الاستقصاء غير الحيوي والحيوي لأنشطة ثيموكينون مضادة سرطانياً على الشفرة فوق الجينية للخلية السرطانية

اعداد:

ريان عدنان شيخ

اشراف:

د. محمود الحسين

المستخلص العربي

تتميز العديد من الأورام السرطانية الصلبة وأورام الدم بالتثبيط الفوق جيني للجينات المثبطة للأورام. يؤدي التثبيط الفوق جيني للجينات المثبطة للأورام عن طريق عملية ميثيلة من كل من الحمض النووي والهيستون ٣ إلى زيادة تكاثر الخلايا السرطانية وانبثاثها وتثبيط عملية الموت الخلوي المبرمج. لقد أثبت أن لمركب الثيموكينون، المركب الاكثر فعالية في زيت حبة البركة السوداء، خصائص مقاومة للنشاط السرطاني في أنواع مختلفة من الأورام السرطانية عن طريق استهداف عدد من المسارات الحيوية ولكن لاتزال آلية استهداف مركب الثيموكينون للشفرة الفوق جينية للخلايا السرطانية غير معروفة. ولهذا السبب قمنا بتحليل تأثير مركب الثيموكينون على الشفرة الفوق جينيه للخلية السرطانية التابعة لخلايا سرطان الدم الليمفاوي (Jurkat cells) كنموذج لأورام الدم وخلايا سرطان الثدي(MDA-MB-468) كنموذج للأورام السرطانية الصلبة.

تشير نتائج الدراسة الحالية إلى أن مركب الثيموكينون بالاعتماد على جرعات محددة يثبط تكاثر الخلايا كما يحفز موت الخلايا المبرمج في كل من الخلايا السرطانية المستخدمة. بالإضافة إلى ذلك، أظهرت نتائج دراسة تسلسل الحمض النووي الريبي لخلايا سرطان الدم المعالجة بمركب الثيموكينون تثبيطاً للعديد من الشفرات اللاجينية مثل UHRF1, DNMT1, G9a and HDAC1في حين أظهرت تنشيطاً للتعبير الجيني للجينات المثبطة للورم. بالإضافة إلى ذلك، تم تأكيد البيانات باستخدام تقنيةqPCR في كل من الخلايا السرطانية. وقد أظهرت نتائجنا أن مركب الثيموكينون يقلل من التعبير الجيني لUHRF1, DNMT1,G9a and HDAC1 ويزيد التعبير الجيني للجينات المثبطة للورم. وتشير هذه النتائج إلى أن مركب الثيموكينون يمكن أن يكون علاجاً للخلايا السرطانية عن طريق استهداف الشفرة الفوق جينيه للخلايا السرطانية. كما وجد الدراسة أن التاثير التشاركي لكلا من مركب الثيموكوينون ومركب الفلورنيثن ثنائي الميثيل ذو تاثير إيجابي لافت في تحفيز موت الخلية المبرمج و تثبيط تكاثر الخلية مقارنة بمركب الثايموكوينون على حده أو مركب الفلورنيثين ثنائي الميثيل على حده أيضا. بالإضافة إلى ذلك، بينت نتائج دراسة تسلسل الحمض النووي الريبي لخلايا سرطان الدم الليمفاوي(Jurkat cells) بمركب الفلورنيثن ثنائي الميثيل تثبيطاً للعديد من الشفرات اللاجينية مثلUHRF1, DNMT1, G9a and HDAC1 . أيضا وجد أن أن التاثير التشاركي لكلا من مركب الثيموكوينون ومركب الفلورنيثن ثنائي الميثيل فعال جدا في التقليل من التعبير الجيني لUHRF1, DNMT1,G9a and HDAC ويزيد التعبير الجيني للجينات المثبطة للورم مقارنة بمركب الثيموكينون على حده ومركب الفلورنيثن ثنائي الميثيل على حدة أيضا. وتشير هذه النتائج إلى أن استخدام كلا المركبين الثيموكينون و الفلورنيثين ثنائي الميثيل كعلاج تشاركي يمكن أن يكون علاجاً للخلايا السرطانية عن طريق استهداف الشفرة الفوق جينيه للخلايا السرطانية.

تمشيا مع هذه النتائج ، اظهر الثيموكينون فعالية كبيرة كعامل مضاد للورم في سرطان الثدي الناجم عن DMBA في الفئران. حيث حســـن الثيموكينون معلمات التســـرطن في الثدي بما في ذلك الشـــكل الظاهري لكل من الكبد والكلى، وزن الجسم، وكذلك نسبة الوفيات مقارنة بالفئران المصابة بالورم وغيرالمعالجة بـالثيموكينون.

In vitro and *In vivo* Investigation of Anticancer Activities of Thymoquinone on the Epigenetic Code of Cancer Cell

By
Ryan Adnan Sheikh

Supervisor:
Dr. Mahmoud Alhosin

Abstract

The epigenetic silencing of tumour suppressor genes (TSGs) is a common finding in several solid and hematological tumors. Methylation of DNA and histone 3 as well as deacetylation of histone 3 mediated by DNA methyltransferase 1 (DNMT1), the histone 3 methyltransferase G9a and HDAC1 (histone deacetylase 1), respectively lead to epigenetic silencing of TSGs resulting in enhanced cell proliferation, metastasis and inhibition of apoptosis. Thymoquinone (TQ), the major biologically active compound of the black seed has demonstrated anticancer activities in various tumors by targeting several pathways. However, its effect on cancer cell epigenetic code is largely unknown. The present study aimed to investigate *in vitro* and *in vivo* the effect of TQ on the "epigenetic cancer signature" in the human *breast cancer* cell line (MDA-MB-468 cells) and the human acute lymphoblastic leukemia (Jurkat cells) and the related events. The present study also investigated the combinatorial cytotoxic effects of TQ and Difluoromethylornithine (DFMO), an irreversible inhibitor of the ornithine decarboxylase (ODC) enzyme on Jurkat cells and to determine the underlying mechanisms. We found that TQ inhibits cell proliferation and triggers apoptosis in both cancer cell lines in dose-dependent manner. RNA-sequencing showed that TQ-treated Jurkat cells resulted in the downregulation of key epigenetic players including the PHD and Ring Finger 1 (UHRF1), DNMT1, G9a and HDAC1, while several epigenetically regulated TSGs were up-regulated. Data obtained from RNA sequencing were confirmed using RT-qPCR in both cancer cells. We found that TQ decreases the expression of UHRF1, DNMT1, G9a and HDAC1 genes. Also, we showed that the combination of DFMO and TQ *significantly* reduced cell viability and resulted in significant synergistic effects on apoptosis when compared to either DFMO or TQ alone. RNA-sequencing showed that UHRF1, DNMT1 and HDAC1 were down-regulated in DFMO-treated Jurkat cells. The combination of DFMO and TQ dramatically decreased the expression of UHRF1, DNMT1 and HDAC1 genes compared to either DFMO or TQ alone. Interestingly, In line with the *in vitro* results, TQ was significantly effective as an antitumor agent in a DMBA-induced breast cancer in rats. TQ improved parameters of mammary carcinogenesis including liver and kidney morphology, body weight as well as percent of mortality as compared to rats with tumors without treatment with TQ.

These results suggest that TQ could be used as epigenetic drug that *in vitor* and *in vivo* target both DNA methylation and *histone post-translational* modifications which could be a promising strategy for the epigenetic therapy for both solid and blood tumors . These findings also suggest that the combination of DFMO and TQ could be a promising new strategy for the treatment of acute lymphoblastic leukemia by targeting the epigenetic code.