ترجمه فا
TarjomeFa.Com

ارائه شده توسط:

سایت ترجمه فا

مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده

از نشریات معتبر

بیان ژن مرتبط با سلول بنیادی سرطان به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای پاسخ به ایمی پریدن ONC201 رده اولی در تومورهای جامد

چکیده

سلول‌های بنیادی سرطان (CSCs) با عود، متاستاز و بقا ضعیف در مطالعات بالینی مرتبط هستند. نتایج امیدبخش به دست آمده از کارآزمایی‌های بالینی مهارکننده‌های CSC، CSCsها را به عنوان اهداف درمانی تایید کرده است. ONC201 یک مولکول کوچک ایمی پریدن رده اولی، در کارآزمایی‌های بالینی I/II برای سرطان پیشرفته می‌باشد. ما قبلا نشان داده بودیم که ONC201، خود نوزایی CSCsهای کلورکتال مقاوم به شیمی درمانی را توسط مهار Akt/ERK و القا DR5/TRIL هدف می‌گیرد. در این مطالعه، ما نشان دادیم که اثرات ضد ONC201 CSC شامل تغییرات اولیه در بیان ژن مرتبط با سلول بنیادی قبل از القا مرگ سلولی تومور می‌باشد. یک آنالیز شبکه‌ی هدفمند از پروفایل بیان ژن در سلول‌های سرطان کلورکتال نشان داد که ONC201، مسیرهای سلول بنیادی مانند سیگنالینگ Wnt را دچار فروتنظیمی می‌کند و ژن‌هایی که مسئول تنظیم خود نوزایی (ID1, ID2, ID3 و ALDH7A1) در سرطان کلورکتال و پروستات و گلیوبلاستوما هستند را تعدیل می-کند. تغییرات میانجی گری شده با ONC201 در بیان ژن مرتبط با CSC، در سطح RNA و پروتئین برای هر نوع سلولی تایید شده است. از این رو، ما مهار خود نوزایی و مارکرهای CSC را در رده‌ی سلولی سرطان پروستات و سلول‌های گلیوبلاستومای گرفته شده از بیمار به محض تیمار با ONC201 مشاهده کردیم. به طرز قابل توجهی، تقلیل CSC میانجی گری شده با ONC201 در سلول‌های سرطان کلورکتال که به ONC201 مقاوم شده بودند، رخ نداده بود. در نهایت، ما مشاهده کردیم که بیان پایه‌ی ژن‌های مرتبط با CSC (ID1,CD44.HES7 و TCF3) به طور معنی داری با اثربخشی ONC201 در بیشتر از ۱۰۰۰ رده‌ی سلولی سرطان مرتبط می‌باشد و ترکیب بیان چندین ژن موجب ایجاد یک پیش گویی کلی قوی‌تر شده بود. این مطالعات اثبات ایده، یک منطقی را برای تست بیان CSC در سطح RNA و پروتئین به عنوان یک بیومارکر پیش گو و فارماکودینامیک برای پاسخ ONC201 در مطالعات بالینی در حال پیشرفت فراهم کرده است.

مقدمه

چندین مطالعه‌ی بالینی ارتباط سلول‌های بنیادی سرطان (CSCs) با عود، متاستاز و بقا ضعیف در تومورهای جامد را اثبات کرده‌اند (۳-۱). پاسخ‌های عینی اخیر مشاهده شده در فاز I/II کارآزمایی‌های بالینی عوامل مختلف هدف گیرنده‌ی CSC در یک تعدادی از تووِرهای جامد پیشرفته‌ی مقاوم، اهمیت CSCsها را به عنوان یک عامل درمانی، بیشتر از پیش تایید کرده است (۶-۴).

مولکول‌های کوچک رده اولی ایمیپریدن ONC201، اخیرا در فاز I/II کارآزمایی‌های بالینی برای سرطان پیشرفته قرار دارند (۷). اولین مطالعه‌ی فاز I انسانی در تومورهای جامد پیشرفته، ONC201 را ایمن اثبات کرده است و فارماکوکینتیک پیش گویی شده را نشان داده است، فارماکودینامیک و کوچک شدن تومور را تقویت کرده است (۸). اثربخشی ضد CSC ONC201، قبلا در محیط in vitro و in vivo در سرطان کلورکتال و لوسمی میلوئیدی حاد (AML) اثبات شده بود (۱۰-۹). کاهش میانجی گری شده با ONC201 در CSCsهای کلورکتال مقاوم به شیمی درمانی شامل غیرفعال کردن همزمان سیگنالینگ Akt و ERK می‌باشد که منجر به فعال شدن فاکتور رونویسی Foxo3 می‌شود که آن‌هم به نوبه‌ی خود موجب مهار وابسته به DR5/TRAIL خود نوزایی می‌شود (۱۱،۹). در مطالعه‌ی اخیر، ما ارزیابی کردیم که آیا اثرات ضد CSC ONC201 شامل تغییرات اولیه در بیان ژن مرتبط با سلول بنیادی قبل از مرگ سلولی تومور می‌شود یا خیر. ما بررسی کردیم که آیا مهار CSCs میانجی گری شده با ONC201 قابل بسط به سایر تومورها هم می‌باشد یا نه. به علاوه، ما تست کردیم که آیا بیان CSC می‌تواند به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای پاسخ ONC201 به خدمت گرفته شود یا خیر.

مواد و روش‌ها

کشت سلولی و معرف‌ها

سلول‌های HCT116p53-/- به لطف دکتر برت ووگلستین از دانشگاه جان هاپکینز تهیه شدند. سلول‌های RKO مقاوم به ONC201قبلا در آزمایشگاه ما در ۲۰۱۲-۲۰۱۳ تولید شده بودند (۱۲). همه‌ی رده‌های سلولی دیگر از کلکسیون کشت گونه‌ی آمریکایی به دست آمدند و همانطوری که قبلا توصیف شده بود کشت داده شدند

(۱۱،۱۲). سلول‌ها هر ماه توسط مشاهده‌ی رشد و خصوصیات مورفولوژیک تایید شدند. ONC201 توسط موسسه‌ی انکوکیوتیک (داروی سرطان) فراهم شد.

کشت توموروسفر

توموروسفرها همانطوری که قبلا توصیف شده بود، (۹) تحت شرایط رشد غیر چسبنده در پلیت‌های با چسبندگی پایین اولترا (کورنینگ) با استفاده از محیط کشت انسانی ماموکالت (تکنولوژی‌های سلول بنیادی) طبق پروتکل کارخانه کشت داده شدند. سلول‌ها (۱۰۰۰ – ۲۰۰۰۰ در هر ول) روی محیط کشت حاوی DMSO یا ONC201 سید شدند. کولونوسفرهای به اندازه‌ی بیشتر از ۶۰ میکرومتر شمارش شدند.

سلول‌های گلیوبلاستومای گرفته شده از بیماران

۴ رده با استفاده از کشت نوروسفر از گلیوبلاستوماهای درمان نشده (GBM8. GBM18) و عود کننده (GBM67R و GBM152) به دست آمدند. تست‌های بقا سلولی با استفاده از غلظت‌های مشخصی از ONC201 اجرا شد و مقادیر IC50 محاسبه شدند.

پروفایل بیان ژن و آنالیز شبکه

پروفایلینگ بیان ژن HCT116، RKO و سلول‌های RKO مقاوم به ONC201 با تیمار DMSO یا ONC201 برای نقاط زمانی مشخص شده در مطالعات قبلی انجام شد و داده‌های به دست آمده از این مطالعات میکروواری در Omnibus بیان ژن NCBI قرار داده شد (۱۱،۱۲). برای آنالیز شبکه‌ی تغییرات رونویسی مرتبط با سلول بنیادی القا شده توسط ONC201، مجموعه‌ی داده‌ها با نرم افزار آنالیز مسیر Ingenuity آنالیز شد.

RT-PCR کمی (qRT-PCR)

RNA کل با استفاده از کیت MiniPrep کوئیک - RNA (تحقیقات زیمو، ایروین، CA) جداسازی شد. ۵ میکروگرم از RNA کل از هر نمونه، در معرض سنتز cDNA با استفاده از کیت رونوشت بردار معکوس سوپراسکریپت III قرار گرفت (فناوری‌های زندگی، جزیره‌ی بزرگ، NY). بیان نسبی گزارش شده‌ی مارکرهای سلول بنیادی با استفاده از PCR ریل تایم که روی سیستم ریل تایم PCR سریع 7900HT بیوسیستم‌های کاربردی انجام شده بود، تعیین شد. هر نمونه‌ی cDNA با استفاده از پاور سایبر گرین (بیوسیستم‌های کاربردی CA) تکثیر شد. به طور خلاصه، شرایط واکنش شامل ۰,۴ میکرولیتر از cDNA و ۰,۲ میکرومولار از پرایمرها در

یک حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر از مخلوط qPCR بود. هر سیکل شامل دناتوراسیون در ۹۵ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه، آنیلینگ در ۶۰ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه و طویل شدن در ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱ دقیقه بود. هر سیکل توسط منحنی‌های افتراق برای هر نمونه دنبال شد. پرایمرها برای مارکرها در جدول S1 فهرست شده است. GAPDH به عنوان یک کنترل درون زاد برای نرمال سازی هر نمونه مورد استفاده قرار گرفت. حداقل دو آزمایش مستقل مختلف برای هر نتیجه اجرا شد و هر آزمایش سه بار تکرار شد.

وسترن بلات

وسترن بلات همانطوری که قبلا توصیف شده بود انجام شد (۹،۱۱،۱۲). آنتی بادی‌های زیر مورد استفاده قرار گرفتند: CD44 (سیگنالینگ سلولی)، ALDH (BD)، IDI (سانتا کروز)، ID2 (سانتا کروز)، ID3 (سانتا کروز) CD133 (بیوتکنولوژی سانتا کروز)، WNT16 (BD) و Ran (BD). پراکسیداز horse radish (ریشه خردل) لیبل شده با آنتی بادی‌های ثانویه از پیرس تهیه شد.

داده‌های آنالیز بیان ژن به دست آمده از ژنومیک حساسیت دارو در تست رده سلولی (GDSC) سرطان

تست‌های بقا سلولی با رده‌های سلولی GDSC (۱۰۰ رده‌ی سلول سرطان انسانی) در ۷۲ ساعت بعداز تیمار با ONC201 به منظور تولید منحنی‌های پاسخ دوز در غلظت‌هایی از ۷۸ نانومولار تا ۲۰ میکرومولار همانطور که قبلا توصیف شده بود، انجام شد (۷). داده‌های بیان ژن، از پروژه‌ی رده‌های سلولی COSMIC با استفاده از یک پلت فرم آرایه‌ی U219 ژنوم انسانی affymetrix دانلود شد. رده‌های سلولی GDSC در گروه‌های با بیان پایین و بالا، به ترتیب بر اساس یک امتیاز کات آف Z ۱- و ۱ جداسازی شدند. داده‌ها برای ایجاد IC50 آنالیز شدند. یک تست کولموگروف – اسمیرنوف (با استفاده از روش تست ks در زبان برنامه نویسی R) برای تست معنی داری آماری توسط آمار D همراه، برای سنجش درجه‌ی جدایی بین این دو گروه مورد استفاده قرار گرفت.

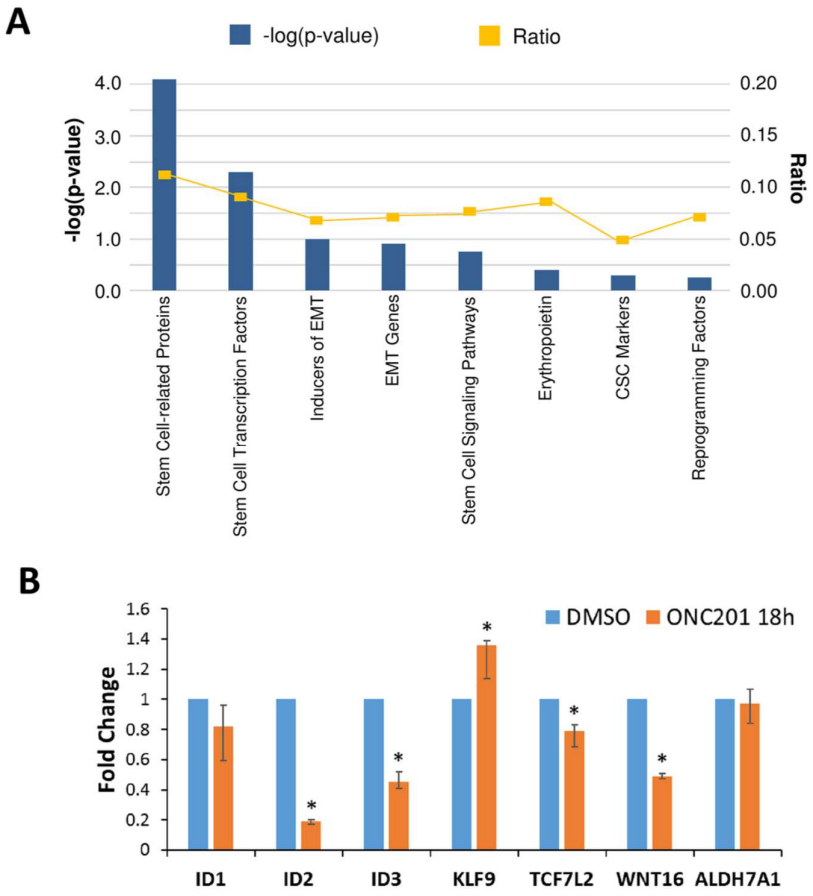
سایر آنالیزهای آماری

داده‌ها به صورت میانگین ± انحراف استاندارد یا خطای استاندارد میانگین از حداقل ۳ تکرار ارائه شده‌اند. T تست دو دنباله‌ای دانش آموزی در محیط اکسل (میکروسافت) برای آنالیز دوجفتی مورد استفاده قرار گرفت. تغییرات آماری معنی دار (*) در اشکال توسط p-valueها نشان داده شده است.

نتایج

ONC201 بیان ژن مرتبط با سلول‌های بنیادی را تنظیم می‌کند

یک آنالیز شبکه‌ی هدفمند از پروفایل‌های بیان ژن سلول‌های سرطان کولون انسانی بدون HCT116 p53 تیمار شده با ONC201 (۱۸ ساعت و ۴۸ ساعت) نشان داد که چندین ژن مرتبط با سلول بنیادی، فاکتورهای رونویسی و مسیرهای سیگنالینگ به طور معنی داری توسط این ترکیب تنظیم می‌شوند (شکل 1A و جداول S2-S4). به طور اختصاصی، سطوح ID1 mRNA (تنظیم CSC گلیوبلاستوما / کولون (۱۳)، ۲,۵ مرتبه)، ID2 (تنظیم سلول بنیادی گلیوما (۱۳)، ۳,۲ مرتبه)، ID3 (تنظیم CSC گلیوما / کولون (۱۳)، ۲,۹ مرتبه)، ALDH7A1 (متاستاز / مارکر CSC پروستات (۱۴)، ۲ مرتبه) به طور معنی داری دچار فروتنظیمی شده بود و KLF9 (مهار کننده‌ی سلول بنیادی گلیوبلاستوما (۱۵)، ۱,۵ مرتبه) به طور معنی داری در سلول‌های تهی از HCT116 p53 به محض ۴۸ ساعت بعداز تیمار با ONC201 دچار فراتنظیمی شده بود (جدول ۱)، که شاخصی از اثرات بالقوه‌ی ضد CSC در این تومورهای جامد می‌باشد.



شکل ۱. ONC201، بیان ژن مرتبط با سلول بنیادی را تنظیم می‌کند. (A) خلاصه‌ای از آنالیز شبکه‌ی هدفمند تغییرات مرتبط در سلول بنیادی در سلول‌های بدون HCT116p53 تیمار شده با ONC201 (۱۰ میکرومولار) توسط آنالیز مسیر ingenuity. log (p-value) برای هر گروهی از ژن‌ها نشان داده شده است. نسبت، نشان دهنده‌ی تعداد نسبی ژن‌هایی می‌باشد که به طور معنی داری به محض تیمار با ONC201 در مقایسه با تعداد کل ژن‌ها در گروه، تغییر پیدا کرده بود. (B) qRT-PCR برای ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی در سلول‌های بدون HCT116 p53 تیمار شده با DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار، ۱۸ ساعت / ۴۸ ساعت، n=3). * نشان دهنده‌ی $p < 0.02$ نسبت به DMSO می‌باشد.

جدول ۱. تغییرات مرتبط با مسیر Wnt و CSC میانجی گری شده با ONC201 در بیان ژن.

Gene	Fold change	mRNA Level	P value	CSC function
ALDH7A1	2.002995	down	3.16E-03	Prostate CSC marker
ID1	2.518517	down	5.85E-04	Colorectal/glioblastoma CSC-related protein
ID2	3.2357852	down	8.49E-05	Glioma stem cell-related protein
ID3	2.884441	down	1.05E-03	Colorectal/glioma CSC-related protein
KLF9	1.542067	up	4.88E-03	Glioblastoma stem cell-related protein
WNT16	13.495952	down	1.98E-03	Prostate Cancer Resistance, HSC regulation
Gene	**Fold change**	**mRNA Level**	**P value**	**Wnt pathway function**
WNT16	13.495952	down	1.98E-03	Ligand
FZD2	2.989978	down	8.61E-04	Receptor
FZD4	3.9322994	down	1.38E-03	Receptor
TCF7L2	3.5501168	down	5.11E-03	Transcription factor

تغییرات القا شده با داروی مرتبط با مسیر Wnt و CSC توسط آنالیز مسیر ingenuity برای پروفایل‌های بیان ژن سلول‌های بدون HCT116 p53 با ONC201 (۱۰ میکرومولار) به مدت ۴۸ ساعت، شناسایی شد. تغییر دفعات نسبت به سلول‌های تیمار شده با DMSO.

همچنین سطوح mRNA ژن‌های مرتبط با مسیر Wnt مانند لیگاند WNT16 (سلول‌های بنیادی خون ساز (۱۶) / ژن‌های مرتبط با مقاومت به سرطان پروستات (۱۷)، ۱۳,۵ مرتبه)، رسپتورهای FZD2 (تنظیم کننده‌ی انتقال اپیتلیالی – مزانشیمی (EMT) / متاستاز سرطان کولون (۱۸)، ۲,۹۸ مرتبه)، FZD4 (ریشه‌ی گلیوما (۱۹) ۳,۹ مرتبه) و فاکتور رونویسی TCF7L2 (تمایز سلول بنیادی (۲۰)، ۳,۵۵ مرتبه) به طور معنی داری دچار فروتنظیمی شده بود (جدول ۱). ژن‌های درگیر در سیگنالینگ Wnt، سیگنالینگ Hedgehog و همه‌توانی سلول‌های بنیادی به طور معنی داری در ۱۸ ساعت اولیه‌ی تیمار با ONC201 تعدیل شده بود (جدول ۲ و جدول S4). سپس تعدیل رونویسی مرتبط با سلول بنیادی در سلول‌های سرطان کلورکتال RKO به محض تیمار

با ONC201 تایید شد (۴۸ ساعت) (جدول ۲ و جدول S5). تایید با qRT-PCR نشان داد که سطوح mRNA ID2، ID3، TCF7L2، WNT16 به طور معنی داری دچار فروتنظیمی شده بود در حالی که KLF9 mRNA به طور معنی داری در پاسخ به تیمار ONC201 (۱۸ ساعت) در سلول‌های بدون HCT116 p53 دچار فراتنظیمی شده بود (شکل 1B).

به وضوح، ONC201 به طور اختصاصی، رونویسی مرتبط با سلول‌های بنیادی را در نقاط زمانی (۱۸ و ۴۸ ساعت) که جلوتر از مرگ سلولی هستند و بعداز ۴۸ ساعت در سلول‌های تومور جامد رخ می‌دهند را تحت تاثیر قرار می‌دهند (۱۱). این اثرات اولیه روی رونویسی مرتبط با سلول بنیادی توسط مهار مارکرهای CSC و خود نوزایی توسط ONC201 در ۷۲-۴۸ ساعت دنبال شد (۹).

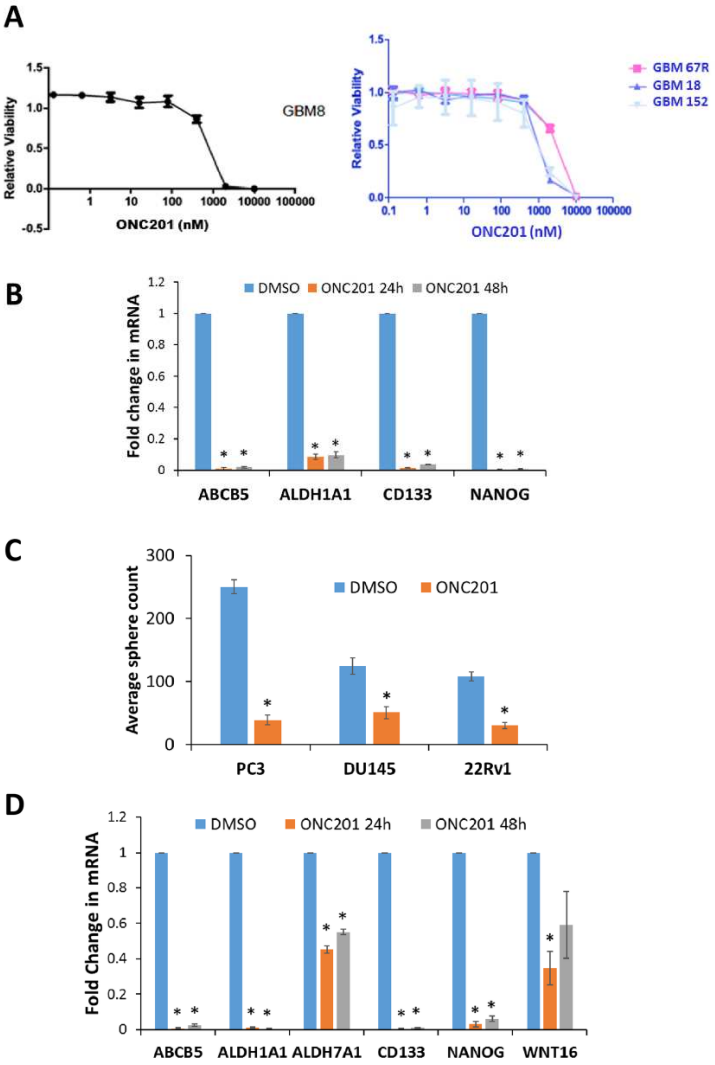
ONC201، CSC را در تومورهای گلیوبلاستوما و پروستات هدف می‌گیرد

بر اساس ارتباط ژن‌های مرتبط با CSC که توسط ONC201 در سرطان پروستات و گلیوبلاستوما تنظیم می-شوند، ما اثرات ONC201 روی بیان ژن مرتبط با CSC و خود نوزایی را در این نوع از تومورها تست کردیم. ONC201 در مدل‌های کشت نوروسفر ۳ بعدی غنی از CSC نمونه‌های گلیوبلاستومای اولیه از جمله نمونه‌هایی که به تازگی تشخیص داده شده‌اند (GBM8، GBM18) و نمونه‌های عود کننده (GBM67R و GBM152) تست شد. ONC201 به صورت قدرتمندی، بقا سلولی همه‌ی ۴ رده را در محیط in vitro مهار می‌کند و مقادیر IC50 برابر ۴۳۳ نانومولار (GBM18)، ۱,۰۹ میکرومولار (GBM8)، ۳,۹۷ میکرومولار (GBM67R) و ۶۸۸ نانومولار (GBM152) بود (شکل 2A). ما قبلا نشان داده بودیم که ONC201، مارکرهای CSC، CD133، ALDH1A1 و CD44 را در سلول‌های سرطان کلورکتال در محیط in vitro و in vivo دچار فروتنظیمی کرده بود (۹).

جدول ۲. تغییرات مرتبط با سلول بنیادی میانجی گری شده با ONC201 در بیان ژن.

RKO cells treated with ONC201 48h	**Molecules**	**-log(p-value)**	**Ratio**	**Ingenuity Canonical Pathways**
	RAF1, JAK1, MAPK1, RRAS, PIK3R1, HRAS, SMAD5, TCF3, PIK3R4, ID1, FZD4, PIK3C3, MAP2K1	3.72E-01	1.31E-01	Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency
	ARRB2, PRKAR1B, CDK1, CCNB1	2.94E-01	1.21E-01	Sonic Hedgehog Signaling
	APH1B, LFNG, HES7, DTX2, HEY1	2.93E-01	1.22E-01	Notch Signaling
HCT116 cells treated with ONC201 18h and 48h	**Molecules**	**-log(p-value)**	**Ratio**	**Ingenuity Canonical Pathways**
	ID1, ID2, FZD4, BMPR2, ID3, FZD2, TCF7L2	7.2E-01	7.07E-02	Mouse Embryonic Stem Cell Pluripotency
	CDK1, CCNB1	3.72E-01	6.06E-02	Sonic Hedgehog Signaling
	FZD4, HDAC1, BMPR2, WNT16, KREMEN2, PIN1, DKK1, FZD2, TCF7L2	3.31E-01	5.17E-02	Wnt/β-catenin Signaling

مسیرهای مرتبط با سلول بنیادی، توسط آنالیز مسیر ingenuity برای پروفایل‌های بیان ژن سلول‌های توموری تیمار شده با ONC201 (۵ میکرومولار) شناسایی شد.



شکل ۲. ONC201، CSCsها را در تومورهای پروستات و گلیوبلاستوما هدف می‌گیرد. (A) اثر غلظت‌های مشخص ONC201 (۷۲ ساعت) روی بقا سلول‌های گلیوبلاستومایی که جدیدا شناسایی شده‌اند (GBM8،

GBM18) و سلول‌های گلیوبلاستومایی عود کننده (GBM67R، GBM152) در کشت نوروسفر سه بعدی. (B) qRT-PCR برای ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی مشخص، در سلول‌های SNB19 تیمار شده با DMSO/OC201 (۵ میکرومولار، ۲۴ ساعت / ۴۸ ساعت، n=3). * نشان دهنده‌ی $p<0.0002$ نسبت به DMSO می‌باشد. (C) اثر DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار، ۷۲ ساعت، n=3) روی تشکیل کره‌ی توموری رده‌های سلول سرطان پروستات مشخص. * نشان دهنده‌ی $p< 0.025$ نسبت به DMSO می‌باشد. (D) qRT-PCR برای ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی مشخص در سلول‌های DU145 تیمار شده با DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار، ۲۴ ساعت/۴۸ ساعت، n=3). * نشان دهنده‌ی $p<0.04$ نسبت به DMSO می‌باشد.

سازگار با این یافته‌ها، ONC201 به طور معنی داری ژن‌های مرتبط با CSC، ABCB5، ALDH1A1، CD133 و NANOG را در سلول‌های گلیوبلاستومای SNB19، T98G و U251 دچار فروتنظیمی کرده بود (شکل 2B و شکل S1). وسترن بلات نشان داد که CD133، ALDH1، NANOG، ID1 و ID3 در سلول‌های گلیوبلاستومای U251 و T98G به محض تیمار در ۷۲ ساعت دچار فروتنظیمی شده بود (شکل S1). پروتئین ID1 در ۲۴ ساعت دچار فراتنظیمی شده بود (شکل S1)، به هرحال، سطوح mRNA در ۴۸ ساعت کاهش یافته بود (جدول ۱) و سطوح پروتئین توسط تیمار ۷۲ ساعته‌ی بعداز ONC201 کاهش پیدا کرده بود (شکل S1). ONC201 به طور معنی داری تشکیل توموروسفر را در سلول‌های سرطان پروستات انسانی 22Rv1، DU145 و PC3 کاهش داده بود. ONC201 به طور معنی داری ژن‌های مرتبط با CSC، یعنی ABCB5، ALDH1A1، ALDH7A1، WNT16، CD133 و NANOG را در سلول‌های سرطان پروستات DU145 دچار فروتنظیمی کرده بود (شکل 2D). وسترن بلات نشان داد که WNT16 در LNCaP و 22Rv1 دچار فروتنظیمی می‌شود در حالی که مارکر CSC CD44 در سلول‌های 22Rv1 به محض تیمار با ONC201 در ۷۲ ساعت دچار فروتنظیمی شده بود (شکل S1). بنابراین، تغییرات در رونویسی مرتبط با سلول بنیادی و اثرات ضد CSC ONC201، مشاهده شده در سرطان کلورکتال، به سرطان پروستات و گلیوبلاستوما بسط داده شد.

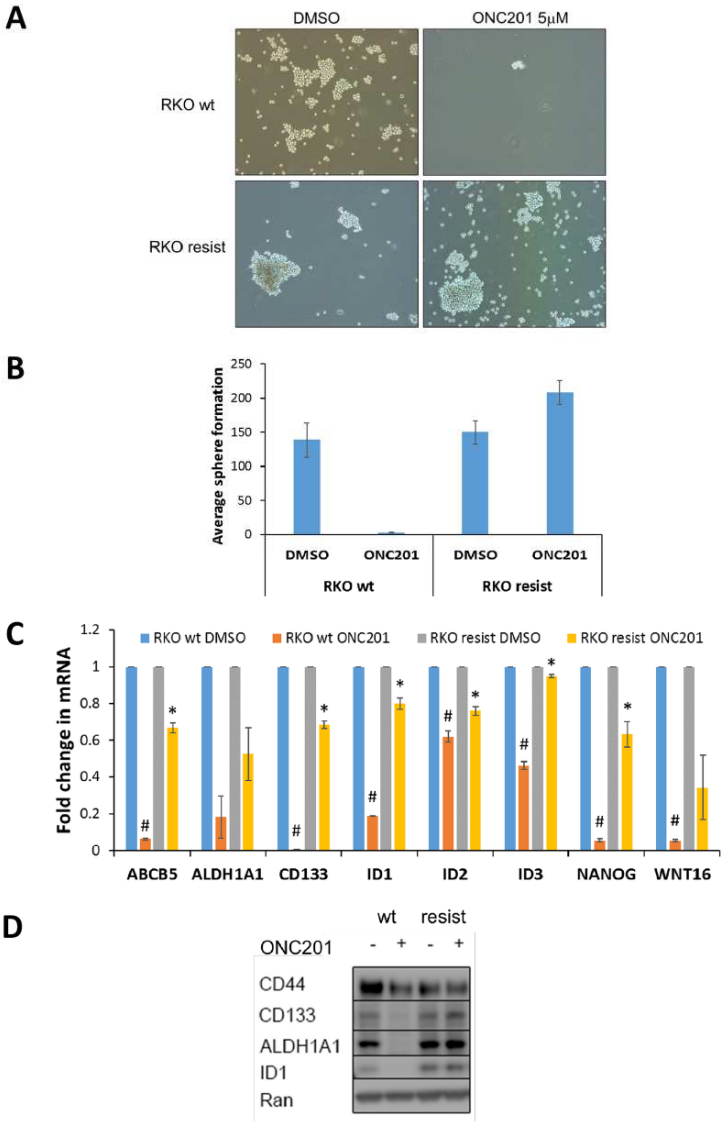
مهار CSCها در سلول‌های توموری دارای مقاومت اکتسابی به ONC201 رخ نمی‌دهد

ما یک ارتباطی را بین تغییرات میانجی گری شده با ONC201 در رونویسی ژن مرتبط با سلول بنیادی و اثربخشی ضد توموری کشف کردیم. ONC201، تشکیل اسفر سلول‌های نوع وحشی (wt) RKO والدینی را مهار کرده بود اما تشکیل اسفر سلول‌های RKO دارای مقاومت اکتسابی به ONC201 را مهار نکرده بود (شکل 3A و 3B). بنابراین، ONC201 به طور معنی داری سطوح mRNA ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی ID1، (۲,۱ مرتبه)، FZD4 (۱,۶ مرتبه)، HES7 (۲,۵ مرتبه)، CCNB1 (۳,۷ مرتبه) و TCF3 (۱,۸ مرتبه) را در سلول‌های RKO wt و نه در سلول‌های RKO مقاوم به ONC201 دچار فروتنظیمی کرده بود (جدول s6)، که نشان می-دهد که مهار CSC می‌تواند به عنوان یک بیومارکر برای پاسخ ONC201 به خدمت گرفته شود. تایید با qRT-PCR نشان می‌دهد که مهار میانجی گری شده با ONC201 ژن‌های مرتبط با CSC، یعنی ABCB5، CD133، ID1، ID2، ID3 و NANOG در سلول‌های RKO wt به طور معنی داری در سلول‌های RKO مقاوم به ONC201 کاهش پیدا کرده بود (شکل 3C). وسترن بلات تایید کرده بود که فروتنظیمی میانجی گری شده با ONC201، در CD44، CD133، ALDH1 و ID1 در سلول‌های RKO wt رخ داده بود اما در سلول‌های RKO مقاوم به ONC201 رخ نداده بود (شکل 3D). بنابراین، کاهش CSC، یک مولفه‌ی مهم از اثربخشی ضد سرطانی ONC201 می‌باشد و می‌تواند به عنوان یک بیومارکر فارماکودینامیک از پاسخ ONC201 به خدمت گرفته شود.

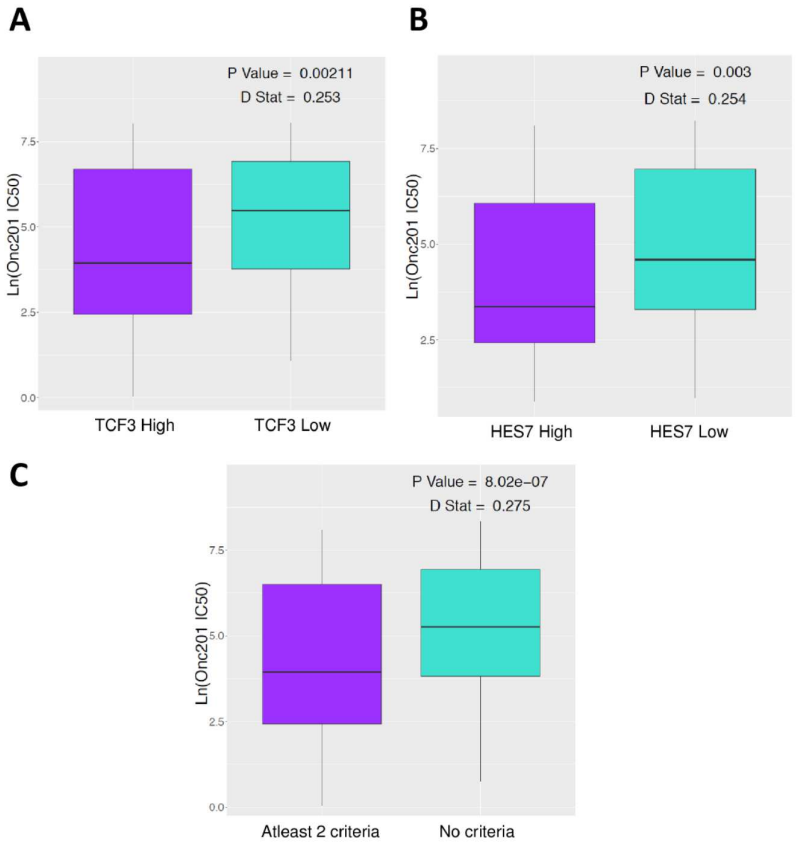
بیان CSC در تومورهای جامد به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای پاسخ به ONC201

در نهایت، ما از پنل GDSC که دارای حدود ۱۰۰۰ رده‌ی سلول سرطان منحصر به فرد است برای تعیین اینکه آیا اثربخشی ONC201 در محیط in vitro با بیان ژن‌های مرتبط با CSC در محیط‌های درمانی مرتبط هست یا نه، استفاده کردیم. همه‌ی ژن‌های شناسایی شده در مطالعات قبلی، تست شدند و یک ارتباط معنی داری با بیان ID1 (Dstat=0.18)، CD44 (Dstat=0.173)، TCF3 (Dstat=0,253)، و HES7 (Dstat=0.254) مشاهده شد (جدول S7). به طور قابل توجهی، ما به این نتیجه دست یافتیم که، بیان بالای TCF3 و HES7 به طور معنی داری حساسیت به ONC201 را پیش گویی می‌کند (شکل 4A و 4B)، که پیشنهاد می‌کند که ONC201 ممکن است در تومورهایی با سیگنالینگ Wnt پایه‌ای بالا موثر باشد. همچنین، بیان پایین ID1 و CD44 به طور معنی داری حساسیت به ONC201 را پیش گویی می‌کند (شکل S1). این داده‌ها با ناهمگنی

مشاهده شده در جمعیت‌های CSC دارای ترکیب‌های مختلف از مارکرهایی که جمعیت‌های سلولی مختلف بیان می‌کنند، سازگار است (۲۱). به علاوه، زمانی که ما اثربخشی ONC201 را در رده‌های سلولی که حداقل دو تا از معیارهای مبتنی بر بیان را داشتند (بیان پایین ID1/CD44 و بیان بالای TCF3/HES7)، در مقابل رده‌های سلولی که هیچ یک از آن‌ها را نداشتند، تست کردیم، یک درجه‌ی بزرگ‌تری از جدایی (تفکیک) وجود داشت (Dstat=0.2749، p-value=8.02e-07) (شکل 4C). این نتایج نشان می‌دهند که بیان پیش از تیمار ژن-های CSC مشخص، می‌تواند به عنوان یک بیومارکر پیش گو برای پاسخ ONC201 به خدمت گرفته شود و اینکه ترکیب بیان چندین ژن CSC منجر به یک پیش گوی عمومی قوی‌تر می‌شود.



شکل ۳. مهار CSCsها در تومورهای سلولی دارای مقاومت اکتسابی به ONC201 رخ نمی‌دهد. (A) اثر DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار ۷۲ ساعت، n=3) روی تشکیل اسفر تومور نوع وحشی RKO (wt) و سلول‌های مقاوم به ONC201. تصویر نماینده‌ی (بزرگ نمایی 10X) اسفرها (بیشتر از ۶۰ میکرومتر) (B) تعیین کمیت اسفرها در (A). (C) qRT-PCR برای ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی مشخص در سلول‌های مقاوم بهONC201 و نوع وحشی (wt) RKO و تیمار شده با DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار، ۴۸ ساعت، n=3). # نشان دهنده‌ی $p< 0.003$ نسبت به DMSO می‌باشد. * نشان دهنده‌ی $p< 0.05$ نسبت به wt ONC201 می‌باشد. (D) وسترن بلات برای پروتئین‌های مرتبط با سلول بنیادی مشخص در سلول‌های مقاوم به ONC201 و نوع وحشی RKO (wt) تیمار شده با DMSO/ONC201 (۵ میکرومولار، ۷۲ ساعت).



شکل ۴. بیان ژن مرتبط با CSC در تومورهای جامد به عنوان یک بیومارکر بالقوه از پاسخ به ONC201. توزیع اثربخشی ONC201 (IC50) در بیشتر از ۱۰۰۰ رده‌ی سلولی GDSC بر اساس بیان RNA پایه‌ی (A) TCF3، (B) HES7. (C) توزیع اثربخشی ONC201 (IC50) در بیشتر از ۱۰۰۰ رده‌ی سلولی GDSC بر اساس تکمیل

حداقل دو معیار مبتنی بر بیان (بیان پایین ID1/CD44 و بیان بالای TCF3/HES7) در برابر رده‌های سلولی که هیچ یک از معیارها را تکمیل نکرده بودند. p-value و آمار D نشان داده شده است.

بحث

ما قبلا اثربخشی ضد ONC201 CSC در محیط in vitro را با استفاده از مارکرهای CSC تایید شده، کشت-های اسفر و in vivo را با استفاده از مطالعات محدود کننده‌ی رقت در سرطان کولورکتال اثبات کردیم (۹). به علاوه، مهار میانجی گری شده با ONC201 سلول‌های بنیادی لوسمی، در محیط in vivo تایید شده است (۱۰). کاهش CSCsهای کولورکتال مقاوم به شیمی درمانی توسط ONC201 شامل یک مکانیسم مهار خود نوزایی و القا مرگ سلولی وابسته به Akt-ERP-Foxo3-DR5-TRAIL می‌باشد (۱۱،۹). به هرحال، این واضح نیست که آیا کاهش CSCs، توسط ONC201ها یک پیامد از مرگ سلولی می‌باشد یا شامل اثرات اختصاصی روی ژن‌های مرتبط با سلول بنیادی است که جلوتر از مهار خود نوزایی و مرگ سلولی می‌باشد. در این مطالعه، ما نشان دادیم که ONC201 به طور اختصاصی رونویسی مرتبط با سلول بنیادی و مرگ سلولی را در نقاط زمانی (۱۸ و ۴۸ ساعت) که قبلا از مرگ سلولی است و ۶۰-۷۲ ساعت بعداز تیمار در سلول‌های تومور جامد رخ می‌دهد را تحت تاثیر قرار می‌دهد (۱۱). این اثرات اولیه روی رونویسی مرتبط با سلول بنیادی توسط مهار مارکرهای CSC و خود نوزایی توسط ONC201 در ۶۰-۷۲ ساعت دنبال می‌شود (۹).

ONC201 مارکرهای CSC مختلف مانند CD44، CD133، ABCB5، ALDH1A1، ALDH7A1، NANOG، ID1، ID2، ID3 و مسیرهای سیگنالینگ نوزایی مانند Wnt، Notch و Hedgehog را ضعیف می‌کند (۱۵،۱۶،۱۹) که شروع تومور (۱۳،۲۱)، مقاومت به درمان (۱۷) و متاستاز (۱۴،۱۸) را در انواع سلولی مختلف تحریک می‌کند که یک فرصتی را برای اثرات ضد توموری و ضد CSC با طیف وسیع فراهم می‌کند. توانایی برای هدف گیری مکانیسم‌های تایید شده‌ی مقاومت به شیمی درمانی CSC، مانند ABCB5، با اثربخشی ONC201 در مدل‌های CSC کولورکتال مقاوم به فلوروراسیل – ۵ که قبلا اثبات شده بود، سازگار است (۹). پروفایل‌های بیان ژن در سلول‌های سرطان کولورکتال، نشان داده‌اند که ONC201، ژن‌های CSC درگیر در سرطان پروستات و گلیوبلاستوما را هدف می‌گیرد. بنابراین، مهار خودنوزایی میانجی گری شده با ONC201 در تومورهای جامد در رده‌های سلولی سرطان پروستات و سلول‌های گرفته شده از بیماران گلیوبلاستومایی تایید شده بود. این

مطالعه، شواهد بیشتری را برای اثربخشی ضد سرطانی با طیف گسترده‌ی ONC201 فراهم کرده است و به عنوان یک منطقی برای کارآزمایی‌هایی فاز I/II تک عاملی در حال پیشرفت ONC201 در تومورهای جامد مقاوم پیشرفته از جمله سرطان پروستات و گلیوبلاستوما به خدمت گرفته می‌شود (۷). داروهایی که سلول‌های توموری تمایز یافته را به تنهایی هدف می‌گیرند معمولا با پاسخ‌های بالینی اولیه که ممکن است دوره‌ای باشند یا نباشند، مرتبط هستند (۲۲). توانایی ONC201 برای هدف گیری CSCsها یک فرصتی را برای دستیابی بالقوه به پاسخ‌های دوره‌ای در بیمارانی با بیماری پیشرفته‌ی مقاوم به درمان فراهم می‌کند، به ویژه در بیماری‌هایی مانند گلیوبلاستومای عود کننده. به علاوه، شیمی درمانی‌های تایید شده یا عوامل هدفمند با اثرات ضد تکثیری که CSCsها را هدف نمی‌گیرند می‌توانند با ONC201 ترکیب شوند تا مزایای بالینی دوره‌ای و غیر انباشته‌ی سریعی را فراهم کنند. این نتایج همچنین نشان می‌دهند که ONC201 می‌تواند در مجموعه‌های یاور / پیش گیرانه برای عود سرطان و پیش گیری از متاستاز مورد استفاده قرار بگیرد.

ما به منظور امکان پذیر ساختن ترجمه‌ی بالینی نتایجی که به دست آوردیم، نشان دادیم که بیان ژن مرتبط با CSC می‌تواند به عنوان یک بیومارکر بالقوه برای پاسخ ONC201 مورد استفاده قرار بگیرد. برای اثبات کاربرد به عنوان یک بیومارکر فارماکودینامیک، سلول‌هایی با مقاومت اکتسابی به ONC201 که قبلا در آزمایشگاه ما تولید شده بودند، مورد استفاده قرار گرفتند (۱۲). مهار CSC میانجی گری شده با ONC201، در سلول‌های سرطانی حساس رخ می‌دهد اما در سلول‌های سرطانی دارای مقاومت اکتسابی رخ نمی‌دهد همانطوری که توسط تشکیل اسفر، سطوح پروتئین و بیان ژن مارکرهای تایید شده‌ی CSC تایید شده بود. به منظور اثبات کاربرد به عنوان یک بیومارکر پیش گو، ما از پنل GDSC رده‌های سلول سرطانی استفاده کردیم (۷). جالب تر اینکه، بیان پایه‌ی ژن‌های مرتبط با CSC از جمله سیگنالینگ پایه‌ی بالای Wnt، اثربخشی ضد سرطانی ONC201 را در بیشتر از ۱۰۰۰ رده‌ی سلول سرطانی پیش گویی کرده بود. بنابراین، مطالعات جفتی که در حال تست بیان CSC در سطح RNA و پروتئین با استفاده از سلول‌های توموری در گردش و بیوپسی‌های به دست آمده از مطالعات بالینی ONC201 در حال پیشرفت هستند، دارای ارزش می‌باشند.

References

1. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. N Engl J Med. 2007; 356(3):217–26. https://doi.org/10.1056/NEJMoa063994 PMID: 17229949.
2. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, Dictus C, Helmke BM, Becker N, et al. Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. Clin Cancer Res. 2008; 14(1):123–9. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-0932 PMID: 18172261.
3. Chen J, Xia Q, Jiang B, Chang W, Yuan W, Ma Z, et al. Prognostic Value of Cancer Stem Cell Marker ALDH1 Expression in Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. PLoS One. 2015; 10(12):e0145164. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145164 PMID: 26682730;
4. Smith DC, Eisenberg PD, Manikhas G, Chugh R, Gubens MA, Stagg RJ, et al. A phase I dose escalation and expansion study of the anticancer stem cell agent demcizumab (anti-DLL4) in patients with previously treated solid tumors. Clin Cancer Res. 2014; 20(24):6295–303. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-1373 PMID: 25324140.
5. Hitron M, Stephenson J, Chi KN, Edenfield WJ, Leggett D, Li Y, et al. A phase 1b study of the cancer stem cell inhibitor BBI608 administered with paclitaxel in patients with advanced malignancies. J Clin Oncol. 2014 (suppl; abstr 2530); 32:5s.
6. Rudin CM, Pietanza MC, Bauer TM, Spigel DR, Ready N, Morgensztern D, et al. Safety and efficacy of single-agent rovalpituzumab tesirine (SC16LD6.5), a delta-like protein 3 (DLL3)-targeted antibody-drug conjugate (ADC) in recurrent or refractory small cell lung cancer (SCLC). J Clin Oncol. 2016 (suppl; abstr LBA8505); 34.
7. Allen JE, Kline CL, Prabhu VV, Wagner J, Ishizawa J, Madhukar N, et al. Discovery and clinical introduction of first-in-class imipridone ONC201. Oncotarget. 2016. https://doi.org/10.18632/oncotarget.11814 PMID: 27602582.
8. Stein MN, Bertino JR, Kaufman HL, Mayer T, Moss R, Silk A, et al. First-in-human Clinical Trial of Oral ONC201 in Patients with Refractory Solid Tumors. Clin Cancer Res. 2017. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-16-2658 PMID: 28331050.
9. Prabhu VV, Allen JE, Dicker DT, El-Deiry WS. Small-Molecule ONC201/TIC10 Targets Chemotherapy-Resistant Colorectal Cancer Stem-like Cells in an Akt/Foxo3a/TRAIL-Dependent Manner. Cancer Res. 2015; 75(7):1423–32. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3451 PMID: 25712124;
10. Ishizawa J, Kojima K, Chachad D, Ruvolo P, Ruvolo V, Jacamo RO, et al. ATF4 induction through an atypical integrated stress response to ONC201 triggers p53-independent apoptosis in hematological malignancies. Sci Signal. 2016; 9(415):ra17. https://doi.org/10.1126/scisignal.aac4380 PMID: 26884599.
11. Allen JE, Krigsfeld G, Mayes PA, Patel L, Dicker DT, Patel AS, et al. Dual inactivation of Akt and ERK by TIC10 signals Foxo3a nuclear translocation, TRAIL gene induction, and potent antitumor effects. Sci Transl Med. 2013; 5(171):171ra17. https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3004828 PMID: 23390247;
12. Kline CL, Van den Heuvel AP, Allen JE, Prabhu VV, Dicker DT, El-Deiry WS. ONC201 kills solid tumor cells by triggering an integrated stress response dependent on ATF4 activation by specific eIF2alpha kinases. Sci Signal. 2016; 9(415):ra18. https://doi.org/10.1126/scisignal.aac4374 PMID: 26884600.
13. Lasorella A, Benezra R, Iavarone A. The ID proteins: master regulators of cancer stem cells and tumour aggressiveness. Nat Rev Cancer. 2014; 14(2):77–91. https://doi.org/10.1038/nrc3638 PMID: 24442143.
14. van den Hoogen C, van der Horst G, Cheung H, Buijs JT, Lippitt JM, Guzman-Ramirez N, et al. High aldehyde dehydrogenase activity identifies tumor-initiating and metastasis-initiating cells in human prostate cancer. Cancer Res. 2010; 70(12):5163–73. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3806 PMID: 20516116.
15. Ying M, Tilghman J, Wei Y, Guerrero-Cazares H, Quinones-Hinojosa A, Ji H, et al. Kruppel-like factor-9 (KLF9) inhibits glioblastoma stemness through global transcription repression and integrin alpha6 inhibition. J Biol Chem. 2014; 289(47):32742–56. PMID: 25288800;
16. Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. Nature. 2011; 474(7350):220–4. https://doi.org/10.1038/nature10107 PMID: 21654806;
17. Sun Y, Campisi J, Higano C, Beer TM, Porter P, Coleman I, et al. Treatment-induced damage to the tumor microenvironment promotes prostate cancer therapy resistance through WNT16B. Nat Med. 2012; 18(9):1359–68. https://doi.org/10.1038/nm.2890 PMID: 22863786;
18. Gujral TS, Chan M, Peshkin L, Sorger PK, Kirschner MW, MacBeath G. A noncanonical Frizzled2 pathway regulates epithelial-mesenchymal transition and metastasis. Cell. 2014; 159(4):844–56. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.10.032 PMID: 25417160;
19. Jin X, Jeon HY, Joo KM, Kim JK, Jin J, Kim SH, et al. Frizzled 4 regulates stemness and invasiveness of migrating glioma cells established by serial intracranial transplantation. Cancer Res. 2011; 71(8):3066–75. https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-1495 PMID: 21363911.
20. Zhang X, Chen Y, Ye Y, Wang J, Wang H, Yuan G, et al. Wnt signaling promotes hindgut fate commitment through regulating multi-lineage genes during hESC differentiation. Cell Signal. 2016; 29:12–22. https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2016.09.009 PMID: 27693749.
21. O'Brien CA, Kreso A, Ryan P, Hermans KG, Gibson L, Wang Y, et al. ID1 and ID3 regulate the self-renewal capacity of human colon cancer-initiating cells through p21. Cancer Cell. 2012; 21(6):777–92. https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.04.036 PMID: 22698403.
22. Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? J Natl Cancer Inst. 2004; 96(8):583–5. PMID: 15100335.

ترجمه فا
TarjomeFa.Com

این مقاله، از سری مقالات ترجمه شده رایگان سایت ترجمه فا میباشد که با فرمت PDF در اختیار شما عزیزان قرار گرفته است. در صورت تمایل میتوانید با کلیک بر روی دکمه های زیر از سایر مقالات نیز استفاده نمایید:

✔ لیست مقالات ترجمه شده

✔ لیست مقالات ترجمه شده رایگان

✔ لیست جدیدترین مقالات انگلیسی ISI

سایت ترجمه فا ؛ مرجع جدیدترین مقالات ترجمه شده از نشریات معتبر خارجی