان داده شده است (۲۳). البته باید خاطر نشان ساخت که براساس ماهیت و نوع سلول، مکانیسم‌های متفاوتی در پاسخ به افزایش cAMP داخل سلولی وجود دارد. به عنوان مثال در مطالعه‌ی آربلت و همکاران نشان داده شد که تحریک مسیر پیام رسانی cAMP و متعاقب آن افزایش cAMP درون سلولی، نه تنها سبب آپوپتوز و مرگ سلول‌های مالتیپل مایلومایی هم با منشا انسانی و هم موشی در محیط کشت می‌گردد، بلکه قادر به کاهش رشد سلول‌های توموری مالتیپل مایلومایی در مدل حیوانی (موش) در شرایط *In vivo* نیز می‌شود (۲۴). چندین مطالعه صورت گرفته بر روی سلول‌های لنفوسیت B رده‌ی سلولی CLL نشان داد عوامل افزایش دهنده cAMP به ترتیب سبب افزایش آپوپتوز القا شده با کلرامبوسیل می‌شود (۲۵-۲۷). با توجه به افزایش آپوپتوز سلول‌های CLL و مالتیپل مایلوما و کاهش آپوپتوز در سلول‌های BCP-ALL در پاسخ به افزایش دهنده‌های cAMP این نکته خاطر نشان می‌شود که سلول‌های سرطانی با منشاء مختلف رفتار متفاوتی در پاسخ به افزایش cAMP سلولی نشان می‌دهند (۲۴). نشان داده شده است که فسفوریلاسیون پروتئین BAD موجب مهار نقش آپوپتوتیک این پروتئین می‌گردد و عواملی که باعث تغییر فسفوریلاسیون این پروتئین می‌گردد؛ می‌تواند در تغییر روند آپوپتوز نقش ایفا کند (۸-۶). همان‌طور که پیش

حین درمان با داروهای شیمی درمانی، از زمینه‌های مورد توجه محققین می‌باشد. از آنجایی که در بسیاری از رده‌های سلولی سرطانی، تغییراتی در سطح cAMP و ایزوفرم‌های پروتئین کیناز A مشاهده شده است، این حالت سبب شده است که پژوهشگران مختلف به مطالعه در مسیر پیام رسانی cAMP پرداخته و به این مسیر به‌عنوان یکی از راهبردهای درمانی در سرطان توجه کنند (۱۷ و ۱۶، ۱۴) به‌طور مثال cAMP بر فسفوریلاسیون و در نتیجه عملکرد بسیاری از پروتئین‌های درگیر در آپوپتوز و بقای سلولی همچون p53 و NF- κ B تاثیر گذار است (۱۸). مطالعه‌ی حاضر به بررسی اثر افزایش cAMP داخل سلولی بر آپوپتوز سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز-B و همچنین نقش پروتئین BAD در کاهش آپوپتوز القاشده توسط دوکسوروبیسین در حضور افزایش دهنده‌های cAMP پرداخته است.

در این مطالعه، بررسی نتایج مرگ سلولی با تریپان بلو در گروهی از سلول‌ها که تنها با دوکسوروبیسین تیمار شده بودند در مقایسه با گروهی که با ترکیب فورسکولین و IBMX به همراه دوکسوروبیسین مجاور شده بودند، نشان داد که عوامل افزایش دهنده‌ی cAMP به‌صورت آنتاگونیستی در همراهی با دوکسوروبیسین باعث کاهش مرگ سلول‌ها می‌شود. نتیجه‌ی بررسی آپوپتوز القا شده توسط فورسکولین و IBMX در همراهی با دوکسوروبیسین با رنگ آمیزی انکسین نیز یافته‌های مربوط به رنگ‌آمیزی تریپان بلو را تایید کرد. در مطالعات پیشین، Safa و همکاران نشان دادند که افزایش cAMP در همراهی با دوکسوروبیسین سبب کاهش پروتئین p53 و در نتیجه کاهش آپوپتوز در سلول‌های REH. NALM-6 می‌شود (۲۰ و ۱۹). در مطالعه‌ی صورت گرفته توسط نادری و همکاران نشان داده شده است که افزایش میزان cAMP درون سلولی به تنهایی تاثیری در مرگ سلولی سلول‌های پیش‌تاز B لوسمی لنفوبلاستیک حاد یا BCP-ALL ندارد که با نتایج این تحقیق سازگار است

و افزایش بقای آن می‌گردد. در مطالعه‌ی حاضر مقدار تام پروتئین BAD در تیمار سلول‌ها با دوکسوروبیسین و افزایش دهنده‌های cAMP در مقایسه با کنترل یکسان بوده است و این موضوع نشان دهنده‌ی عدم تاثیر این دارو و نیز افزایش دهنده‌های cAMP بر مقدار تام پروتئین BAD بوده، این یافته هماهنگ با سایر مطالعات می‌باشد که نشان می‌دهد عملکرد و تنظیم این پروتئین در سطوح پس از ترجمه رخ خواهد داد (۲۹-۳۱).

نتیجه گیری

از آنجایی که هدف اصلی شیمی درمانی القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی است، افزایش cAMP موجب افزایش مقاومت سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز B به القای آپوپتوز ناشی از داروی دوکسوروبیسین و کاهش اثربخشی دارو می‌گردد، در نتیجه عواملی که سبب افزایش cAMP داخل سلولی می‌شود سبب افزایش مقاومت سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز لنفوسیت B به آپوپتوز القاشده با دوکسوروبیسین می‌گردد. همچنین، با توجه به یافته‌های به دست آمده می‌توان بیان کرد که افزایش cAMP داخل سلولی سبب فسفوریلاسیون پروتئین BAD در سلول‌های پیش‌تاز لوسمی لنفوبلاستیک حاد تحت تیمار با دوکسوروبیسین خواهد شد که فسفوریلاسیون این پروتئین می‌تواند یکی از عوامل ایجاد مقاومت به القای آپوپتوز توسط داروهای خانواده آنتراسیکلین‌ها باشد.

از این اشاره شد فسفوریلاسیون سرین ۹۹ پروتئین BAD از طریق مسیر پروتئین کیناز B صورت می‌گیرد. از سوی دیگر، مشخص شده است که فسفوریلاسیون سرین ۷۵ و سرین ۱۱۸ از طریق مسیر پروتئین کیناز A صورت می‌پذیرد (۱۰). در مطالعه‌ای سینتیا و همکارانش نشان دادند که افزایش cAMP به واسطه‌ی فعال شدن مسیر پیام‌رسانی PI3K/Akt مانع آپوپتوز القاشده با نمک‌های صفاوی کونژوگه شده با مواد سمی در سلول‌های کبدی می‌شود و مهار مسیر PI3K/Akt مانع اثر آنتی آپوپتوزی cAMP در این رده‌ی سلولی می‌شود (۲۸). با توجه به افزایش cAMP در گروه‌های سلولی که تحت تیمار با فورسکولین و IBMX بودند و از طرفی چون cAMP قادر به فعال کردن پروتئین کیناز A است، فسفوریلاسیون جایگاه سرین ۹۹ را می‌توان به آن نسبت داد. با توجه به نتایج به دست آمده در مطالعه‌ی حاضر، عوامل افزایش دهنده cAMP سبب افزایش فسفوریلاسیون در جایگاه سرین ۱۱۸ و ۹۹ می‌شود. در نمونه‌ای که سلول‌ها با عوامل افزایش دهنده cAMP به همراه دوکسوروبیسین تحت تیمار قرار گرفته بودند نیز افزایش فسفوریلاسیون در جایگاه‌های سرین ۹۹ و سرین ۱۱۸ مشاهده شد و این موضوع نشان دهنده‌ی این است که عوامل افزایش دهنده‌ی cAMP در زمان تیمار سلول‌ها با داروی دوکسوروبیسین نیز قادر به فسفوریلاسیون جایگاه‌هایی سرین ۹۹ و ۱۱۸ پروتئین BAD می‌باشد که این فسفوریلاسیون سبب ممانعت پروتئین BAD از آپوپتوز سلول NALM-6

References

1- Jeha S, Razzouk B, Rytting M, et al. Phase II study of clofarabine in pediatric patients with refractory or relapsed acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 4392-7.

2- Martin A, Morgan E, Hijiya N. Relapsed or refractory pediatric acute lymphoblastic leukemia: current and emerging treatments. *Paediatric Drugs*. 2012; 14: 377-87.

3- S Stanulla M, Schrappe M. Treatment of

- childhood acutelymphoblastic leukemia. *Semin Hematol.* 2009; 46: 52-63.
- 4- Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing. *Int J Lower Extremity Wounds.* 2005; 4(3): 138-44.
- 5- Arends M, Wyllie A. Apoptosis: mechanism and roles in pathology. *Pathol.* 1991; 32: 223-54.
- 6- Zha J, Harada H, Yang E, Jockel J, Korsmeyer SJ. Serine phosphorylation of death agonist BAD in response to survival factor results in binding to 14-3-3 not BCL-X(L). *Cell.* 1996; 87: 619-28.
- 7- Datta SR, Katsov A, Hu L, Petros A, Fesik SW, Yaffe MB. 14-3-3 proteins and survival kinases cooperate to inactivate BAD by BH3 domain phosphorylation. *Mol Cell.* 2000; 6: 41-51.
- 8- Zha J, Harada H, Osipov K, Jockel J, Waksman G, Korsmeyer SJ. BH3 domain of BAD is required for heterodimerization with BCL-XL and pro-apoptotic activity. *J Biol Chem.* 1997; 272: 24101-4.
- 9- Condorelli F, Salomoni P, Cotteret S, Cesi V, Srinivasula SM, Alnemri ES. Caspase cleavage enhances the apoptosis-inducing effects of BAD. *Mol and Cell Biology.* 2001; 21: 3025-36.
- 10- Danial NN. BAD: undertaker by night, candyman by day. *Oncogene.* 2008; 27: 53-70.
- 11- Tasken K, Aandahl EM: Localized effects of cAMP mediated by distinct routes of protein kinase A. *Physiol Rev.* 2004, 84: 137-67.
- 12- de Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A. Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature.* 1998; 396: 474-7.
- 13- Monahan TM, Marchand NW, Fritz RR, Abell CW. Cyclic adenosine 3':5' monophosphate levels and activities of related enzymes in normal and leukemic lymphocytes. *Cancer Res.* 1975; 35: 2540-7.
- 14- Garcia-Bermejo L, Perez C, Vilaboa NE, de Blas E, Aller P. cAMP increasing agents attenuate the generation of apoptosis by etoposide in promonocytic leukemia cells. *J Cell Sci.* 1998; 111: 637-44.
- 15- Linet MS, Cartwright RA. The leukemias. In: Schottenfeld D Fraumeni JF Jr. *Cancer epidemiology and prevention*, 2nd ed. New York: Oxford University Press. 1996.
- 16- Mantovani G, Bondioni S, Lania A, et al. High expression of PKA regulatory subunit 1A protein is related to proliferation of human melanoma cells. *Oncogene.* 2008, 27: 1834-43.
- 17- Neary CL, Nesterova M, Cho YS, Cheadle C, Becker KG, Cho-Chung YS. Protein kinase A isozyme switching: eliciting differential cAMP signaling and tumor reversion. *Oncogene.* 2004; 23: 8847-56.
- 18- Safa M, Zand H, Mousavizadeh K, Kazemi A, Bakhshayesh M, Hayat P. Elevation of cyclic AMP causes an imbalance between NF-kappaB and p53 in NALM-6 cells treated by doxorubicin. *FEBS lett.* 2010; 584: 3492-8.
- 19- Safa M, Kazemi A, Zand H, Azarkeivan A, Zaker F, Hayat P. Inhibitory role of cAMP on doxorubicin-induced apoptosis in pre-B ALL cells

- through dephosphorylation of p53 serine residues. *Apoptosis*. 2010; 15: 196-203.
- 20- Safa M, Kazemi A, Zaker F, Razmkhah F. Cyclic AMP-induced p53 destabilization is independent of EPAC in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells in vitro. *J Recept Signal Transduct Res*. 2011; 31: 256-63.
- 21- Naderi EH, Findley HW, Ruud E, Blomhoff HK, Naderi S. Activation of cAMP signaling inhibits DNA damage-induced apoptosis in BCP-ALL cells through abrogation of p53 accumulation. *Blood*. 2009; 114: 608-18.
- 22- von Knethen A, Brune B. Attenuation of macrophage apoptosis by the cAMP-signaling system. *Mol Cell Biochem*. 2000; 212: 35-43.
- 23- Geier A, Weiss C, Beery R, Haimsohn M, Hemi R, Malik Z. Multiple pathways are involved in protection of MCF-7 cells against death due to protein synthesis inhibition. *J Cell Physiol*. 1995; 163: 570-576.
- 24- Follin-Arbelet V, Hofgaard PO, Hauglin H, et al. Cyclic AMP induces apoptosis in multiple myeloma cells and inhibits tumor development in a mouse myeloma model. *BMC Cancer*. 2011; 11: 301.
- 25- Lomo J, Blomhoff HK, Beiske K, Stokke T, Smeland EB. TGF-beta 1 and cyclic AMP promote apoptosis in resting human B lymphocytes. *J Immunol*. 1995; 154: 1634-43.
- 26- Mentz F, Merle-Beral H, Dalloul AH. Theophylline-induced B-CLL apoptosis is partly dependent on cyclic AMP production but independent of CD38 expression and endogenous IL-10 production. *Leukemia*. 1999; 13: 78-84.
- 27- Mentz F, Mossalayi MD, Ouaz F, et al. Theophylline synergizes with chlorambucil in inducing apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood*. 1996; 88: 2172-2182.
- 28- Webster CR, Usechak P, Anwer MS. cAMP inhibits bile acid-induced apoptosis by blocking caspase activation and cytochrome c release. *Am J Gastroenterol*. 2002; 283: 727-G38.
- 29- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T. The kit receptor promotes cell survival via activation of PI 3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of Bad on Ser136. *CB*. 1998; 8(13): 779-82.
- 30- Fang X, Yu S, Eder A, et al. Regulation of BAD phosphorylation at serine 112 by the Ras-mitogen-activated protein kinase pathway. *Oncogene*. 1999; 18: 6635-40.
- 31- del Peso L, Gonzalez-Garcia M, Page C, Herrera R, Nunez G. Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt. *Science*. 1997; 278: 687-9.

The Effect of Elevated cAMP Levels on Phosphorylation of Bcl-2-Associated Death Promoter Protein in Pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (NALM-6) Treated with Doxorubicin

Kashiri M¹, Safa M², Kazemi A³

¹Dept. of Hematology, Allied Medical School, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

²Cellular and Molecular Research Center, Dept. of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³Dept. of Hematology & Blood Banking, School of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Corresponding Author: Safa M, Cellular and Molecular Research Center, Dept. of Hematology and Blood Banking, Faculty of Allied Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

E-mail: Majidsafa@gmail.com

Received: 8 Feb 2014 **Accepted:** 22 Aug 2014

Background and Objective: BAD (Bcl-2-associated death promoter) is a proapoptotic protein which in phosphorylated state is inactivated in terms of its apoptotic function while in dephosphorylated status causes proceeding of apoptosis via inhibition of BCL-XL. cAMP elevating agents attenuate Doxorubicin induced-apoptosis. The aim of this study was to assess the effects of cAMP elevating agents via Forskolin and IBMX on phosphorylation of BAD in Pre-B acute lymphoblastic leukemia (pre-B ALL) cells.

Materials and Methods: NALM-6 cells were incubated with cAMP increasing agents along with two concentrations of Doxorubicin 250 and 500 for 24 hours. Assessment of cell death was performed by Trypan blue staining and apoptosis was assessed by Annexin V via flowcytometry. Western blot was used for evaluating the expression of BAD protein and phosphorylation changes. Data was analyzed by Paired t-test.

Results: The flowcytometry analysis of Annexin V revealed that cAMP increasing agents in combination with Doxorubicin lead to decreased rate of apoptosis in comparison to Doxorubicin alone. Analysis of western blotting showed that cAMP increasing agents cause phosphorylate serine residues of BAD. The study also indicated that Doxorubicin alone is unable to alter the phosphorylation status of BAD.

Conclusion: Results of this study indicate that cAMP increasing agents attenuate doxorubicin-induced apoptosis via phosphorylation of BAD in NALM-6 cells.

Keywords: cAMP, Acute lymphoblastic Leukemia, Doxorubicin, Forskolin, IBMX