

تغییر بیان ژن *DNMT3A* در لوسمی لنفوبلاستیک حاد نوع B در اثر داروی مرکاپتوپورین

نویسندگان:

طاهره احمدی افزادی^۱، فاطمه پور رجب^۲، سید حسین حکمتی مقدم^{۳*}، علی دهقانی فیروزآبادی^۴، کولان رحمانی^۶

- ۱- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ۲- دانشیار، دکترای بیوشیمی، گروه بیوشیمی و بیولوژی مولکولی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ۳- مرکز تحقیقات خون و سرطان، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ۴- دانشیار، متخصص پاتولوژی، گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ۵- دانشجوی دکترای علوم سلولی کاربردی، مرکز تحقیقات قلب و عروق، دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران
 ۶- کارشناس ارشد بیوشیمی بالینی، گروه بیوشیمی، پردیس بین الملل دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد، یزد، ایران

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

چکیده:

مقدمه: داروهای امروزی درمان لوسمی لنفوبلاستیک حاد (Acute lymphoblastic leukemia, ALL) از جمله مرکاپتوپورین، عوامل مولکولی دخیل در فرآیند ایجاد و پیشرفت این بیماری همچون DNA متیل ترانسفرازها (DNMTs) را به دلیل این که آنزیم‌های یاد شده در متیلاسیون و در نتیجه تنظیم بیان ژن‌های مرتبط با تکثیر سلولی دخیل اند هدف قرار می‌دهند. در مطالعه حاضر اثر داروی مرکاپتوپورین بر بیان ژن *DNMT3A* بررسی شد.

روش کار: مطالعه تحلیلی از نوع قبل و بعد روی هشت کودک مبتلا به ALL نوع B مراجعه کننده به بیمارستان مرکز طبی کودکان تهران به صورت نمونه‌گیری در دسترس در مرحله قبل از دریافت داروی مرکاپتوپورین و دو ماه پس از دریافت دارو و ۱۰ کودک سالم مراجعه کرده به آزمایشگاه مرکزی یزد انجام شد. RNA از نمونه خون‌ها استخراج و اندازه‌گیری بیان ژن *DNMT3A* با روش RT-PCR (واکنش زنجیره‌ای پلیمرز با نسخه‌برداری وارونه) انجام شد.

یافته‌ها: بیان ژن *DNMT3A* در بیماران مبتلا به ALL دریافت کننده مرکاپتوپورین به طور معناداری نسبت به قبل از دریافت دارو بالاتر بود ($P < 0.05$).

نتیجه‌گیری: افزایش بیان این ژن تنظیمی در اثر مصرف داروی مرکاپتوپورین رخ می‌دهد. پس احتمالاً این دارو از راه فرایندهای اپی‌ژنتیک ناشی از افزایش متیلاسیون DNA روی سلول‌های لوسمیک اثر می‌گذارد.

واژگان کلیدی: DNA متیل ترانسفراز 3A، لوسمی لنفوبلاستیک، مرکاپتوپورین، بیان ژن، اپی ژن

Pars J Med Sci 2021;19(1):44-53

مقدمه:

سلولی از جمله عوامل ژنتیکی محسوب می‌شود. تاکنون پنج ایزوفرم برای آنزیم‌های DNMTs در سلول‌های یوکاریوتی شناخته شده است که از بین آن‌ها، سه ایزوفرم *DNMT1*، *DNMT3A*، *DNMT3B* بیشتر در متیلاسیون DNA دخالت دارند. متیل ترانسفرازها باعث انتقال گروه متیل از مولکول S-آدنوزیل-متیونین (SAM) روی کربن ۵ حلقه سیتوزین در توالی‌های تکراری CpG می‌شوند. این توالی‌های تکراری بیشتر در نواحی تنظیمی و پروموتوری ژن‌ها مستقر هستند و متیلاسیون آن‌ها برای

لوسمی حاد شایع‌ترین سرطان اطفال است و در این بین، لوسمی لنفوبلاستیک حاد (acute lymphoblastic leukemia, ALL) نزدیک به ۷۵ درصد موارد را به خود اختصاص می‌دهد. اتیولوژی این بیماری هنوز ناشناخته است. مانند بسیاری از انواع سرطان‌ها، در ALL نیز عوامل ژنتیکی و محیطی هر دو دخیل هستند [۱].

فعالیت آنزیمی DNMT ها (متیل ترانسفرازهای DNA) در تنظیم بیان ژن‌های محرک تکثیر سلولی و ژن‌های سرکوب‌گر تکثیر

* نویسنده مسئول، نشانی: گروه علوم آزمایشگاهی، دانشکده پیراپزشکی، مجتمع امام رضا، بلوار دانشجو، یزد، ایران. کد پستی ۸۹۱۶۱۸۸۶۳۵.
 تلفن همراه: ۰۹۱۳۳۵۱۸۳۱۴؛ تلفن محل کار: ۰۳۵۳۲۳۸۵۰۵، دورنگار: ۰۳۵۳۲۳۸۵۶۱. پست الکترونیکی: shhekmati2002@yahoo.com

پذیرش: ۱۴۰۰/۰۲/۲۸

اصلاح: ۱۴۰۰/۰۳/۲۳

دریافت: ۱۳۹۹/۰۶/۰۵

تنظیم بیان ژن، خاموش کردن آن، غیر فعال کردن کروموزم X و تنظیم بیان آلل‌های والدی سلول‌ها لازم است. تاکید شده است که DNMT1 توالی‌های سمی متیله را در سلول تکثیر شونده متیله کرده و در حفظ الگوی متیلاسیون قبلی و حالت تکثیر شونده سلولی دخالت دارد، درحالی که DNMT3A و DNMT3B در متیلاسیون خود به خودی توالی‌های بدن گروه متیل دخالت داشته و در ایجاد تمایز سلولی و ویژگی بافتی می‌توانند نقش داشته باشند [۳].

هیستون داستیلازها (HDACs) در خاموش شدن ژن‌ها نقش دارند و آنزیم‌های DNA متیل ترانسفراز سبب فراخوانی HDACs و پروتئین‌های مرتبط با آن به نواحی پروموتری می‌شوند، پس به نوعی در بازآرایی ساختار کروماتین نقش دارند. در مقایسه قدرت متیلاسیون DNA و داستیلاسیون هیستون‌ها در خاموش کردن ژن‌ها، متیلاسیون DNA در بالادست داستیلاسیون هیستون‌ها قرار داده شده است و تصور می‌شود که دارای قدرت عملکردی بالاتری نسبت به داستیلاسیون هستند. از این رو، داروهایی که متیلاسیون را مهار می‌کنند، استیلاسیون را هم کاهش می‌دهند، اما عکس آن در حالت کلی درست نیست [۴]. مطالعات اخیر نشان داده است که سلول‌ها در طی رشد و نمو خود از مارکرهای اپی‌ژنتیک هیستونی و سپس از متیلاسیون DNA برای تنظیم بیان ژن‌ها و همچنین از کمپلکس PRC1 (Protein Regulator of Cytokinesis 1) استفاده می‌کنند که حاوی DNMTs است. البته نوع این آنزیم‌ها در ابتدای تمایز با مرحله آخر تمایز با هم فرق دارد. در واقع، در ابتدای رشد از مارکرهای اپی‌ژنتیک وابسته به تکثیر هیستونی بیشتر استفاده شده، اما در مرحله آخر تمایز برای خاموش کردن دائمی ژن‌ها از DNMT‌ها استفاده می‌شود. از طرفی، فعالیت DNMT3A، DNMT3B، DNMT3L در تمایز رویان و شکل‌گیری بافت‌های آن و نیز خاموش شدن یکی از آلل‌های والدی نقش دارند. به هر حال الگوی دقیق فعالیت این آنزیم‌ها از بعد افزایش و یا کاهش بیان تاکنون مشخص نشده است [۲].

تیوپورین‌ها از جمله ۶- تیوگوانین، ۶- مرکاپتوپورین و آزاتیوپورین ترکیباتی هستند که در درمان B-cell ALL مورد استفاده قرار می‌گیرند. ۶- تیوگوانین سبب هایپومتیلاسیون DNA در پروموتور تومورسپرسورها می‌شود که اثر بهتری در بین سایر داروها از خود نشان داده است. به هر حال ساز و کار عمل به طور دقیق شناسایی نشده است، اما در مطالعات نشان داده شده که این دارو از طریق مداخله اپی‌ژنتیکی سبب روشن شدن بیان ژن‌های خاموش شده در سلول‌های سرطانی می‌شود [۵]. درمان لوسمی میلو بلاستیک حاد (AML) شامل دو مرحله: القا و مرحله تثبیت یا به عبارتی درمان فاز پس از حصول پاسخ است. هدف مرحله القا به عنوان

اولین مرحله درمان، رسیدن به بهبودی کامل است که با انجام این گام سرطان خون وارد مرحله فروکشی می‌شود. مرحله تثبیت برای حذف سلول‌های لوسمی غیر فعال باقی مانده بعد از القا و ایجاد طول عمر طولانی‌تر و کاهش عود طراحی شده است. بهبود کامل به معنی وجود کمتر از ۵ درصد بلاست‌ها در مغز استخوان سالم، بیش از ۱۰۰۰ نوتروفیل و ۱۰۰۰۰۰ پلاکت در هر میکرولیتر خون است (۶). هدف ترکیبات جدید در درمان AML انواع فرآیندهای سلولی مثل سیگنالینگ از طریق تیروزین کینازها یا مسیرهای دیگر، تنظیم اپی‌ژنتیک DNA و کروماتین، صدور پروتئین‌های هسته‌ای، و آنتی‌ژن‌هایی که روی سلول‌های خون‌ساز بیان شده‌اند و یا به طور خاص روی سلول‌های بنیادی لوسمی توسط درمان بر پایه آنتی بادی هستند [۷].

خاموش‌سازی و یا فعال‌سازی ژن‌ها در اثر تغییر الگوی متیلاسیون جزایر CpG پروموتور به عنوان یکی از مهم‌ترین ساز و کارهای بروز بدخیمی‌های هماتولوژیک تلقی می‌شود. چندین سال پیش، سه گروه پژوهشی به طور مستقل دریافتند که DNMT3A در مبتلایان به ALL با فراوانی زیادی جهش یافته است [۸]. در علوم بالینی و دارویی با توجه به این که افزایش و یا کاهش بیان این آنزیم‌ها احتمالاً در ایجاد لوسمی و یا پیشرفت بیماری نقش دارند، پیوسته نیاز است تغییرات بیومولکولی در طی فرآیندهای بیولوژیکی به ویژه سرطان و نیز اثر ترکیبات دارویی بر این فرآیندها شناسایی شود. این امر سبب شناسایی عوامل مولکولی دخیل و ترکیباتی با کارایی بهتر روی اهداف مولکولی درون سلولی می‌شود. داروهای مذکور احتمالاً سبب روشن و یا خاموش ماندن CDK‌ها، تومور ساپرسور Rb و یا مولکول‌های مسیر سیگنالینگ سلولی می‌شوند که در پیشروی سرطان موثرند [۵]. با توجه به شیوع بالای لوسمی در بین سرطان‌های شایع در ایران، تحمیل بار مالی زیاد به خانواده‌ها و جامعه و نبود درمان کاملاً قطعی برای آن‌ها، امروزه اهمیت پژوهش در مورد این بیماری و شاخصه‌های ژنتیکی مرتبط با آن مورد توجه قرار گرفته است. بنابر این، در مطالعه حاضر سعی شده است به اثرات داروی مرکاپتوپورین بر بیان ژن DNMT3A به عنوان ژن یکی از ایزوفرم‌های موثر آنزیم DNMT که در ایجاد ALL تاثیرگذار است پرداخته شود.

روش کار:

این مطالعه در سال ۱۳۹۵ به شکل یک بررسی آزمایشگاهی - تحلیلی از نوع قبل و بعد طراحی و اجرا شد. جامعه مورد مطالعه شامل ۸ کودک با سن ۲ تا ۱۲ سال مبتلا به لوسمی لنفوبلاستیک حاد مراجعه کننده به بیمارستان طبی کودکان تهران بود. گروه کنترل شامل ده کودک سالم (۸ پسر و ۲ دختر) مراجعه کننده به آزمایشگاه مرکزی استان یزد بوده که از لحاظ هر نوع بدخیمی یا

نانومتر برای سنجش خلوص اندازه‌گیری شد و غلظت نهایی RNA بر حسب ng/ μ L به دست آمد.

پس از تایید کیفیت نمونه‌های RNA استخراج شده، این نمونه‌ها به نسبت ۱ به ۵ رقیق شدند. سپس ۳ میکرولیتر از هر نمونه RNA با بافر بارگذاری ($6\times$) مخلوط شده و داخل چاهک‌های ژل آگارز ۲ درصد ریخته شدند. پس از انجام الکتروفورز، به وسیله بررسی باندهای ۲۸S و ۱۸S کیفیت RNA استخراج شده تعیین شد (شکل ۱).

از آن جا که نمونه های RNA استخراج شده ممکن است دارای آلودگی DNA ژنومی باشند، برای برطرف نمودن آلودگی DNA ژنومی، از تیمار با آنزیم DNase I استفاده شد. با توجه به نتایج به دست آمده از نانودراپ، ۵ میکروگرم از RNA داخل یک میکروتیوب ۵۰۰ میکرولیتری ریخته و حجم آن توسط آب تیمار شده با DEPC به ۲۶ میکرولیتر رسانده شد. سپس به نمونه RNA، ۳ میکرولیتر بافر آنزیم DNase I ($10\times$) و ۱ میکرولیتر آنزیم DNase I اضافه شد. سایر مراحل نیز طبق پروتکل کیت انجام شد. به منظور مقایسه بیان ژن در سطح mRNA، ابتدا از روش نیمه کمی RT-PCR استفاده شد. به این منظور سعی شد با مقایسه میزان بیان ژن GAPDH در نمونه های RNA سلول های تیمار شده و کنترل، تا حد امکان غلظت cDNA نمونه‌ها همسان شود.

پس از استخراج RNA، سنتز cDNA توسط کیت سیناکلون (ایران) انجام شد. پس از ساخت cDNA از روی RNA های استخراج شده، باید با روشی ژن مورد نظر را به طور کاملاً اختصاصی تکثیر کرد. حجم و غلظت نهایی مواد مورد استفاده در واکنش PCR برای ژن های مورد مطالعه طبق دستورالعمل کیت بود. حجم نهایی واکنش PCR، ۲۵ μ L بود. به منظور تایید پرایمرها و محصولات PCR، پس از استخراج RNA و قطعات ژنی و ژن مرجع GAPDH (بعنوان ژن کنترل داخلی) که با روش رونویسی معکوس cDNA آن ها ساخته شده بود با روش RT-PCR این cDNA ها تکثیر شد و همچنین در این روش کنترل منفی RT نیز برای اطمینان از این که DNA ژنومی در نمونه های RNA، آلودگی ایجاد نکرده باشد به کار گرفته شد و سپس سنتز cDNA انجام گرفت و الکتروفورز بر روی ژل آگارز محصولات انجام شد. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به داخل دستگاه ژل نگار انتقال داده شد. محصول PCR الکتروفورز شده با اشعه UV نظر وجود قطعه DNA مورد نظر بررسی شد. سپس عکس ژل گرفته و ذخیره شد (شکل ۲). میانگین نتایج از سه دفعه انجام هر آزمایش به دست آمده است.

در این تصویر، الکتروفورز محصولات PCR بر روی ژل آگارز دیده می شود. بعد از اتمام الکتروفورز، ژل به داخل دستگاه ژل نگار

بیماری احتمالی تاثیر گذار بر بیان ژن توسط آنکولوژیست، سالم تشخیص داده شده بودند. به علت تعداد اندک نمونه بیماران مبتلا به سرطان لوسمی لنفوبلاستیک حاد از نوع B در یزد، نمونه گیری در تهران انجام شد، ولی بیماران مراجعه کننده به تهران ارجاعی از شهرهای مختلف و از جمله یزد بودند. با توجه به این که آزمایشگاه مرکزی یزد میزبان تعداد زیادی بیمار از شهرستان های مختلف جنوب کشور می باشد، تصمیم بر این شد که جمع آوری نمونه های سالم از این مرکز انجام شود. معیارهای ورود به پژوهش شامل: تشخیص قطعی ALL بر پایه گزارش پاتولوژی و فلوسایتومتری یا ایمونوهیستوکیستری و عدم دریافت هیچ دارو پیش از خون گیری بود. در گروه کنترل نیز سالم بودن فرد بر اساس نتیجه آزمایش های خونی که برای چکاپ درخواست شده بود به انضمام نظر پزشک معالج و پزشک آزمایشگاه به عنوان معیار ورود به مطالعه در نظر گرفته شد. معیارهای خروج برای گروه مورد مرگ یا عدم مراجعه بعدی بود. همه کودکان در مرحله قبل از دریافت داروی مرکاپتوپرین داروی های متوترکسات، وینکریستین، پردنیزولون دریافت می کردند که مدت زمان مصرف داروها و میزان دریافت داروی مرکاپتوپرین برای هر هشت کودک برابر بود. فقدان اثر آن داروهای دیگر بر بیان ژن مورد بررسی قبلاً نشان داده شده است [۲۲].

پس از اخذ کد کمیته اخلاق دانشگاه با شماره Ir.ssu.medicine.rec.1394.200 و رضایت کتبی از والدین کودکان، اطلاعات بیماران همچون سن، جنسیت، زمان تشخیص، یافته های بالینی و آزمایشگاهی هنگام نمونه گیری بر اساس چک لیست ثبت شد. در این پژوهش کلیه موارد اخلاق در پژوهش رعایت شد. نمونه خون از ۱۰ بیمار که بر اساس علائم بالینی و آزمایشگاهی، تشخیص B-cell ALL برای آن ها قطعی شده بود، در فاز قبل از درمان (پیش از دریافت داروی مرکاپتوپرین) گرفته شد. دو ماه پس از دریافت داروی مرکاپتوپرین دوباره نمونه گیری انجام شد. از ده کودک اولیه یک کودک به دلیل فوت و کودک دیگر به دلیل عدم مراجعه مجدد به تهران از مطالعه خارج شدند. از هشت بیمار ۵ mL خون در مرحله پس از درمان با کسب رضایت بر اساس دستورالعمل اخلاق پزشکی بیمارستان تهیه شد.

استخراج RNA تام از سلول های تیمار شده و کنترل با کیت استخراج RNA کمپانی کیاژن (آمریکا) بر طبق پروتکل کیت انجام شد. بعد از استخراج RNA برای انجام مراحل بعدی، نیاز به تعیین کمیت و کیفیت RNA های استخراج شده بود. به منظور تعیین غلظت، نمونه های RNA به وسیله دستگاه نانودراپ آنالیز شدند. جذب نمونه در طول موج های ۲۶۰/۲۸۰ و ۲۶۰/۲۳۰

بررسی شدند. منحنی تکثیر ژن هدف *DNMT3A* و ژن خانه دار *GAPDH* حاصل از real-time PCR نیز تحلیل شد. منحنی‌ها نشان دادند که تکثیر ژن‌ها به خوبی انجام شده است (شکل ۳ و ۴). آزمایش‌ها همگی به شکل سه تایی انجام گرفتند و میانگین داده‌ها ملاک بود.

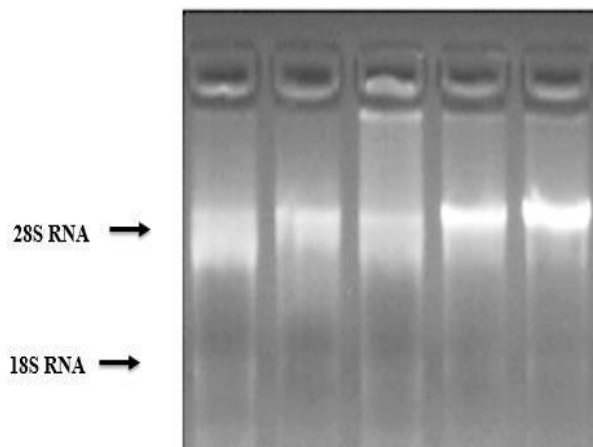
این منحنی‌ها بر اساس دلتا Rn در محور عمودی و cycle در محور افقی توسط دستگاه PCR برای ژن هدف *DNMT3A* و ژن خانه دار *GAPDH* رسم شده که به منظور استخراج چرخه‌های آستانه مورد بررسی قرار می‌گیرند. منحنی تکثیر ژن *GAPDH* به رنگ نارنجی و منحنی تکثیر ژن *DNMT3A* به رنگ بنفش دیده می‌شود.

نمودارهای ذوب برای تایید نهایی محصولات مرتبط با ژن‌ها و به عبارت دیگر برای حصول اطمینان از عدم حضور پرایمر دایمر و یا باندهای غیر اختصاصی به وسیله دستگاه ترموسایکلر ترسیم شده است. در این نمودار منحنی ذوب ژن *GAPDH* به رنگ نارنجی و منحنی ذوب ژن *DNMT3A* به رنگ بنفش دیده می‌شود.

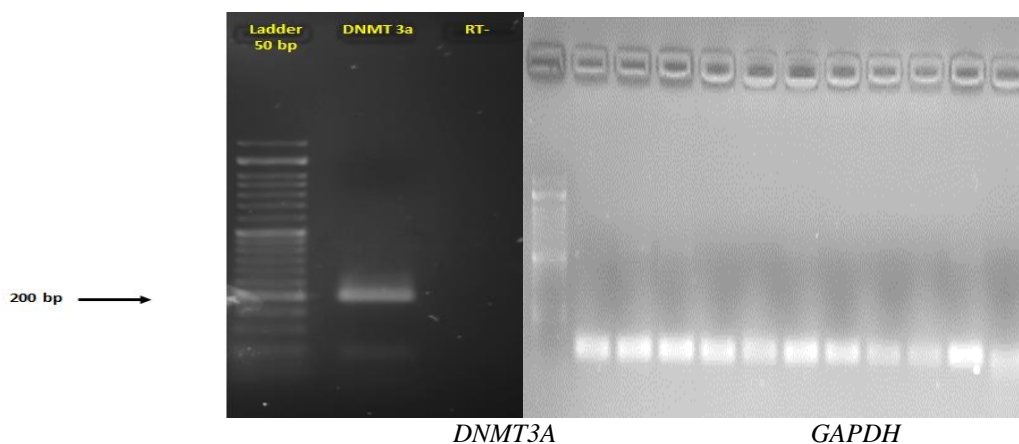
انتقال داده شده، محصول PCR الکتروفورز شده از نظر وجود قطعه DNA مورد نظر با پرتو فرابنفش عکس برداری شد. شکل سمت راست باندهای حاصل از واکنش RT-PCR برای ژن *GAPDH* است. وجود باند منفرد از ژن کنترل داخلی موید حفظ تمامیت در RNA و در نتیجه سنتز شدن cDNA و در نهایت انجام واکنش PCR و مشاهده باند پس از الکتروفورز است. شکل سمت چپ باندهای حاصل از واکنش RT-PCR برای ژن *DNMT3A* است. به منظور اطمینان از عدم حضور آلودگی DNA ژنومی از کنترل منفی RT استفاده شده که در تصویر مشاهده می‌شود. آغازگرهای اختصاصی ژن‌های هدف *DNMT3A* و کنترل داخلی *GAPDH* طراحی شد و یکتا بودن محل اتصال این آغازگرها نیز با نرم افزار BLAST در ژنوم انسان بررسی شد (جدول ۱).

منحنی‌های تکثیر و ذوب:

به منظور حصول اطمینان از عدم ایجاد دایمر پرایمر و یا باندهای غیر اختصاصی، به وسیله دستگاه ترموسایکلر منحنی‌های ذوب



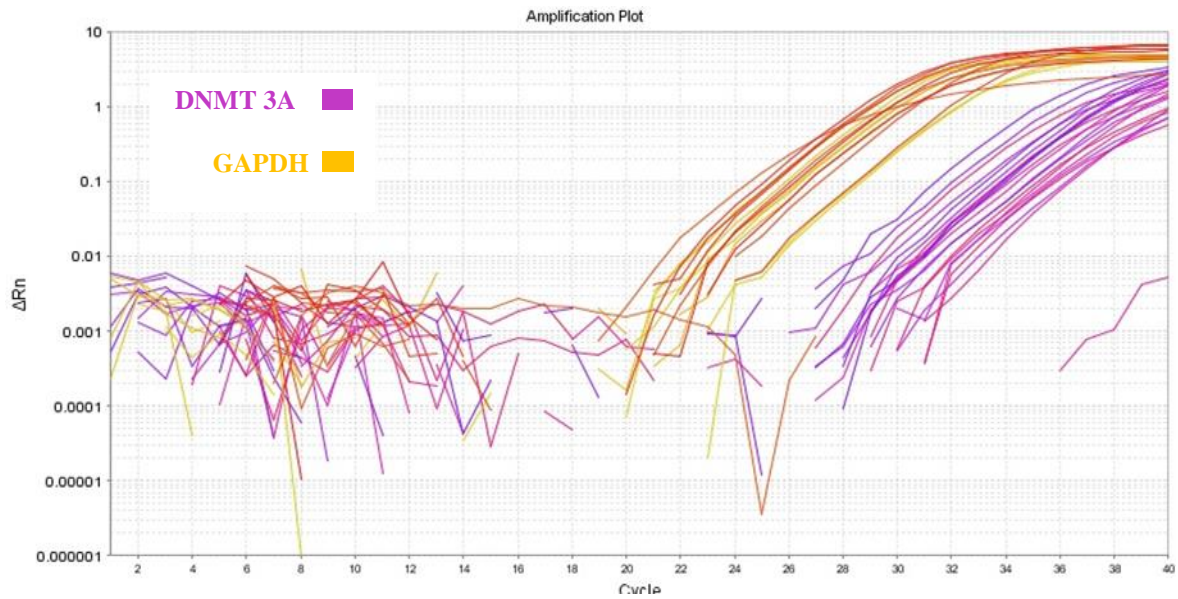
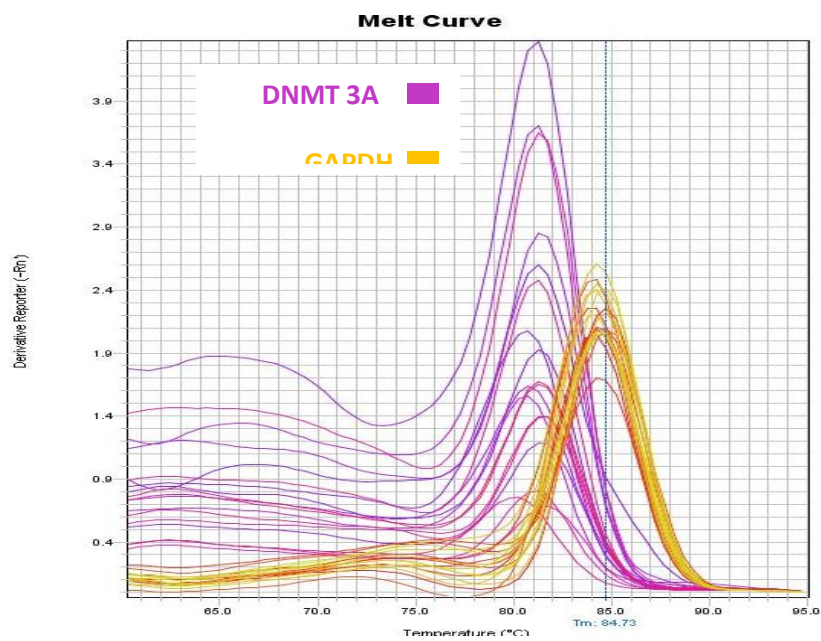
شکل ۱: نتایج الکتروفورز نمونه‌های RNA استخراج شده روی ژل آگارز



شکل ۲: تأیید محصول سنتز شده *DNMT3A* و *GAPDH* و محصولات PCR

جدول ۱: پرایمرها

تعداد سیکل های PCR	طول محصول PCR	توالی آغازگر 5' → 3'	شناسه NCBI	نام ژن
۳۵	۲۰۰ bp	F: CTCCATCGTCAACCCTGCTC R: TCATCACAGGGTTGGACTCG	NM_022552.4	<i>DNMT3A</i>
۳۵	۱۵۰ bp	F: GAGCCACATCGCTCAGACAC R: CATGTAGTTGAGGTCAATGAAGG	NM_001289746.1	<i>GAPDH</i>

شکل ۳. منحنی های تکثیر ژن های *DNMT3A* و *GAPDH*شکل ۴: منحنی های ذوب بعد از مشتق گیری (dF) ژن های *DNMT3A* و *GAPDH*

یافته‌ها:

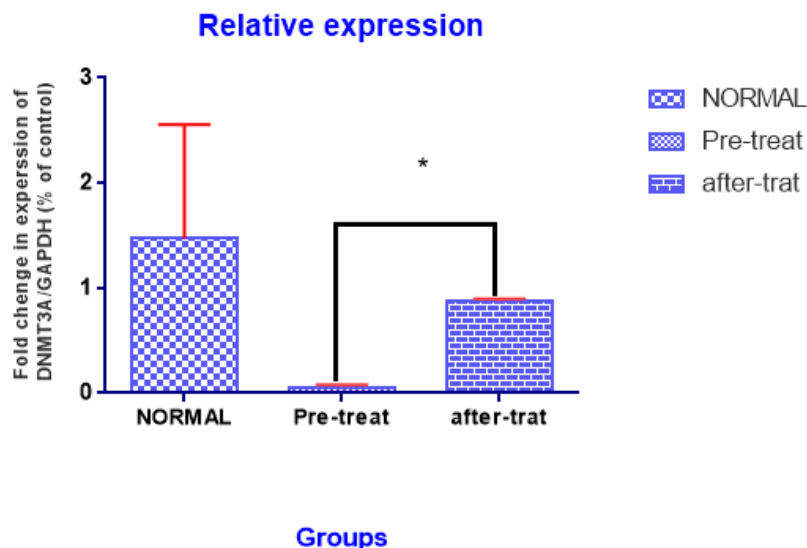
در این مطالعه ۸ کودک ۱۲ - ۲ سال (۴ پسر و ۴ دختر) مبتلا به ALL مورد بررسی قرار گرفتند. از نظر سنی به جز یک کودک همگی زیر ده سال بودند. میانگین سنی بیماران در گروه مورد قبل از درمان $5/1 \pm 3/4$ و برای گروه کنترل با $7/1 \pm 3/8$ بود. با توجه به آزمون t زوجی اختلاف میانگین سنی بین گروه‌های مورد و کنترل معنادار نبود ($P \text{ value} = 0/15$).

مقدار شاخص شاپیرو - ویلک محاسبه شده حاکی از نرمال بودن توزیع داده‌های real-time PCR بود. بنابراین، از آزمون t به منظور مقایسه مقادیر ΔCT بین گروه‌ها قبل از درمان و پس از درمان استفاده شد. نتایج آزمون نشان داد تفاوت معناداری ($P < 0/05$) بین میانگین ΔCT گروه‌ها وجود دارد.

نتایج همچنین نشان داد در بیماران مبتلا به ALL دریافت کننده داروی مرکاپتوپورین، میزان بیان ژن با ضریب اطمینان ۹۵ درصد به طور معناداری نسبت به حالت عدم دریافت دارو بالاتر است ($P < 0/05$) (شکل ۵).

برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از نرم افزار SPSS-15 استفاده شد. برای مقایسه با گروه کنترل از آزمون تحلیل واریانس یک راهه استفاده شد.

همانطور که در این نمودار دیده می‌شود مبتلایان قبل از دریافت دارو دارای مقدار پایینی از بیان ژن *DNMT3A* بوده‌اند (میانگین $0/2$) و داروی مرکاپتوپورین منجر به افزایش قابل توجه بیان این ژن شده است (میانگین $0/8$). همچنین نسبت به افراد گروه کنترل سالم میزان پایین تری از ژن را بیان می‌کنند.



شکل ۵: نتایج بیان ژن *DNMT3A* در کودکان مبتلا به بیماری

بحث:

از آن جا که سرطان یک بیماری تهدید کننده جان انسان‌ها است، پژوهشگران همواره به دنبال یافتن روش‌هایی برای تشخیص به موقع و درمان این بیماری هستند. مطالعه تغییرات رخ داده روی ژنتیک سلول‌ها به وسیله جهش و یا تغییرات اپی‌ژنتیک و عوامل اثر گذار روی آن‌ها یک بعد مهم در پژوهش‌های مولکولی سرطان است. در مطالعه حاضر ۸ کودک با سن ۱۲ - ۲ سال (۴ پسر و ۴ دختر) مبتلا به ALL پیش و پس از درمان با مرکاپتوپورین از نظر میزان بیان ژن *DNMT3A* مورد بررسی قرار گرفته و با ۱۰ کودک سالم مقایسه شدند. یافته‌ها نشان داد به طور معناداری

بیان ژن *DNMT3A* در بیمارانی که با داروی مرکاپتوپورین درمان شده اند نسبت به پیش از درمان بالاتر است.

DNMT3A نقش مهمی در تکامل، تمایز سلول‌های بنیادی همتوپوتیک، خون‌سازی و بدخیمی‌های خونی دارد. نقش موتاسیون *DNMT3A* در سرطان‌های مختلف و به ویژه در سرطان‌های خونی برجسته است. در پژوهشی نقش موتاسیون‌ها در غیرفعال سازی و اختلال در عملکرد این آنزیم در بدخیمی‌های ALL، AML و همچنین سطوح پیشرفته تومورهای سرطانی در تعداد بسیاری از مبتلایان آشکار شده است و نقش سرکوبگری

تومور را برای این آنزیم نشان می‌دهند [۱۱]. در پژوهشی دیگر روی ۵۷ بیمار مبتلا به ALL با موتاسیون در ژن *DNMT3A*، مشخص شد که بقای کلی کمتری از بیماران دارای تیپ وحشی ژن داشته‌اند. این یافته نقش بارز موتاسیون این ژن در توسعه بدخیمی مذکور را نشان می‌دهد [۱۲].

مهار فعالیت DNMTs به طور گسترده‌ای منعکس کننده تغییرات در متیلاسیون DNA است. این تغییرات می‌تواند ناشی از تأثیر داروهای مختلفی از جمله تیوپورین‌ها باشد. در مطالعه انجام شده روی *DNMT3A* مشاهده شد که تیمار با تیوپورین‌ها متیلاسیون ناحیه ژنی *DNMT3A* را افزایش می‌دهد [۱۲]. نتایج ارزیابی چندین رده مختلف سرطان پروستات نیز نشان داد که فعالیت DNMTها دو تا سه برابر در رده‌های سلولی سرطان پروستات افزایش یافته است [۱۴].

اگرچه ساز و کار عمل و نقش *DNMT3A* در وقوع و پیشرفت ALL به طور دقیق مشخص نشده است، ولی بررسی اختلاف میزان بیان آن در مبتلایان و همچنین تأثیر داروهای مختلف بر میزان بیان آنزیم و تکثیر سلول‌های سرطانی حائز اهمیت است که برای پیش آگهی، تشخیص و درمان مناسب‌تر این اختلال می‌تواند بسیار مفید باشد. از جمله داروهای تأثیرگذار بر اسیدهای نوکلئیک تیوپورین‌ها هستند؛ کلاسی از داروهای استفاده شده برای مهار فعالیت نرمال سیستم ایمنی بدن که به عنوان آنتی متابولیت‌های پورینی در درمان بدخیمی‌های خونی به کار برده می‌شوند [۱۴، ۱۵]. تیوپورین‌ها شامل ۶- تیوگوانین، ۶- مرکاپتوپورین و آزاتیوپورین به عنوان داروهای موثر در درمان ALL شناخته شده‌اند. بر اساس برخی از مطالعات این داروها تأثیر اپی‌ژنتیکی دارند. برای نمونه ۶- تیوگوانین سبب روشن شدن بیان ژن‌های خاموش شده اپی‌ژنتیک در سلول‌های سرطانی می‌شود [۱۶].

دارو درمانی در مراحل مختلف این بیماری شامل مرحله القا (یک ماه)، پس از القا (نزدیک به ۶ ماه) و در انتها حفظ و نگهداری درمان (نزدیک به ۱۸ تا ۳۰ ماه) است که در مرحله آخر از داروهایی مانند ۶- مرکاپتو پورین و متوترکسات با غلظت تجویزی مشخص استفاده می‌شود. آنزیم تیو پورین متیل ترانسفراز (TPMT) فرآیند متیلاسیون را بر روی ۶- مرکاپتو پورین انجام می‌دهد و از عوامل مهم در فعالیت این آنزیم پلی مورفیسیم‌های ژنتیکی آن است که بسته به نوع پلی مورفیسیم ممکن است حساسیت و واکنش متفاوتی نسبت به این دارو نشان دهد [۱۷]. از عوامل مهم در تعیین تحمل مرکاپتوپورین در بیماران ALL، گوناگونی ارثی NUDT15 است [۱۸].

بررسی این ژن‌ها در ALL کمتر انجام شده است. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۱۵، با بررسی بیان ژن *DNMT3A* در مبتلایان

بزرگسال ALL، تغییرات در میزان بیان ژن مشخص شد [۱۹، ۲۰]. در مورد لوسمی میلوئید حاد پژوهش‌های بیشتری منتشر شده‌اند. رخداد موتاسیون در *DNMT3A* در مراحل اولیه ایجاد سرطان و شیوع بالای آن در لوسمی میلوئید حاد و به ویژه نقش آن در کم کردن بقای بیماران مبتلا به لوسمی میلوئید حاد توسط دیگران نشان داده شده است [۱۹، ۲۱].

متیلاسیون نامتعارف جزایر CpG پروموتور ژن سرکوب گر تومور p15 با غیرفعال شدن تومور در حداقل نیمی از موارد لوسمی لنفوبلاستیک حاد و لوسمی میلوئیدی حاد ارتباط دارد [۲۲]. در مطالعه ليو و همکاران نشان داده شد که گیرنده پروژسترون نیز به طور گسترده‌ای در لوسمی‌های حاد، CML ها و لنفوماها متیله بوده و بیان چندانی از آن صورت نمی‌گیرد، درحالی که این ژن در سلول‌های خون‌ساز نرمال غیر متیله است. بر خلاف این، ژن Bcl-2 بدون استثنا در همه بیماران CLL سلول B هایومتیله بوده و با افزایش بیان پروتئین Bcl-2 در این بیماران همراه است. این مطالعه پیشنهاد می‌کند که هایپرمتیلاسیون جزایر CpG موجود در پروموتور ژن گیرنده پروژسترون می‌تواند یک نشانگر زیستی مولکولی باشد. شواهد فوق نشان می‌دهد که متیلاسیون DNA نقش بسیار مهمی در لوسمی‌ها بازی کرده و مقدار بیان DNMTها می‌تواند نقش مهمی در پیشروی بیماری داشته باشد [۲۳، ۹].

مطالعه انجام شده توسط شانکوویچ و همکاران در سال ۲۰۱۱ در مورد کارآمدی داروهای آزاسیتیدین و تیوگوانین نشان داد این داروها باعث تغییر بیان DNMTs سلول‌ها می‌شود که در مطالعه حاضر نیز بیان DNMTs متفاوت با یکدیگر بود [۲۴].

در این مطالعه مقایسه نمونه با ژن کنترل بوده و مقدار کمی نسبت به ژن کنترل از طریق کم کردن Ct ژن کنترل از ژن مورد نظر و سپس به صورت تصاعد $2^{-\Delta\Delta Ct}$ بیان شده که بیانگر مقدار افزایش در بیان ژن است.

نتیجه گیری:

نتایج مطالعه حاضر نشان داد که مبتلایان قبل از دریافت دارو دارای مقادیر پایینی از بیان ژن *DNMT3A* بوده‌اند و داروی مرکاپتوپورین منجر به افزایش قابل توجه بیان این ژن شده است. اثرات درمانی مرکاپتوپورین در بیماران ALL ممکن است به دلیل تأثیر بر بیان این ژن در فرایندهای اپی‌ژنتیک باشد. آزمون‌های آماری نشان می‌دهد که بین میزان بیان ژن و مصرف داروی مرکاپتوپورین ارتباط خطی معناداری وجود دارد. از آن جا که میزان بیان این ژن در مبتلایان به ALL تغییر می‌کند و این بر روند پیشرفت و تشدید بیماری اثرگذار است، شاید بتواند به عنوان یک نشانگر زیستی یا یک هدف درمانی مهم برای درمان مبتلایان

بیان سایر ژن‌های مهار شونده احتمالی که تحت تأثیر این دارو است و نیز بیان ژن DNMT3A در دیگر انواع لوسمی بررسی شود.

تعارض منافع:

هیچ گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تشکر و قدردانی:

بدین وسیله از کارکنان بخش خون‌شناسی مرکز طبی کودکان تهران و والدین کودکان که در انجام پژوهش فوق همکاری صمیمانه داشته‌اند تشکر و قدردانی می‌شود.

به ALL با داروی مرکاپتوپرین و دیگر عوامل تاثیرگذار بر بیان این ژن در نظر گرفته شود. شاید این یافته بتواند برای دستیابی به پیش‌آگهی، تشخیص و درمان مناسب‌تر این لوسمی مفید باشد. تعداد اندک نمونه‌های این پژوهش یکی از نقاط ضعف مهم آن است، از این رو، در کاربرد نتایج آن باید دقت لازم معمول داشت، اما انجام چنین مطالعه‌ای با توجه به این که قبلاً انجام نشده است، می‌تواند برای شروع کار مناسب باشد. از نقاط قوت این مطالعه وجود مقالات بی‌شمار در دسترس است. همچنین یکی از نقاط قوت این مطالعه این است که این دسته از داروها بر رده‌های لنفوییدی اثرات بیشتری دارند.

پیشنهاد می‌شود که اثر سایر داروهای دارای خاصیت ضد سرطانی روی ژن‌های DNMT3A بررسی شود. همچنین توصیه می‌شود

References:

- Cooper SL, Brown PA. Treatment of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Clin North Am* 2015; 62 (1): 61-73.
- Schmiegelow K, Nielsen SN, Frandsen TL, Nersting J. Mercaptopurine/methotrexate maintenance therapy of childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical facts and fiction. *J Pediatr Hematol Oncol* 2014; 36: 503-517.
- Gujar H, Weisenberger DJ, Liang G. The roles of human DNA methyltransferases and their isoforms in shaping the epigenome. *Genes* 2019; 10 (2): 172.
- Keil KP, Vezina CM. DNA methylation as a dynamic regulator of development and disease processes: spotlight on the prostate. *Epigenomics* 2015; 7 (3): 413-425.
- Jostes S, Nettersheim D, Schorle H. Epigenetic drugs and their molecular targets in testicular germ cell tumours. *Nat Rev Urol* 2019; 16 (4): 245-259.
- Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *Lancet* 2013; 381 (9865): 484-495.
- DiNardo CD, Cortes JE. New treatment for acute myelogenous leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2015; 16: 95-106.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science* 2013; 339 (6127): 1546-1558.
- Liu Y-n, Zhang N, Wu Y, Yang L, Ding XY, Zhou JF, et al. DNMT3A mutation analysis in adult patients with acute lymphoblastic leukemia. *J Huazhong Uni Sci-Med* 2015; 35: 337-342.
- Eeles RA, Stamps AC. Polymerase chain reaction (PCR): the technique and its applications. Austin: RG Landes; 1993.
- Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *New Engl J Med* 2010; 363 (25): 2424-2433.
- Tatton-Brown K, Seal S, Ruark E, Harmer J, Ramsay E, del Vecchio Duarte S, et al. Mutations in the DNA methyltransferase gene DNMT3A cause an overgrowth syndrome with intellectual disability. *Nat Genet* 2014; 46 (4): 385-388.
- Tzelepi V, Logotheti S, Efstathiou E, Troncoso P, Aparicio A, Sakellakis M, et al. Epigenetics and prostate cancer: defining the timing of DNA methyltransferase deregulation during prostate cancer progression. *Pathology* 2020; 52 (2): 218-227.
- Abedi M, Rahgozar S, Moafi A, Ghaedi K, Moshtaghian SJ, Entezar-e-Ghaem MS, et al. Evaluation of the expression profile of MDR1 gene and assessment of its prognostic value in childhood ALL. *Sci J Iran Blood Transfus Organ* 2014; 10 (4). [Farsi]
- Ahmadi J, Kaviani S, Atashi A. Evaluation of MALAT1 gene expression in AML and ALL cell lines. *Koomesh* 2015; 17 (1). [Persian]
- Gudas LJ. Retinoids induce stem cell differentiation via epigenetic changes. *Semin Cell Dev Biol* 2013; 24 (10-12): 701-705.
- Tanaka Y, Kato M, Hasegawa D, Urayama KY, Nakadate H, Kondoh K, et al. Susceptibility to 6-MP toxicity conferred by a NUDT15 variant in Japanese children with acute lymphoblastic leukaemia. *Brit J Haematol* 2015; 171 (1): 109-115.
- Yang JJ, Landier W, Yang W, Liu C, Hageman L, Cheng C, et al. Inherited NUDT15 variant is a genetic determinant of mercaptopurine intolerance in children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol* 2015; 33 (11): 1235-1242.
- Brunetti L, Gundry MC, Goodell MA. DNMT3A in leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2017; 7: a030320.
- Ribeiro RS, Machado-Neto JA, Campos PDM, Eide CA, Savage SL, Lorand-Metze I, et al. DNMT3A is highly expressed in bone marrow cells from acute myeloid leukemia patients. *Blood* 2017; 130: 3969.
- Gaidzik VI, Weber D, Paschka P, Kaumanns A, Krieger S, Corbacioglu A, et al. DNMT3A mutant transcript levels persist in remission and do not predict outcome in patients with acute myeloid leukemia. *Leukemia* 2018; 32 (1): 30-37.
- Rostamian T, Pourrajab F, Hekmatimoghaddam S. The effect of 6-thioguanine on proliferation, viability and expression of the genes DNMT 3A, DNMT 3B

- and HDAC3 in lymphoid cancer cell line Nalm6. Iran J Pediatr Hematol Oncol 2019; 10 (1): 28-37.
23. Dexheimer GM, Alves J, Reckziegel L, Lazzaretti G, Abujamra AL. DNA methylation events as markers for diagnosis and management of acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. Dis Markers 2017; ID 5472893: 1-14.
24. Shaknovich R, Cerchiatti L, Tsikitas L, Kormaksson M, De S, Figueroa ME, et al. DNA methyltransferase 1 and DNA methylation patterning contribute to germinal center B-cell differentiation. Blood 2011; 118(13): 3559-3569.

Altered expression of *DNMT3A* gene in B-cell acute lymphoblastic leukemia by mercaptopurine

Tahereh Ahmadi Afzadi¹, Fatemeh Pourrajab², Seyedhossein Hekmatimoghaddam^{3,4*}
Ali Dehghani Firoozabadi⁵, Kolan Rahmani⁶

Received: 2020.08.26

Revised: 2021.06.13

Accepted: 2021.05.18

1. MSc in Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
2. Associate Professor of Biochemistry, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
3. Hematology and Oncology Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
4. Associate Professor of Pathology, Department of Laboratory Sciences, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran
5. Applied Cell Sciences PhD Candidate, Yazd Cardiovascular Research Center, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran
6. MSc in Clinical Biochemistry, Department of Biochemistry, International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Science, Yazd, Iran

Pars Journal of Medical Sciences, Vol.19, No.1, Spring 2021

Pars J Med Sci 2021;19(1):44-53

Abstract:

Introduction:

Current medications used for acute lymphoblastic leukemia (ALL) such as mercaptopurine target molecular factors involved in its onset and progression including DNA methyltransferases (DNMTs) because these enzymes are implicated in methylation and therefore expression of genes which are related to cell proliferation. This study evaluated the effect of mercaptopurine on the *DNMT3A* gene expression.

Materials and Methods:

The study was an analytical study of before and after type, performed on 8 children with B-cell ALL referred to children's medical center of Tehran enrolled by convenience sampling. Their blood samples were taken in pre-treatment phase as well as 2 months after treatment with mercaptopurine. Ten healthy children referred to Yazd central medical laboratory were also sampled. RNA was extracted from the blood samples, and *DNMT3A* gene expression was measured by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results:

DNMT3A gene expression in patients with B-cell ALL who received mercaptopurine was significantly higher compared with pre-treatment time ($P < 0.05$).

Conclusion:

Increased expression of this regulatory gene occurred due to drug mercaptopurine. So, the mechanism of action of this drug may be through epigenetic processes due to higher methylation of DNA in leukemic cells.

Keywords: *DNMT3A*, Epigenesis, Gene Expression, Leukemia, lymphoid, 6-mercaptopurine

* Corresponding author Email: shhekmati2002@yahoo.com