تأثير الثيموكينون على الوراثة اللاجينية لخلايا سرطان الدم

تقديم

أسماء أحمد سعيد الغامدي

إشراف

د. هاني محمد زبير شودري

أ.د. محمد حسن محمد قاري

كلية العلوم

جامعة الملك عبدالعزيز

جدة-المملكة العربية السعودية

رمضان ١٤٤٠ – مايو ٢٠١٩

المستخلص

الثيموكينون (TQ) ، مركب مضاد للسرطان مستخلص من زيت حبة البركة. السرطان يعتبر من أكثر الأمراض المهدده للحياة. إن إعادة برمجة العمليات الأيضية للخلايا السرطانية هي السمة المميزة للخلايا السرطانية. تأثير مركب الثيموكينون على التغيرات الأيضية في الخلايا السرطانية لم يتم دراسة بشكل كافي. الهدف من دراستنا تقييم النشاط المضاد للسرطان من الثيموكينون على خطوط خلايا سرطان الدم المختلفة و لتعزيز فهم عملية التمثيل الغذائي لخط خلية سرطان الدم باستخدام تحليلLC / MS-MS و لتحديد تأثير الثيموكينون على المسار الأيضي والمركبات الأيضية و التحقق من صحة التعبير الجيني لـ DNMT1 و DNMT3A و DNMT3B و TET1 و TET2 و TET3 . في دراستنا استخدمنا خط خلايا جوركات كنموذج لخلايا سرطان الدم التائية الحادة للإنسان ، وخط خلايا HL-60 كنموذج لخلايا سرطان الدم الحلقية البشرية الحادة وخط خلايا K-562 كنموذج لخط خلية كريات الدم الحمراء المستمدة من سرطان الدم النخاعي المزمن. تم زراعة جميع خلايا سرطان الدم في المختبر وتم علاج الخلايا مع الثيموكينون مع ٥ مايكرو مولار و ١٠ مايكرو مولار. تم دراسة بقاء الخلية بواسطة التريبان الأزرق. تم تقييم تكاثر الخلايا بواسطة مقايسة WST-1 . ثم تم تحديد موت الخلية ودورة الخلية باستخدام التدفق الخلوي. تم تحليل مورفولوجية الخلايا عن بواسطة كاشف Giemsa. تم فحص العديد من التعبيرات الجينية ذات الصلة بالتمثيل الغذائي وعلم التخلق بما في ذلك DNMT1 و DNMT3A و DNMT3B و TET1و TET2 و TET3 وتم تقييمها والتحقق من صحتها باستخدام RT-PCR . درسنا الأيض غير المستهدف في خلايا جوركات و HL-60 والتغيير في مسار الأيض الخاصة بهم أثناء العلاج بالثيموكينون. أظهرت البيانات الحالية أن الثيموكينون له أثار مضادة للتكاثر على خلايا سرطان الدم كما تم الكشف عنها بواسطة التريبان الأزرق و WST-1 . من ناحية أخرى ، أظهر ٣٣٥ مستقلب مستويات متباينة في خطوط الخلايا HL-60 و .Jurkat تم إجراء تحليل المسار وتحليل الأنتولوجيات باستخدام تحليل السيليكو. في المقام الأول ، كانت هناك زيادة كبيرة في ثيمين جليكول ، المستقلب المعروف أنه يسبب تلف الحمض النووي. في وقت واحد ، لوحظ انخفاض حاد في مستويات الجوانين الخلوية ، مما يشير بوضوح إلى التناوب في استقلاب النوكليوتيدات. بالإضافة إلى ذلك ، كان مستوى ألفا كيتوجلوتارات هو الانخفاض في كلا الخطوط الخلوية. علاوة على ذلك ، تم العثور على انخفاض في تراكم المواد الأيضية لحمض الفومارات وحمل النخيل ، والتي تشارك في بقاء الخلية.

علاوة على ذلك، تم تقيم التعبير الجيني للجينات التي لها علاقة بالتمثيل الغذائي و علم التخلق. تم إستخلاص الحمض النووي الرايبوزي بعد زراعة خلايا سرطان الدم و معالجتها بالثيموكينون. مستوى TET1 AND TET3 أعلى في خلايا Jurkat

and K-562 لكن في خلايا HL-60 لا يوجد تغيير كبير. DNMT3A and DNMTA3B أعلى في جميع خلايا سرطان الدم.

لقد أثبت بحثنا أن الثيموكينون يحارب المرض بما في ذلك الأورام. الثيموكينون الذي أثبت فعاليته كمضاد للسرطان ويلعب دورًا في الوقاية. أظهرت دراستنا لأول مرة المشهد الأيضي للخلايا السرطانية من خلال علاج بالثيموكينون في قمع سرطان الدم البشري. أثبت الثيموكينون إنه يغير في أيض النوكليوتيدات في المقام الأول ويعزز الأيضات المشاركة في الأضرار الجينية وموت الخلية في نهاية المطاف. و أثبتت الدراسة أن مركب الثيموكينون يقلل من عدد الخلايا السرطانية بشكل كبير $P < 0.05$ عند إستخدامه على جميع أنواع الخلايا المستنخدمة في الدراسة.

Effect of Thymoquinone on Epigenetic of Leukemia Cells

By

Asma Ahmed Saeed AlGhamdi

Supervised By

Dr. Hani Mohammed Zubair Choudhry

Prof. Mohamed Hasan Mohammad Qari

FACULTY OF SCIENCE

KING ABDULAZIZ UNIVERSITY

JEDDAH – SAUDI ARABIA

RAMADAN 1440 H – MAY 2019 G

Abstract

Thymoquinone (TQ), an anticancer compound extracted from nigella sativa oil. Cancer is life threatening disease. Reprogramming of cancer cell metabolism is key regulatory in hallmark of cancer. The development of metabolic changes in cancer cell and effect of TQ alter metabolic signature is not well studied. The aim of our study evaluates anti-cancer activity of thymoquinone on different leukemia cell lines, to advance the understanding of the metabolism of leukemia cell line using LC/MS-MS analysis, to identify the differences effect of Thymoquinone on metabolic pathway and compound and gene expression validation for DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2, and TET3 with TQ. In our study we used Jurkat cell line as a model of Acute human T cell leukemia cells, HL-60 cell line as a model of Acute human promyelocytic leukemia cells and K-562 cell line as a model of an erythroleukemia cell line derived from a chronic myeloid leukemia patient. All leukemic cells were cultured in vitro and treated with 5 µM and 10 µM of TQ. The cell viability was measurement by trypan blue. Cell proliferation was evaluated by the WST-1 assay. Cell death and cell cycle was determined using flow cytometry. Morphology analysis stained with Giemsa stain reagents. Several signaling genes expressions were investigated of metabolic and epigenetics including DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 and TET3 were evaluated and validated using RT-PCR. We studied untargeted metabolome of Jurkat and HL-60 and alteration in their metabolic pathway during TQ treatment. The present data demonstrated that TQ anti-proliferative effects on leukemic cells as detected by the trypan blue and WST-1 assay. On the other hand, 335 metabolites showed alternated levels in HL-60 and Jurkat cell lines. Pathway analysis and metabolites ontology analysis was performed using in silico analysis. Primarily, there was a dramatic increase in Thymine Glycol, a metabolite known to induce DNA damage.

Simultaneously, sharp decrease was observed in cellular guanine levels, clearly suggesting alternation in nucleotide metabolism. In addition, α-ketoglutarate level was decrease is in both cell lines. Further, reduced accumulation of metabolites was found for fumarate and palmitic acid, which are involved in cell survival.

Moreover, gene expression of number metabolic and epigenetics related genes including DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, TET1, TET2 and TET3 were evaluated and validated using RT-PCR. All leukemic cells were cultured and treated by TQ. Then, cells were collected for RNA isolation. The level of TET1 and TET3 is higher in all Jurkat and K-562 but in HL-60 there is no significant change. DNMT3A and DNMT3B were significantly higher during TQ treatment in all cell lines.

Our research has proven that Thymoquinone fight disease including tumors. TQ, which has proven to be effective as anti-cancer and plays a role in prevention. Our study for the first time showed the metabolic landscape of cancer cells during TQ treatment in suppressing human leukemia. TQ alters primarily nucleotide metabolism and promotes metabolites involved in genomic damage and ultimately cell death. TQ significantly recuses $P<0.05$ number of cancer cells in all cell types.