

القای آپوپتوز وابسته به p53 در رده‌ی سلولی لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌ساز لنفوسیت (NALM-6) B توسط مولکول کوچک RITA

فاطمه کیانی نوده^۱، ریما منافی شبستری^۱، دکتر احمد کاظمی^۲، دکتر مجید صفا^۳

نویسنده‌ی مسوول: تهران، دانشگاه علوم پزشکی ایران، دانشکده‌ی پیراپزشکی، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی safam@iums.ac.ir
دریافت: ۹۳/۷/۲۲ پذیرش: ۹۳/۱۱/۴

چکیده

زمینه و هدف: استفاده از مولکول‌های غیر پپتیدی با وزن مولکولی پایین که واکنش بین p53 و تنظیم کننده منفی‌اش یعنی MDM2 را تخریب می‌کنند، یک راهکار درمانی جدید جهت درمان انواع مختلف سرطان‌هاست. یکی از این ترکیبات بنام RITA (Reactivation of p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis) به پروتئین p53 متصل شده و با مهار تشکیل کمپلکس p53-MDM2 موجب افزایش سطح p53 و در نتیجه القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌گردد. هدف از این مطالعه بررسی اثر RITA بر میزان القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 می‌باشد.

روش بررسی: سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف RITA در فواصل زمانی معین تیمار شدند. میزان بقای سلولی و آپوپتوز به ترتیب با استفاده از روش MTT و رنگ‌آمیزی پروپیدیوم ایدید ارزیابی شدند. از تکنیک وسترن‌بلات جهت بررسی سطح پروتئین‌های p53 و p53 استیل‌ه، پروکاسپاز-۳ و PARP فعال استفاده شد. در نهایت داده‌ها توسط آزمون تی زوجی آنالیز شدند.

یافته‌ها: RITA دارای اثر سیتوتوکسیک بر سلول‌های NALM-6 است. بررسی فلوسایتومتری حاکی از افزایش معنادار ($P < 0.05$) درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک در ناحیه Sub-G1 در سلول‌های تیمار شده با RITA در مقایسه با سلول‌های کنترل بود. نتایج وسترن‌بلات نشان دهنده افزایش القای تجمع و استیلاسیون p53 در سلول‌های NALM-6 توسط RITA بود. همچنین RITA باعث آپوپتوز بواسطه افزایش فعالیت کاسپازها در سلول‌های NALM-6 گردید.

نتیجه‌گیری: RITA باعث القای آپوپتوز وابسته به p53 در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌ساز لنفوسیت (NALM-6) می‌شود. **واژگان کلیدی:** RITA، p53، MDM2، آپوپتوز و لوسمی لنفوبلاستیک حاد

مقدمه

لوسمی لنفوبلاستیک حاد	هتروژن از اختلالات ناشی از تکثیر و گسترش کلونال
ALL (Acute Lymphoblastic Leukemia) یک گروه	لنفوسیت‌های بدخیم در مغز استخوان، خون محیطی

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

۲- دکترای هماتولوژی و بانک خون، استاد گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

۳- دکترای هماتولوژی و بانک خون، استادیار هماتولوژی و بانک خون، مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی، گروه هماتولوژی و بانک خون، دانشکده‌ی پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی ایران

و اندام‌های دیگر می‌باشد. این بدخیمی هم در بزرگسالان (۲۰ درصد) و هم در کودکان رخ می‌دهد ولی بیشتر کودکان با میانگین سنی بین ۵-۲ سال را درگیر می‌کند. در واقع ALL شایع‌ترین بدخیمی در کودکان و نوجوانان محسوب می‌شود و تقریباً ۲۵ درصد تمام سرطان‌ها و ۷۵ درصد لوسمی‌های اطفال را در بر می‌گیرد (۱ و ۲). اشعه‌ی یونیزان، اختلالات ژنتیکی، فعال شدن نابجای پروتو انکوژن‌ها و یا برخی از عفونت‌های ویروسی از عوامل موثر در بروز این بدخیمی محسوب می‌شوند اما علت اصلی آن نامشخص است. در حقیقت ایجاد تغییرات ژنتیکی نقش اصلی را در بروز این بدخیمی ایفا می‌کنند. شیمی درمانی نقش مهمی در درمان این بیماران دارد اما در گروهی از بیماران عود بیماری رخ می‌دهد و برخی نیز به این شیوه‌ی درمانی مقاومت نشان می‌دهند. از این رو به منظور بهبود نتایج درمان در این بیماران شیوه‌های درمانی جدیدتری در حال بررسی و مطالعه می‌باشد (۳ و ۴).

p53 به عنوان محافظ ژنوم در پاسخ به انواع مختلف استرس سلولی از جمله آسیب DNA، فعال شدن نابجای انکوژن‌ها و استرس اکسیداتیو فعال گشته، وارد هسته می‌شود و با اتصال به پروموتور ژن‌های هدف موجب افزایش یا کاهش بیان آن‌ها می‌گردد. مولکول‌های هدف شامل ژن‌های کدکننده‌ی پروتئین‌های درگیر در هر دو مسیر آپوپتوز می‌باشند که به پیام‌های داخل و خارج سلولی پاسخ می‌دهند (۵). در مسیر وابسته به رونویسی p53 از طریق القای بیان پروتئین پیش آپوپتوزی نظیر BAX و یا کاهش بیان ژن‌های ضد آپوپتوزی مانند Bcl-2 باعث آپوپتوز می‌شود. مکانیسم آپوپتوز به صورت مستقل از رونویسی شامل فعال سازی BAX توسط p53 در سیتوپلاسم، آزادسازی سیتوکروم C و در نهایت فعال شدن کاسپازها می‌باشد (۶). لذا با توجه به نقش حیاتی p53 در سلول، هرگونه اختلال در عملکرد آن ممکن است منجر به ایجاد اختلال در نقاط کنترل چرخه‌ی سلولی، ناپایداری ژنوم، بقای ناکافی سلول‌ها و در نتیجه تکثیر و افزایش بی‌رویه

سلول‌های آسیب دیده شود. بنابراین، خیلی تعجب آور نیست که بگوئیم p53 شایع‌ترین ژن سرکوبگر تومور غیرفعال در انواع سرطان‌های انسانی است (۷). جهش در ژن سرکوب کننده تومور p53 در حدود ۵۰ درصد سلول‌های بدخیم و سرطانی گزارش شده است (۸). برخلاف اکثر تومورهای توپر یا غیرخونی جهش در ژن p53 تنها در حدود ۱۰ تا ۱۵ درصد از سلول‌های لوسمیک میلوئید و لنفوئید قابل تشخیص است (۹) و به‌طور غالب در لنفومای غیر هوچکین پیشرفته، سلول‌های B مهاجم لوسمی لنفوبلاستیک مزمن (۱۰) و لوسمی پرولنفوسیتیک مزمن یافت می‌شود (۱۱). در برخی از تومورها نیز ممکن است p53 در اثر جهش و یا افزایش بیان MDM2 (MURINE DOUBLE MINUTE CLONE 2) غیرفعال شود (۱۲). بنابراین فعال کردن p53 در این تومورها با استفاده از مولکول‌های کوچک غیر پپتیدی که واکنش بین p53 و تنظیم کننده‌ی منفی آن یعنی MDM2 را هدف قرار می‌دهند، به عنوان یک راهکار درمانی جدید توجه بسیاری از محققان را به خود جلب کرده است (۱۳). (Reactivation of RITA, p53 and Induction of Tumor cell Apoptosis) ترکیبی با وزن مولکولی پایین، غیر پپتیدی و فرمول شیمیایی ۵۲۰ بیس (۵- هیدروکسی متیل -۲- تینیل) فوران می‌باشد که در طی آزمایشات غربالگری توسط ایساوا و همکارانش در موسسه ملی سرطان (NCI: National Cancer Institute) در سال ۲۰۰۴ شناسایی شد. این ترکیب با میل ترکیبی بالا به N-Terminal پروتئین p53 متصل شده و با ایجاد تغییرات ساختاری در ساختمان فضایی p53 از تشکیل واکنش MDM2-p53 جلوگیری می‌کند (۱۴). در واقع RITA با تخریب واکنش بین p53 و تنظیم کننده‌ی منفی آن یعنی MDM2 باعث افزایش پایداری و فعالیت p53 و القای آپوپتوز در سلول‌های سرطانی می‌شود. القای آپوپتوز ناشی از RITA در سلول‌های سرطانی کولون بیان کننده‌ی تیپ وحشی p53، سرطان سینه و ریه، استئوسارکوما و کارسینومای

روزانه به وسیله‌ی 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 می‌شد. با پاساژ دادن هر دو تا سه روز، سلول‌ها در فاز لگاریتمی رشد نگهداری شدند.

سنجش MTT: برای بررسی اثر غلظت‌های مختلف RITA بر میزان بقای سلول‌ها آزمون (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) انجام شد. MTT محلول زرد رنگ حاوی نمک تترازولیوم هنگامی که وارد سلول‌های زنده می‌شود، به‌وسیله‌ی آنزیم دهیدروژناز سلول‌های زنده احیا می‌شود و رسوب بنفش رنگ ایجاد می‌کند. به‌طور خلاصه، جهت انجام تست بعد از دو بار پاساژ دادن، سلول‌ها به پلیت ۹۶ خانه (۵۰۰۰ سلول در هر خانه) منتقل و انکوبه شدند؛ بعد از اتمام زمان انکوباسیون، محلول MTT (۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر در PBS) به چاهک‌های پلیت ۹۶ خانه اضافه شد و به مدت ۳ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار گرفتند. سپس پلیت حاوی سلول‌ها با دور ۱۰۰۰ g به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. در نهایت محلول رویی چاهک‌ها خالی گردید و ۱۰۰ میکرولیتر از محلول DMSO به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه جهت حل کردن رسوب بنفش MTT، تکان داده شد. جذب نوری نمونه‌ها توسط الایزا ریدر در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد.

بررسی فلوئوسیتومتری آپوپتوز: جهت تشخیص سلول‌های زنده از سلول‌های آپوپتوزی و نکروزی از رنگ آمیزی پروپیدیم یدید (PI) استفاده گردید. بدین‌منظور پس از سه مرحله پاساژ سلول‌های NALM-6 به تعداد 7×10^5 سلول در هر یک از چاهک‌های پلیت‌های ۱۲ خانه‌ای (Greiner) با حجم نهایی ۲ میلی‌لیتر کشت داده شدند. در چاهک‌های جداگانه با توجه به الگوی طراحی شده، غلظت‌های مختلف از RITA با سلول‌ها مجاور شد. پس از گذشت ۴۸ ساعت سلول‌ها

سلول‌های کلیه در بسیاری از مطالعات نشان داده شده است (۱۶ و ۱۵) اما اثر و مکانیسم‌های مولکولی آپوپتوز ناشی از این ترکیب در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌ساز B به‌عنوان شایع‌ترین بدخیمی در کودکان، کمتر مورد بررسی قرار گرفته است. لذا در این مطالعه به بررسی اثر RITA بر میزان القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 که رده سلولی (Cell Line) لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌ساز B (pre-B ALL) حاوی تیپ وحشی p53 است (۱۷)، پرداخته شد.

روش بررسی

آنتی‌بادی‌ها از شرکت‌های زیر خریداری شدند: p53 استیل‌ه در موقعیت لیزین ۳۸۲ (Cell Signaling)، p53 (Do-1)، پروکاسپاز ۳ و آنتی‌بادی ثانویه کونژوگه با HRP (Santa Cruz)، آنتی- PARP-1 (Optimex)، آنتی- بتا اکتین، ۵ و ۲ دی فنیل تترازولیوم بروماید (محلول MTT) از شرکت Sigma و RITA از Alexis خریداری شد. برای تهیه‌ی استوک اولیه RITA با غلظت ۳/۴۲ میلی‌مولار، مقدار مشخص RITA در DMSO (Merck) حل شد و در ۲۰ درجه‌ی سانتی‌گراد نگهداری و در زمان تیمار سلول‌ها استوک کاربردی با غلظت ۰/۳۴۲ میلی‌مولار آماده گردید.

کشت سلولی: در این مطالعه‌ی تجربی رده‌ی سلولی NALM-6 (سلول پیش‌ساز لوسمی لنفوبلاستیک حاد pre-B ALL) از انستیتو پاستور ایران خریداری شد. مواد مورد نیاز کشت سلولی از شرکت Gibco آمریکا، فلاسک‌ها و میکروپلیت‌ها از شرکت Griner آلمان خریداری شدند. سلول‌ها در محیط کشت RPMI-1640 به همراه ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum) FBS و ۱ درصد پنی سیلین-استرپتومایسین (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر پنی سیلین و ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر استرپتومایسین) در انکوباتور (Memmert) با رطوبت ۹۵ درصد، CO₂ ۵ درصد و دمای ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد کشت داده شدند. کشت‌ها به صورت

برداشت و رسوب حاصل به مدت یک شب (Over Night) در ۲ میلی لیتر الکل ۷۰ درصد سرد در دمای ۲۰- درجه ی سانتی گراد فیکس شدند. پس از شستشوی سلول ها با بافر فسفات - سالین سرد، طبق روش کار کیت به سلول ها ۲۵۰ میکرولیتر بافر سیترات و ۲۵۰ میکرولیتر بافر فسفات - سالین اضافه شد و سلول ها به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. سپس به سلول ها ۵ میکرولیتر از RNase ۱۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر (Sigma) و ۵۰ میکرولیتر پروپیدیوم یدید افزوده شد و به مدت ۳۰ دقیقه در ۳۷ درجه ی سانتی گراد انکوبه شدند. در نهایت سوسپانسیون سلولی حاصل با استفاده از دستگاه فلو سیتومتری مدل FACSCalibur (Beckton Dickinson) و طول موج تحریک ۴۸۸ نانومتر و فیلتر قرائت ۵۱۵ نانومتر (FL-1) برای تعیین فلوئورسین و فیلتر ۶۰۰ نانومتر برای PI (FL-2) مورد بررسی قرار گرفت. اطلاعات خروجی دستگاه با استفاده از نرم افزار Cell Quest آنالیز گردید.

استخراج پروتئین تام سلولی: سلول های NALM-6 کنترل و تیمار شده با ریتا جمع آوری و با بافر فسفات - سالین سرد شستشو داده شدند. سپس بر روی پلیت سلول ها (حاوی 5×10^6 سلول) محلول لیز کننده سلول (حاوی ۱ درصد NP-40، ۰/۵ درصد SDS، ۱۰ میلی مولار Tris-Hcl (pH: ۷/۴)، ۱۵۰ میلی مولار NaCl، ۵ میلی مولار EDTA، ۰/۵ درصد سدیم داکسی کولات، ۱۰۰ میکرومولار PMSF، مهار کننده ی فسفاتاز و مهار کننده ی پروتئاز (Sigma) افزوده و نمونه ها بر روی یخ به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شدند. هر ۵ دقیقه یک بار نمونه ها جهت هموژنیزه و یکنواخت شدن ورتکس شدند. سپس نمونه ها به مدت ۲۰ دقیقه (با شتاب ۱۳۰۰۰ rpm و دمای ۴ درجه ی سانتی گراد) سانتریفیوژ گردید تا پسماندهای حاصل از لیز رسوب کنند. محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته شد و غلظت پروتئین توسط روش Bradford اندازه گیری شد. نمونه های پروتئین به حجم های

کوچکتر مساوی تقسیم گردیده و تا زمان انجام آزمایش در دمای ۸۰- درجه ی سانتی گراد نگهداری شدند.

روش ایمونوبلاتینگ برای سنجش مقدار پروتئین: ابتدا نمونه های پروتئینی را با بافر نمونه 6X حاوی ۶۲ میلی مولار Tris-HCl (pH: ۶/۸)، ۲ درصد SDS، گلیسرول ۲۵ درصد، مرکاپتواتانول ۵ درصد و بروموفنول بلو ۰/۰۲ درصد، مخلوط کرده و به مدت ۵ دقیقه در ۹۹ درجه ی سانتی گراد جوشانده شدند. میزان غلظت یکسانی از پروتئین های استخراج شده (۶۰ میکروگرم) از سلول های کنترل و تیمار شده، به روش SDS-PAGE الکتروفورز شده و باندهای پروتئینی به روش بلاتینگ بر روی ورقه نیتروسلولز منتقل داده شد. SDS-PAGE و بلاتینگ به ترتیب توسط دستگاه های Mini-Protein 4 Cell (الکتروفورز عمودی پروتئین) و Mini-Trans Blot (شرکت Bio-Rad) انجام گردید. محل باندهای پروتئینی و راندمان انتقال به روش رنگ آمیزی Ponceau S بررسی و محل باند مورد نظر با استفاده از مارکر وزن مولکولی کنترل شد. برای شناسایی باندهای مربوط به پروتئین های p53 و Procaspase-3 از آنتی بادی های اولیه بر علیه این پروتئین ها استفاده شد. این آنتی بادی ها توسط آنتی بادی متصل به پراکسیداز (HRP) شناسایی و به طریق کمی لومینسانس (ECL™ Advance Western Blotting Detection Kit, Amersham) باند پروتئینی مورد نظر بر روی فیلم ظاهر گردید. از آنتی بادی اولیه بر علیه بتا اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد.

آنالیز آماری: اختلاف آماری بین گروه های کنترل و تیمار شده با استفاده از آزمون Paired Student's t-test بررسی شد. در این مطالعه $P < 0/05$ از نظر آماری معنی دار تلقی شد.

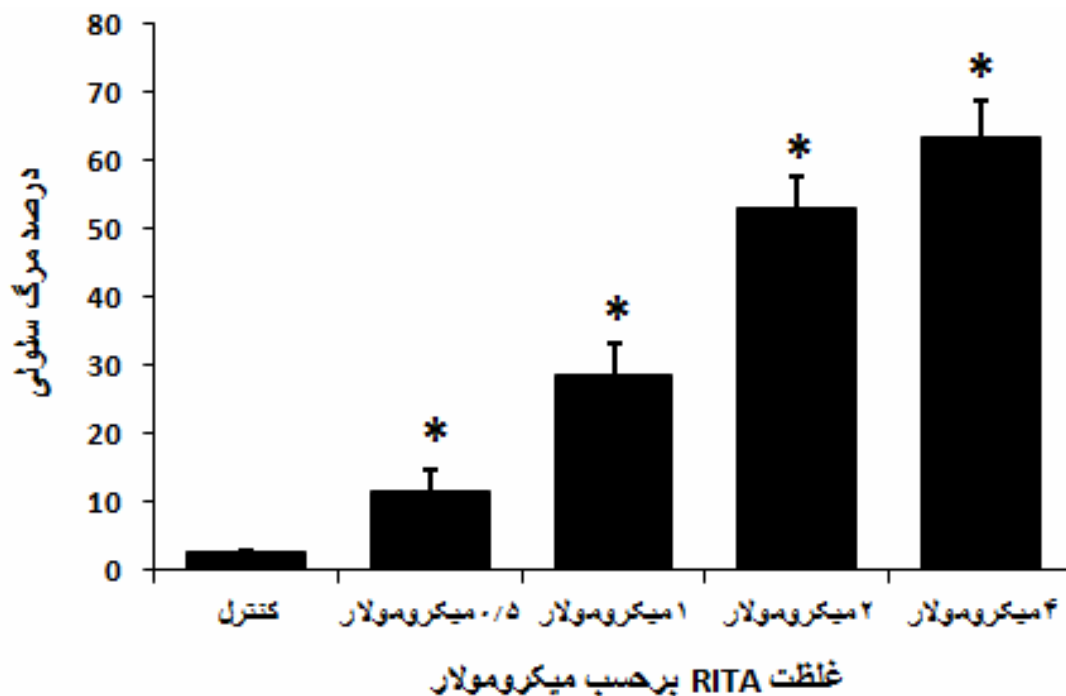
یافته ها

القای مرگ سلولی توسط RITA در سلول های ALM-6:

در ابتدا جهت بررسی اثر RITA بر میزان بقای سلولی در سلول های NALM-6، سلول ها با غلظت های مشخص شده

متابولیسم بالایی دارند و همانطور که در نمودار ۱ مشخص است درصد سلول‌های مرده و فاقد فعالیت متابولیک در سلول‌های تیمار شده با RITA در مقایسه با نمونه کنترل با افزایش غلظت و دوز RITA افزایش یافته است.

RITA به مدت ۴۸ ساعت مجاور شدند. در ادامه تست MTT انجام شد. نمودار ۱ نشان دهنده اثر کشندگی RITA بر سلول‌های NALM-6 پس از ۴۸ ساعت مجاورت با غلظت‌های معین RITA در مقایسه با نمونه کنترل می‌باشد. سلول‌های زنده و در حال تکثیر معمولاً فعالیت



نمودار ۱، بررسی افزایش درصد سلول‌های NALM-6 پس از تیمار با غلظت‌های مختلف RITA در مقایسه با نمونه کنترل. سلول‌های NALM-6 پس از مجاورت با غلظت‌های مشخص شده از RITA دچار مرگ سلولی می‌شوند. اثر سیتوتوکسیک RITA به دوز آن بستگی دارد. افزایش درصد سلول‌های مرده مجاور شده با RITA در مقایسه با نمونه کنترل معنی‌دار است ($P < 0.05$). میزان p value برای هر نمودار به ترتیب از چپ به راست برابر است با ۰/۰۳۱، ۰/۰۰۸، ۰/۰۰۳ و ۰/۰۰۴ که همگی نشان دهنده معنادار بودن نتایج است ($p < 0.05$) و به صورت علامت ستاره در بالای هر نمودار مشخص شده است.

سلولی ناشی از RITA، از رنگ آمیزی پروپویدیوم دیدید و آنالیز فلوسایتومتری استفاده شد. بدین‌منظور سلول‌های NALM-6 تیمار شده با غلظت‌های مختلف RITA پس از ۳۰ ساعت انکوباسیون از نظر میزان درصد سلول‌های آپوپتوتیک و مقدار DNA در مرحله sub-G1 مورد بررسی قرار گرفتند.

افزایش درصد سلول‌های مرده و فاقد فعالیت متابولیک با افزایش غلظت RITA معنادار بوده است ($P < 0.05$) و مقادیر مربوط به نتایج یکی از ۳ مرتبه (تریپلیکیت) آزمون MTT پس از تیمار سلول‌های NALM-6 با غلظت‌های مختلف RITA به‌صورت میانگین $\pm$ انحراف معیار در جدول ۱ نشان داده شده است. به‌منظور بررسی بیشتر مرگ

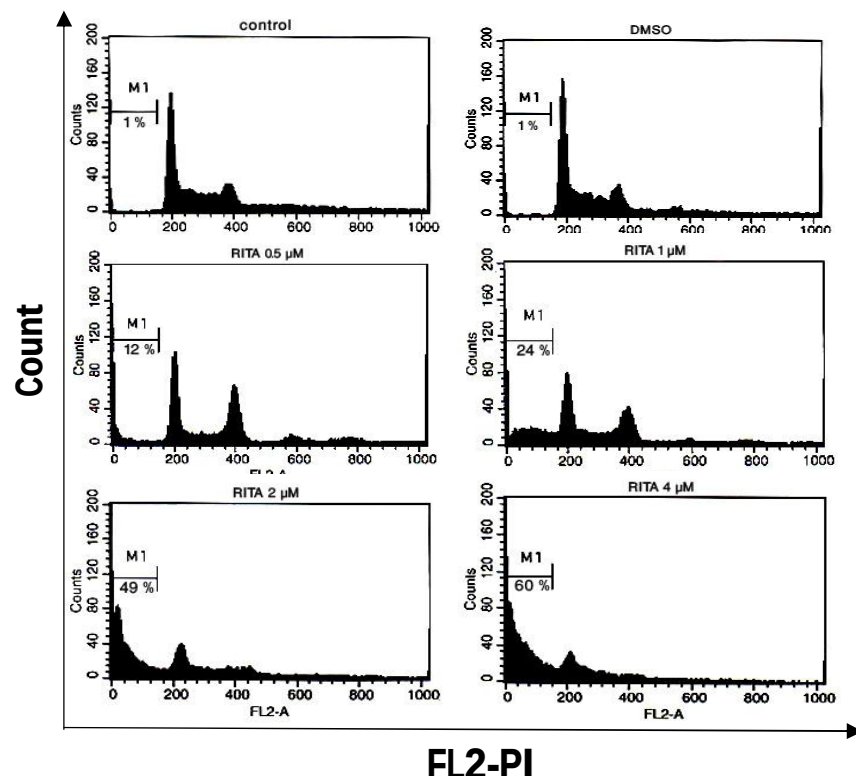
جدول ۱: درصد سلول‌های مرده و فاقد فعالیت متابولیک پس

از تیمار با RITA

غلظت‌های مختلف RITA (میکرومولار)	درصد سلول‌های تیمار شده با فعالیت متابولیک (میانگین $\pm$ انحراف معیار)
کنترل	$2/6 \pm 0/5$
RITA - 0.5 μm	$11/7 \pm 3$
RITA - 1 μm	$28/7 \pm 4/7$
RITA - 2 μm	$53 \pm 4/6$
RITA - 4 μm	$63/3 \pm 6/1$

در شکل ۱ هیستوگرام مربوط به یکی از ۳ آزمایش انجام شده نشان دهنده اثر غلظت‌های مختلف RITA بر القای آپتوز

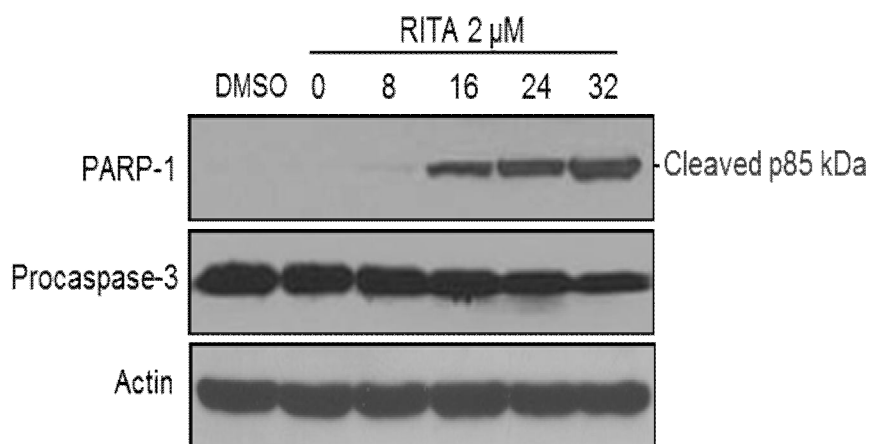
در سلول‌های NALM-6 می‌باشد. درصد جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در ناحیه Sub-G1 که در شکل ۱ با حرف M1 نشان داده شده است، در اثر مجاورت با RITA در غلظت‌های مشخص شده در مقایسه با نمونه کنترل افزایش یافته است که این خود تاییدی بر اثر کشندگی RITA بر سلول‌های NALM-6 می‌باشد. همانند نتایج MTT افزایش جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در سلول‌های تیمار شده با RITA در مقایسه با نمونه کنترل معنادار بوده است ($P < 0/05$) و تغییری در درصد جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در سلول‌های تیمار شده با DMSO در مقایسه با نمونه کنترل مشاهده نشده است. با توجه به نتایج ارایه شده می‌توان بیان کرد که اثر کشندگی RITA بر سلول‌های pre-B ALL به زمان مجاورت و میزان دوز آن بستگی دارد.



شکل ۱: هیستوگرام آپتوز جهت بررسی اثر RITA بر القای آپتوز در سلول‌های NALM-6. درصد جمعیت سلول‌های آپپتوتیک در ناحیه Sub-G1 در اثر مجاورت با RITA در غلظت‌های مشخص شده نسبت به نمونه کنترل افزایش یافته است. درصد سلول‌های آپپتوتیک در فاز Sub-G1 (در شکل با حرف M1 نشان داده شده است) در هر هیستوگرام مشخص می‌باشد.

است و با افزایش زمان انکوباسیون بر میزان آن افزوده شده است. بررسی باندهای مربوط به پروکاسپاز ۳- در شکل ۲ نشان دهنده‌ی کاهش سطح پروکاسپاز ۳- در یک حالت وابسته به زمان در سلول‌های مجاور شده با RITA در مقایسه با نمونه‌ی کنترل است. این نشان می‌دهد که RITA با گذشت زمان و پیشروی مسیر داخلی آپوپتوز باعث افزایش فعالیت اتوپروتئولیزی پروکاسپاز ۳- شده و در نتیجه از سطح پروکاسپاز ۳- کاسته شده است. کاهش در سطح پروکاسپاز ۳- در باندهای مربوط به ۲۴ و ۳۰ ساعت کاملاً مشهود است. تغییری در باندهای مربوط به پروتئین‌های مورد مطالعه در اثر DMSO و نمونه‌ی کنترل مشاهده نشد.

به منظور تایید نتایج فلوسایتومتری جهت بررسی اثر RITA بر القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6، تغییرات سطح پروکاسپاز ۳- و PARP فعال پس از ۰، ۸، ۱۶، ۲۴ و ۳۲ ساعت مجاورت سلول‌ها با غلظت ۲ میکرومولار RITA به کمک تکنیک وسترن بلات ارزیابی گردید. از پروتئین اکتین به عنوان کنترل داخلی استفاده شد. نتایج وسترن بلات نشان دهنده‌ی اثر RITA بر سطح بیان پروکاسپاز ۳- و PARP فعال بوده است (شکل ۲). همانطور که در شکل ۲ (نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمایش ایمونوبلاتینگ) مشخص است RITA موجب افزایش فعالیت کاسپازها شده است به طوری که افزایش سطح PARP فعال (PARP شکسته) پس از گذشت ۱۶ ساعت از زمان مجاورت قابل تشخیص



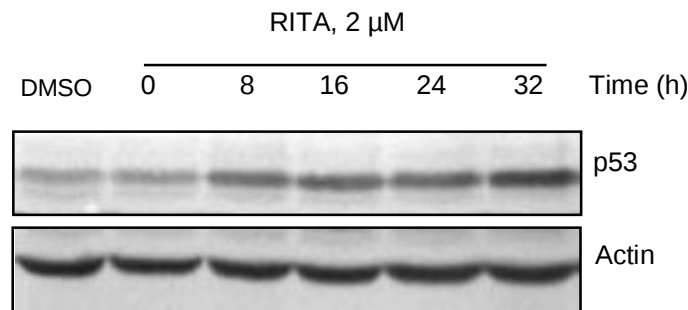
شکل ۲؛ نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمون وسترن بلات جهت بررسی اثر RITA در زمان‌های مشخص شده بر بیان پروتئین کاسپاز ۳ و PARP در سلول‌های NALM-6. شکل نشان دهنده‌ی کاهش سطح پروتئین پروکاسپاز ۳ به صورت وابسته به زمان در سلول‌های تیمار شده با RITA می‌باشد. همچنین با گذشت زمان میزان قطعه شکسته پروتئین PARP/افزایش یافته است که نشان دهنده‌ی القاء آپوپتوز وابسته به مسیر کاسپاز توسط RITA می‌باشد.

NALM-6 با غلظت ۲ میکرومولار RITA تیمار و در زمان‌های معین کشت داده شدند. سپس تغییرات بیان p53 و فرم استیل‌ه آن در سلول‌های pre-B ALL با استفاده از تکنیک وسترن بلات مورد بررسی قرار گرفت. پروتئین اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شد و اثر DMSO بر میزان

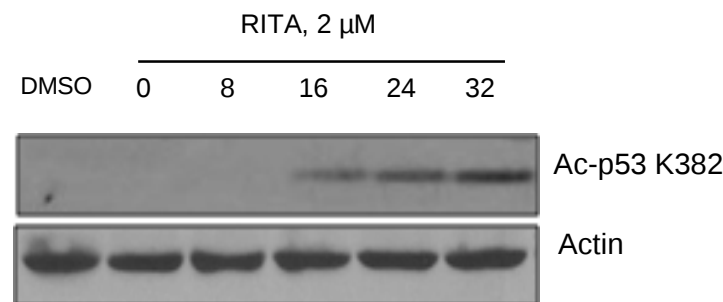
افزایش بیان پروتئین p53 و القای استیل‌اسیون p53 توسط RITA در سلول‌های لوسمیک NALM-6؛ جهت بررسی مکانیسم دقیق اثر RITA بر القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6. تغییرات سطح پروتئین p53 به کمک تکنیک وسترن بلات مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور سلول‌های

شکل ۴ بیان کننده اثر RITA بر استیلاسیون p53 در موقعیت لیزین ۳۸۲ بوده است. همانطور که در شکل ۴ مشخص است هیچ بانندی در نمونه کنترل و سلول‌های تیمار شده با RITA پس از ۸ ساعت مجاورت قابل مشاهده نیست ولی به تدریج و با گذشت زمان بیشتری از زمان مجاورت سلول‌ها با RITA بر میزان استیلاسیون p53 افزوده شده است به طوری که افزایش در باندهای مربوط به ۲۴ و ۳۲ ساعت در مقایسه با نمونه ۱۶ ساعت قابل مشاهده و کاملاً واضح است. در باند مربوط به DMSO نیز همانند p53 تغییری صورت نگرفته است.

پروتئین‌های مورد نظر در سلول‌های NALM-6 نیز مورد بررسی قرار گرفت. نتایج وسترن بلات نشان دهنده اثر RITA بر افزایش سطح پروتئین p53 و استیلاسیون آن بوده است (شکل ۳ و ۴). در شکل ۳ سطح پروتئین p53 در سلول‌های تیمار شده با RITA نسبت به نمونه کنترل با گذشت زمان مجاورت افزایش یافته است؛ به عبارتی RITA به صورت وابسته به زمان سبب افزایش سطح پروتئین p53 در سلول‌های NALM-6 شده است بطوریکه این افزایش در باندهای مربوط به زمان‌های ۲۴ و ۳۲ ساعت کاملاً مشهود است. در باند مربوط به DMSO تغییری مشاهده نشد.



شکل ۳، نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمون وسترن بلات جهت بررسی اثر RITA در زمان‌های مشخص شده بر سطح پروتئین p53 در سلول‌های NALM-6، شکل نشان دهنده‌ی افزایش سطح p53 به صورت وابسته به زمان در سلول‌های مجاور شده با RITA می‌باشد.



شکل ۴، نتایج یکی از ۳ مرتبه آزمون وسترن بلات جهت بررسی اثر RITA در زمان‌های مشخص شده بر استیلاسیون p53 در سلول‌های NALM-6، با توجه به بررسی باندها مشخص است که RITA پس از گذشت ۱۶ ساعت باعث افزایش میزان استیلاسیون p53 در سلول‌های NALM-6 شده است. این افزایش در باندهای مربوط به ۲۴ و ۳۲ شدت یافته و مشهود است.

بحث

به دلیل نقش مهم آپوپتوز در درمان موفقیت‌آمیز علیه سرطان‌ها، درک مکانیسم‌هایی که منجر به القا و یا مقاومت به آپوپتوز خصوصاً آپوپتوز با واسطه p53 در سلول‌های سرطانی می‌شود بسیار حایز اهمیت است (۱۸). در این مطالعه از مولکول فعال کننده‌ی p53 بنام RITA جهت بررسی اثرات ضد توموری آن در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش‌ساز B (NALM-6) استفاده شد. در مورد اثر RITA بر القای آپوپتوز و همچنین تاثیر آن در جلوگیری از تکثیر سلول‌های سرطانی مختلف از جمله سلول‌های سرطانی کولون، ریه، پوست، سینه، سرویکال و بدخیمی‌های هماتولوژیک نظیر لنفوم‌های مختلف، AML و ALL مطالعات زیادی انجام شده است (۸ و ۱۹). به‌طور کلی، نتایج حاکی از آن است که RITA به انتهای آمین پروتئین سرکوبگر تومور p53 متصل شده و به واسطه ایجاد تغییرات ساختاری در دومین‌های مرکزی و کربوکسیل p53 موجب تخریب واکنش MDM2 – p53 می‌شود. در واقع RITA با تخریب واکنش p53-MDM2 از تخریب p53 به واسطه فعالیت یوبی کوئیتین لیگازی MDM2 جلوگیری می‌کند. به‌طور معمول، MDM2 با فراخوانی کمپلکس هیستون داستیلاز یک (HDAC1: histone deacetylase 1) از طریق جداکردن گروه‌های استیل موجب افزایش تخریب p53 می‌شود. لازم به ذکر است که استیلایون و یوبی کوئیناسیون پروتئین p53 در موقعیت آمینواسیدی (لیزین ۳۸۲) رخ می‌دهد. علاوه بر این MDM2 قادر است به دومین فعال کننده رونویسی واقع در ناحیه آمینوی p53 متصل شده و موجب انتقال آن از هسته به سیتوپلاسم گردد و در نتیجه از فعالیت p53 به عنوان یک فاکتور رونویسی و القاکننده آپوپتوز در سلول جلوگیری می‌کند (۲۰-۲۲). همچنین نتایج تحقیقات نشان داده‌اند که RITA عامل القای آپوپتوز و

جلوگیری از رشد سلول‌های سرطانی حامل p53 نوع نرمال و جهش یافته در انواع مختلفی از رده‌های سلولی بدخیم در In-vitro و In-vivo است (۲۳). در مطالعه‌ی حاضر اثرات سیتوتوتیک و ضد تکثیری RITA با کمک آزمایش MTT در سلول‌های NALM-6 نشان داده شد. نتایج بررسی نمودار مرگ سلولی نشان دهنده حساسیت سلول‌های pre-B ALL (NALM-6) به RITA است. در مطالعه‌ی مشابه، اثرات سیتوتوتیک RITA بر سلول‌های مالتیل میلومایی MM.1S و H929 توسط ساها و همکارانش نشان داده شده است (۲۴). بررسی هیستوگرام آپوپتوز در نمونه‌های تیمار شده با RITA در مطالعه حاضر (شکل ۱) نشان دهنده‌ی نقش این ترکیب در القای آپوپتوز در سلول‌های NALM-6 بوده است. درصد جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک ناشی از RITA در ناحیه Sub-G1 با اضافه کردن دوز RITA افزایش یافته است. در مطالعه‌ی مشابه، ژائو و همکارانش نشان داده‌اند که RITA سبب افزایش جمعیت سلول‌های آپوپتوتیک در ناحیه Sub-G1 در سلول‌های سرطان کولون حاوی p53 نوع نرمال و جهش یافته HCT116 می‌شود (۱۶). در مطالعه‌ی حاضر القای آپوپتوز با واسطه p53 در سلول‌های پیش ساز لوسمی لنفوبلاستیک حاد NALM-6 حاوی p53 نوع نرمال توسط RITA نشان داده شد. بررسی نتایج وسترن بلات (شکل ۳) در مطالعه حاضر حاکی از افزایش سطح پروتئین p53 در سلول‌های NALM-6 مجاور شده با RITA بوده است. این بخش از یافته‌ها مطابق با نتایج به‌دست آمده از مطالعه‌ی است که نقش این مولکول کوچک در افزایش سطح p53 با بررسی اثر RITA بر سلول‌های مالتیل میلومایی (MM.1S و H929) در یک حالت وابسته به زمان نشان داده شد (۲۴). عملکرد RITA از طریق افزایش بیان پروتئین سرکوبگر تومور p53 در سلول‌های سرطان سینه (MCF7) نیز نشان داده شده است (۲۵). این بخش از نتایج این مطالعه و مطالعات دیگر دلالت

افزایش بیان پروتئین p53 و فعال کردن کاسپازها اثرات توکسیک خود را بر سلول‌های لوسمیک NALM-6 اعمال می‌کند که این امر می‌تواند یک راهکار نویدبخش در جهت بهبود درمان این بیماری در آینده باشد. با این وجود نیاز به بررسی بیشتر مکانیسم مولکولی RITA در سلول‌های اولیه لوسمی لنفوبلاستیک حاد و دیگر سلول‌های لوسمیک در مطالعات بعدی کماکان باقی است.

نتیجه گیری

با توجه به نتایج به دست آمده از این مطالعه می‌توان بیان کرد RITA با افزایش بیان پروتئین سرکوبگر تومور p53 و افزایش فعالیت کاسپازها باعث القای آپوپتوز در سلول‌های لوسمی لنفوبلاستیک حاد پیش ساز سلول B (NALM-6) می‌شود و از این طریق از تکثیر سلول‌های سرطانی جلوگیری می‌کند. انجام تحقیقات تکمیلی جهت بررسی دقیق‌تر مکانیسم مولکولی RITA کمک کننده خواهد بود.

تقدیر و تشکر

این مقاله حاصل نتایج طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی ایران به شماره ۲۰۲۸۶ می‌باشد. بدین وسیله از کارشناسان محترم مرکز تحقیقات سلولی و مولکولی و آزمایشگاه هماتولوژی دانشکده‌ی پیراپزشکی دانشگاه علوم پزشکی ایران تشکر و قدردانی می‌شود.

بر اثر RITA در القای آپوپتوز با واسطه p53 در سلول‌های سرطانی دارد. پایداری و فعالیت p53 به تغییرات پس از ترجمه آن بستگی دارد. فسفریلاسیون و استیلاسیون از جمله این تغییرات هستند که در پاسخ به استرس سلولی در پروتئین p53 رخ می‌دهند (۱۲). در مطالعه‌ی حاضر نتایج و سترن بلات (شکل ۴) نشان می‌دهد که RITA باعث استیلاسیون پروتئین p53 و در نتیجه پایداری و افزایش تجمع آن در سلول‌های NALM-6 شده است. تاکنون مطالعه‌ی مشابهی در مورد اثر RITA بر میزان استیلاسیون p53 انجام نگرفته است. مکانیسم راه اندازی آپوپتوز توسط p53 ممکن است به صورت مستقل از رونویسی و یا به واسطه‌ی فعال سازی Bax توسط p53 در سیتوپلاسم و سپس آزادسازی سیتوکروم C و در نهایت فعال شدن کاسپازها باشد (۲۶). بررسی نتایج و سترن بلات در شکل ۲ مطالعه‌ی حاضر دلالت بر اثر RITA بر فعالیت پروکاسپازها دارد. در مطالعه‌ی مشابه نتایج یک بررسی نشان داده است که مرگ سلولی ناشی از RITA وابسته به فعالیت کاسپازهاست (۱۶). به‌طور کلی نتایج بررسی سطح پروتئین‌های p53، PARP فعال شده و پروکاسپاز-۳ با کمک تکنیک و سترن بلات تاییدی بر نتایج فلوسایتومتری بوده و نشان دهنده‌ی اثر RITA بر القای آپوپتوز در سلول‌های پیش‌ساز لنفوسیت B لوسمی لنفوبلاستیک حاد (NALM-6) بوده است. به‌عبارتی دیگر نتایج مطالعه‌ی حاضر نشان می‌دهد که این ترکیب به‌واسطه القای آپوپتوز،

References

- 1- Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 2013; 381: 1943-55.
- 2- Schrappe M, Hunger SP, Pui C-H, et al. Outcomes after induction failure in

- childhood acute lymphoblastic leukemia. *New Eng J Med*. 2012; 366: 1371-81.
- 3- Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, et al. Improved early event-free survival with imatinib in Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia: A children's

- oncology group study. *J Clin Oncol*. 2009; 27: 5175-81.
- 4- Shah NN, Dave H, Wayne AS. Immunotherapy for pediatric leukemia. *Frontiers in Oncology*. 2013; 3.
- 5- Bai L, Zhu W-G. p53: structure, function and therapeutic applications. *J Cancer Mol*. 2006; 2: 141-53.
- 6- Allen P, Newland A, Bustin S. The role of apoptosis (programmed cell death) in haemopoiesis and the immune system. *Blood Reviews*. 1993; 7: 63-73.
- 7- Inoue K, Kurabayashi A, Shuin T, Ohtsuki Y, Furihata M. Overexpression of p53 protein in human tumors. *Med Mol Morpho*. 2012; 45: 115-23.
- 8- Saha MN, Qiu L, Chang H. Targeting p53 by small molecules in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*. 2013; 6: 23.
- 9- Gaidano G, Ballerini P, Gong JZ, et al. p53 mutations in human lymphoid malignancies: association with Burkitt lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1991; 88: 5413-7.
- 10- Caligaris-Cappio F, Hamblin TJ. B-cell chronic lymphocytic leukemia: a bird of a different feather. *Journal of Clinical Oncology*. 1999; 17: 399.
- 11- Lens D, De Schouwer PJ, Hamoudi RA, Abdul-Rauf M, Farahat N, Matutes E, et al. p53 abnormalities in B-cell prolymphocytic leukemia. *Blood*. 1997; 89: 2015-23.
- 12- Ashcroft M, Vousden KH. Regulation of p53 stability. *Oncogene*. 1999; 18: 7637-43.
- 13- Roh J-L, Ko JH, Moon SJ, Ryu CH, Choi JY, Koch WM. The p53-reactivating small-molecule RITA enhances cisplatin-induced cytotoxicity and apoptosis in head and neck cancer. *Cancer letters*. 2012; 325: 35-41.
- 14- Issaeva N, Bozko P, Enge M, Protopopova M, Verhoef LG, Masucci M, et al. Small molecule RITA binds to p53, blocks p53-HDM-2 interaction and activates p53 function in tumors. *Nature Medicine*. 2004; 10: 128-1321.
- 15- Selivanova G, editor Therapeutic targeting of p53 by small molecules. Seminars in cancer biology; 2010: Elsevier.
- 16- Zhao CY, Szekely L, Bao W, Selivanova G. Rescue of p53 function by small-molecule RITA in cervical carcinoma by blocking E6-mediated degradation. *Cancer Research*. 2010; 70: 3372-81.
- 17- Adachi N, So S, Iizumi S, Nomura Y, Murai K, Yamakawa C, et al. The human pre-B cell line Nalm-6 is highly proficient in gene targeting by homologous recombination. *DNA and Cell Biology*. 2006; 19: 24-25.
- 18- Fulda S. Inhibitor of apoptosis proteins in hematological malignancies. *Leukemia*. 2008; 23: 467-76.
- 19- Saha MN, Yang Y, Chang H. Targeting p53 by small molecule p53 activators in multiple myeloma. *J Hematol Oncol*. 2012; 5(Suppl 1): A7.
- 20- Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, et al. MDM2-

HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *The EMBO J.* 2002; 21: 6236-45.

21- Marine J-C, Lozano G. Mdm2-mediated ubiquitylation: p53 and beyond. *Cell Death & Differentiation.* 2009; 17: 93-102.

22- Toledo F, Wahl GM. MDM2 and MDM4: p53 regulators as targets in anticancer therapy. *The international journal of biochemistry & cell biology.* 2007; 39: 1476-82.

23- Kastan MB. Wild-type p53: tumors can't stand it. *Cell.* 2007; 128: 837-40.

24- Saha MN, Jiang H, Mukai A, Chang H. RITA inhibits multiple myeloma cell growth through

induction of p53-mediated caspase-dependent apoptosis and synergistically enhances nutlin-induced cytotoxic responses. *Molecular Cancer Therapeutics.* 2010; 9: 3041-51.

25- Grinkevich VV, Nikulenkova F, Shi Y, Enge M, Bao W, Maljukova A, et al. Ablation of key oncogenic pathways by RITA-reactivated p53 is required for efficient apoptosis. *Cancer Cell.* 2009;15: 441-53.

26- Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nature Reviews Cancer.* 2002; 2: 277-88.

Induction of p53-dependent Apoptosis in pre-B Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line (NALM-6) by Small Molecule RITA

Kiani Nodeh F¹, Manafi Shabestari R¹, Kazemi A¹, Safa M^{1,2}

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

²Cellular and Molecular Research Center, Hematology & Blood Banking Dept, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

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

E-mail: Safa.m@iums.ac.ir

Received: 14 Oct 2014 **Accepted:** 24 Jan 2015

Background and Objective: The use of low-molecular-weight, nonpeptidic molecules that degrade the interaction between the p53 protein and its negative regulator MDM2 (Murine- double minute colon 2) is a new therapeutic strategy for treatment of various types of cancer. One of these agents is RITA (reactivation of p53 and induction of tumor cell apoptosis) which binds to p53 protein and inhibits formation of p53-MDM2 complex while induces apoptosis in tumor cells by increasing p53 protein levels. The aim of this study was to assess the possible in vitro apoptotic effects of RITA on pre-B ALL NALM-6 cells.

Materials and Methods: NALM-6 cells were treated with different concentrations of RITA at different time intervals. The viability of NALM-6 cells and apoptosis was measured by MTT assay and PI staining, respectively. The level of p53, acetylated p53 as well as cleaved PARP and procaspase-3 were determined by Western blot in RITA-treated cells. The results were analyzed using Paired t test.

Results: RITA has cytotoxic effects on NALM-6 cells. Flow cytometry analysis indicated increased apoptotic cells in sub G1 region in treated cells ($P < 0.05$). The Western blot analysis revealed that protein expression levels of p53, and its acetylation increased in response to RITA. In addition, RITA-induced apoptosis associated with activation of caspase-3 and PARP cleavage.

Conclusion: The results of this study showed that RITA induced p53-dependent apoptosis in pre-B ALL NALM-6 cells.

Key words: RITA, p53, MDM2, Apoptosis, ALL