مریم محمد حسینی، دانشگاه آزاد تهران، واحد علوم دارویی، گرایش سلولی مولکولی،
دکتر طاهره ناجی، استادیار گروه زیست شناسی سلولی مولکولی، واحد علوم دارویی تهران

بررسی نقش اتوفاژی و آپوپتوز در ایجاداختلالات تخریب نورونی

Investigation of Autophagy and apoptosis pathway in neurodegenerative disorders

Autophagy and apoptosis are the most physiologic processes in the maintenance of cellular homeostasis. Autophagy pathways targeted the cytosolic proteins and damaged organelles. Cell rounding, membrane blebbing, cytoskeletal collapse, cytoplasmic condensation, nuclear pyknosis, chromatin condensation, and formation of membrane–enveloped apoptotic bodies, are the main characteristic of apoptosis cell death which are rapidly phagocytosed by macrophages cells. Deregulation of autophagy plays a pivotal role in progress of many diseases. We investigated other findings that indicate the role of autophagy in neurodegenerative diseases.

اتوفاژی و آپوپتوز، فرایندهای فیزیولوژیک پایه ای دخیل در حفظ هموستاز سلولی است. اتوفاژی شامل مسیرهایی است که پروتئین های سیتوزولی پیر و اندامک های آسیب دیده را هدف قرار می دهد. مرگ سلول آپوپتوتیک، با چرخش سلولی، تورم غشا، کلاپس سیتواسکلتی، تراکم سیتوپلاسمی و قطعه قطعه شدن سیتوپلاسم، پیکنوز هسته ای، قطعه قطعه شدن کروماتین و ساخت اجسام آپوپتوتیک با پوشش غشایی که به سرعت توسط ماکروفاژها فاگویسته می شوند، مشخص می شود. بی نظمی اتوفاژی، نقش مهمی در پیش روی بسیاری از این بیماری ها ایفا می کند. هدف از این مطالعه بررسی نقش این اتوفاژی و آپوپتوز در ایجاداختلالات تخریب نورونی با توجه به مطالعاتی بود که در سال های مختلف انجام شده بود.

اتوفاژی مشتق شده از واژه یونانی خوردن خود، مکانیسم متلاشی کردن خود است که نقش مهمی در سرنوشت سلولی و نیز حفظ تعادل متابولیک سلول دارد. در سطوح پایه ای، اتوفاژی، نقش حیاتی در حفظ هموستاز سلولی با هضم اندامک ها وپروتئین های از کار افتاده، ایفا می کند(۱). اتوفاژی شامل: ماکرواتوفاژی، میکرواتوفاژی و اتوفاژی با واسطه چاپرون است(۲-٤)

ماکرواتوفاژی، یک مسیر حفاظت شده در سلول های یوکاریوتی است که باعث تخریب سیتوپلاسمیک می شود. در این مدل اجزای هدف، در وزیکول غشایی به نام اتوفاگوزوم جدا شده و سپس برای تخریب، به لیزوزوم منتقل می شود. میکرواتوفاژی، فرایندی است که نیاز به جذب مستقیم و تخریب سیتوپلاسم یا لیزوزوم ها، بدون دخالت وزیکول های انتقالی حد واسط، دارد. ساخت وزیکول اتوفاژیک، شامل آغاز، ادامه و بلوغ با اتصال به لیزوزوم ها است که نقش مهمی در اتولیزوزوم و یا آمفیزوم دارد(۵).

آپوپتوز، شامل گرد شدن سلول، قطعه قطعه شدن پاهای کاذب، کاهش حجم سلولی، تراکم کروماتین، تجزیه هسته ای، همراه با تخریب فراساختاری اندامک ها در سیتوپلاسم، پس از تورم غشای پلاسمایی و هضم توسط فاگوسیت ها است(۵-٦). آنزیم های پروتئولیتیک، به ویژه آسپارتات و سیستئین در مرکز فعال، که کاسپاز نامیده می شود، از نماتودهای اولیه تا مهره داران مدرن، حفظ شده اند و تقویت کننده های برنامه آپوپتوتیک در سطح سلولی است(۷-۸).کاسپاز ها در سیتوپلاسم، به صورت غیر فعال وجود دارد و با پروتئولیز، فعال می شود (۵). کاسپاز ها، بر اساس نقش اصلی در عملکرد کاسپازهای عمل کننده و موثر، به دو گروه متفاوت تقسیم می شود. کاسپاز های آغازگر، ابتدا توسط سیگنال های

بالادست، فعال می شود (۵)که سپس کاسپازهای موثر را فعال می کند(۷و۹).

پروتئولیز، یک فرایند برگشت پذیر است، بنابراین مانع مرگ سلولی ناگهانی شده و فعال شدن آن، با مهار کننده ی پروتئین های آپوپتوز (inhibitor apoptosis protein)، کنترل می شود(۷،۱۰). با این که برخی از مها ر کننده های آپوپتوز، فقط می تواند برخی کاسپازها را مهار کند، ولی بقیه مانند XIAP(X–linked inhibitor of apoptosis protein)، می تواند در فرایند فعال سازی کاسپاز نیزدخیل باشد(۱۰).

مرگ سلولی برنامه ریزی شده، نقش مهمی در تکامل عصبی نرمال دارد وتعداد و نوع سلول ها را در مغز و طناب نخاعی در حال تکامل، تنظیم کرده و نقش کلیدی در ایجاد یک شبکه نورونی کار آمد، ایفا می کند(۱۱). این فرایند، تحت شرایط فیزیولوژیک، عامل از دست رفتن نورون ها در بیماری های تخریب عصبی و نیز پیری فیزیولوژیک است. مولکول اصلی برنامه آپوپتوز در نورون ها، شامل پروتئین های خانواده Bcl2، کاسپازها و Apaf1، هستند(۱۲–۱۶).

بر طبق مطالعاتی که انجام شده است اطلاعات موجود در مورد آپوپتوز در نورون های پستانداران، بیشتر به مطالعات invitro، متکی است، اما بررسی حیوانات تحت شرایط آزمایشگاهی و مطالعات ژنتیک موش که در سال۱۹۹۸توسط Cecconi و Yoshida انجام شده است دانش ما از تنظیم مرگ سلولی نورونی را افزایش داده اند. موش های فاقد پروتئاز آپوپتوتیک فعال کننده فاکتور۱ Apaf۱، قبل از تولد با مغزهای بزرگ شده، به دلیل اختلال آپوپتوز طی تکامل نورونی، مردند(۱۷–۱۸). با این حال، Apaf۱، برای آپوپتوز نورون های پس میتوزی، مورد نیاز نیست (۱۹). مطالعه ی Motoyama و همکارانش در سال ۱۹۹۵ نشان داده است که اختلال در ژن ضد آپوپتوزbcl–xl، در روز ۱۳ بارداری، کشنده است(۱۵). بررسی های بیشتر جنین های فاقد bcl–xl، مرگ سلولی آپوپتوتیک را در نورون های نابالغ طناب نخاعی، ساقه ی مغز و عقده ی ریشه پشتی در حال تکامل، در سیستم هماتوپویتیک، نشان دادند(۵).

به عبارت دیگر، حذف ژن پیش آپوپتوزیBax در موش ها، مانع مرگ سلولی نورونی در CNS، طی تکامل شد. به علاوه، فقدان Bax پس از تولد، منجر به طولانی شدن نوروژنز مخی و تسریع ساخت مدولوبلاستوما می شود. کمبود Bax، جنین فاقد bcl–xl، را از آپوپتوزنورونی ، محافظت می کند، گرچه این، مانع مرگ جنینی به دلیل کمبود bcl–xl، نمی شود(۲۰–۲۱). اخیرا، محققان در بررسی خود در سال ۲۰۱۱،کاهش مرگ سلولی آپوپتوتیک را در سیستم عصبی در حال تکامل موش های فاقد Hrk، نشان دادند، با این که کمبود این ژن، نتوانست آپوپتوز گسترده در سیستم عصبی جنین فاقد bcl–xl، را کاهش دهد. این مشاهدات، نقش احتمالی مولکول های BH۳ را به تنهایی و یا به صورت ترکیبی، در تنظیم فعال سازی Bax در نورون های در حال تکامل، نشان می دهد (۲۲).

تحقیقات محققان نقش کاسپازها را در تکامل نورونی نشان داده است. مطالعات این دانشمندان در سال۱۹۹۹ نشان داد که آسیب DNA، فعالیت کاسپاز را در نورون های قشری پس از تولد وا نسفالیک جنینی کشت شده، به روشی وابسته به P۵۳ افزایش داد (۲۳). باتوجه به این که مرگ سلولی نورونی با واسطه P۵۳، در مسیرهایی مستقل از کاسپازها نیز، رخ می دهد، آنها نتیجه گرفتند که اهمیت نسبی فعال سازی کاسپاز ها در نورون ها، بستگی به وضعیت تکاملی سلول و طبیعت ویژه محرک مرگ دارد. حذف گروهی از ژن های کاسپاز ها در موش ها، منجر به اختلالاتی در سیستم عصبی مرکزی(CNS)، شامل هیپرپلازینورونی قشر، مخچه، هیپوکامپ، شبکیه و بی نظمی نورونی شد(۲٤).

در مطالعه ای که در سال ۲۰۰۰ انجام شد، نشان داده شد که علت آلزایمر بر اساس تجمع میتوکندری های آسیب دیده در نورون ها است(۲۵). این مطالعه نشان داد که جابه جایی پروتئین های باز شده در غشای میتوکندریایی، منجر به اختلال در فسفریلاسیون اکسیداتیو و در نتیجه، فعالیت اتوفاژی، می شود. لیزوزوم ها، اجزای ضروری اتوفاژی است، در حالی که تجزیه اتوفاژیک میتوکندری های آسیب دیده، عامل مهمی در کنترل کیفی میتوکندری هاست(۲٦). بنابراین، کاهش کارایی اتوفاژی، طی پیری منجر به تجمع الیگومرهای Aβ و α syn، در غشای میتوکندری و آزاد شدن سیتوکروم می شود (۲۷).این فرایند، آبشار کاسپازی را ایجاد می کند که منجر به مرگ سلولی گسترده و تخریب نورونی می شود. همچنین، مشاهداتی وجود داردکه یون روی، عملکرد میتوکندری را افزایش و Aβ هیپوکامپو علائم

پاتوژنیک پروتئین های tau که یکی از پروتئین های دخیل در آلزایمر است را در یک مدل موش آلزایمری را بهبود می بخشد. این بررسی ها نشان داد که مکمل غذایی روی، Aβ داخل نورونی و پاتولوژی tau را کاهش داده و از اختلالات میتوکندریایی، جلوگیری می کند. شلاته شدن روی، سطح BDNF را افزایش داده و مانع اختلالات شناختی وابسته به هیپوکامپ، می شود(۲۸).

در مطالعه ی دیگر که انجام شد، نشان داده شد که اختلالات میتوکندری ممکن است یک نقش کلیدی در بیماری هانتینگتون ایفا کند، بررسی ها در مورد خطوط سلولی حاصل از بیماران هانتینگتون، وجود یک الل هانتینگتون را نشان داد که باعث هیپرپلاریزه شدن غشای میتوکندری و افزایش حساسیت به آپوپتوز می شود. افزودن الل هانتینگتون دیگر به این سلول ها، تعداد سلول های حاوی وزیکول های اتوفاژیک با فعالیت کانی بالیستیک بیشتر را افزایش داد(۳۰). این یافته ها، همراه با نتایج دیگر مطالعات، نشان می دهد که میتوفاژی، میتوکندری های آسیب دیده را حذف کرده و مانع آزاد سازی سیتوکروم c و دیگر پروتئین های پیش آپوپتوزی شده و منجر به مهار مرگ سلولی و تخریب نورونی می شود(۳۰). این مطالعه و مطالعات دیگر(۳۱)این فرضیه را مطرح کرده اند که واکوئل های اتوفاژیک، شدت بیشتری را در سلول های حاصل از بیماران هانتینگتون و مدل های موش هانتینگتون، ایجاد کرده اند. این واکوئل ها نمی توانند ژن های هانتینگتون(Htt)موتانت را جمع کنند(۳۲).

آن ها نشان داده اند که گرچه ساخت اتوفاگوزوم و تجزیه آن، در هر دو مدل، نرمال است اما تشخیص بار، دچار مشکل می شود. این امر، منجر به تجمع بار سیتوپلاسمی تجزیه نشده می شود که منبع آسیب احتمالی را در سلول های نورونی، ایجاد می کند. به عبارت دیگر، نتایج مطالعه دیگر، نشان می دهد که افزایش پروتئازهایلیزوزومی به پاک شدن موتانتHtt از سلول های HEK، توسط ماکرواتوفاژی کمک می کنند(۳۲).

مکانیسم اصلی تخریب نورونی در آلزایمر هنوز مشخص نیست. اطلاعات موجود، اختلالاتی را در متابولیسم پروتئین پیش ساز آمیلوئید به عنوان یک عامل موثر، نشان می دهد که می تواند منجر به اختلال میتوکندریایی و مرگ سلولی شود. زمانی که بیان بیش از حد پروتئین پیش ساز آمیلوئید(APP) وجود دارد، متابولیت آن یعنی Aβ، مربوط به رسوبات Aβ است، اما Aβ خارج سلولی می تواند وارد دیگر سلول ها شده و باعث اختلال میتوکندریایی شود(۳٤). بنابراین APP، مورد توجه تحقیقات به عنوان یک عامل احتمالی برای اختلال میتوکندریایی در AD، شده است(۳۳-۳٤).

به این ترتیب، آزمایشات invivo و invitro، نشان دادکه Aβ محلول، متابولیسم میتوکندریایی را با کاهش فعالیت سیتوکروماکسیداز و افزایش تولید هیدروژن پر اکسید، مختل می کند(۳۵). به علاوه، Aβ ، می تواند با سایکلوفیلینD، که جزء تعدیلی میتوکندریاییmTTP است، واکنش داده و استرس سیناپتیک را با کاهش اثرات روی یادگیری و حافظه در بیماران AD، افزایش دهد(۳٦).

گرچه طیفی از مرگ سلولی در بیماری عصبی مخصوصا پارکینسون، مشخص شده است اما به نظر می رسد که آپوپتوز، بیش از نکروز، به عنوان عاملی غالب برای تخریب نورونی، در پارکینسون است(۳۷). در مطالعات هیبریداسیون In situ که در سال۲۰۰٦انجام شد بیان بالای LRRK۲ در مناطق غلبه گیری شده با دوپامین در مغز بمیاران مبتلا به بیماری پارکینسون و کنترل ها، دیده می شود(۳۸). شواهد مبنی بر نقش LRRK2 در PD، از یک مطالعه سلولی به دست آمده است که نشان داد برهمکنش های LRRK2 و پروتئین مرتبط با FOS مرگ، منجر به فعال شدن مسیر خارجی آپوپتوزی با فعال شدن کاسپاز می شود(۳۹). این مطالعه نشان داد که تجمع انواع موتانت و وحشی α-syn در اجسام lewy، نشانه آسیب هایی مانند PD است(٤۰). این تجمعات در سیستم عصبی مشخص شده اند. به نظر می رسد که آلفا – سین، به عنوان چاپرونمولکولی، برای پروتئین های سیناپتیکSNARE عمل می کند(٤۱-٤۲). افزایش سطح و تجمع α-syn جهش یافته در موش های ترنس ژنتیک، باعث پارالیز و مرگ، می شود(٤۳). یک مطالعه سلول نورونیدوپامینر را یک، مشخص کرد که α-syn، می تواند بیان PRC-S کیناز پیش آپوپتوزی حساس به استرس اکسیداتیو است و آپوپتوز را در این سلول ها، سرکوب می کند، را تنظیم کند.(٤٤).

این یافته ها، در تضاد با نتایج دیگر مطالعات سلولی انجام شده در سلول های نوروبلاستومایSH-SYSY است که بیان α-syn تحریک کننده آپوپتوز را نشان

دادند. مطالعات زیادی، نقش آپوپتوز را در تخریب نورونی مشاهده شده درهانتیگتون تایید کرده اند(٤٤). با این حال، در مقایسه با دیگر بیماری های تخریب نورونی، مطالعات مستقیم کمی در این زمینه، انجام شده است.کاسپازها به صورت پروتئولیتیک، Htt را تجزیه کرده و قطعه N- ترمینال، حاوی موتینفPQ را آزاد کرده و قطعات توکسیکmHH را تولید می کند(٤٥). بیان بیش از حد Htt وحشی، اثر حفاظتی در مدل موش ترنس ژنتیک HD، با جلوگیری از سمیت NMADR ها دارد(٤٤).

مکانیسم های مختلفی، تحریک آپوپتوز در هانتیگتون را پیشنهاد کرده اند. در یک مطالعه که بر روی مدل موش HDترنس ژنتیک YAC انجام شد، نشان داده شده که گیرنده های NMDAگلوتامات، منجر به افزایش کلسیم داخل سلولی اختلال میتوکندریایی و در نهایت آپوپتوز در یک حالت وابسته به طول PQ، می شود(٤٦). همزمان با این مطالعه، مطالعه ی دیگری در invivo، افزایش بیان رسپتور NMDA(N-methyl-D-aspartate receptor)خارج سیناپسی و نیز کاهش فعال سازی هسته ای CREB را در استراتوم موش هانتیگتون، گزارش داد. این تغییرات مرتبط با شدت موتاسیون، وابسته به تقسیم mHtt توسط کاسپاز است که منجر به تظاهرات بیماری، می شود(٤٧).

نتیجه گیری

اختلالات تخریب عصبی، علائم شایع و معمول سال های پیری است و آنها با افزایش سن افراد جامعه گسترش می یابد. این بیماری ها، نه فقط به دلیل تاثیرات اقتصادی شان روی جامعه، بلکه همچنین به دلیل دور کردن افراد از هویت واقعی شان، مخرب است. بنابراین، با وجود اینکه جوامع، میلیاردها دلار را برای تحقیق در مورد داروهایی برای متوقف کردن بیماری یا به حداقل رساندن تخریب نورونی هزینه می کند، اما نتایج خیلی رضایت بخش نیست. بنابراین، تحقیق در زمینه های جدیدی که ممکن است به لحاظ دارویی در پیشروی بیماری های عصبی دخیل باشد مهم است. در سال های اخیر، توجه زیادی به دارو هایی که اتوفاژی و آپوپتوز را تعدیل می کند، شده است. با این که چندین داروی ضد تخریبی آزمایشگاهی تولید شده است، اما افراد باید در مصرف، با توجه به داروهای تعدیل کننده اتوفاژی، محتاط باشند. تعدیل اتوفاژی به تنهایی، منجر به اثرات بالینی رضایت بخش نمی شود.

این، به دلیل طبیعت مرتبط اتوفاژی، و نیز به دلیل این که سطح کم اتوفاژی، بقای سلول را افزایش می دهد، است؛ اتوفاژی گسترده، ممکن است واقعا سلول هدف را بکشد. تعدیل برخی از تنظیم کننده های آپوپتوز و اتوفاژی، به ویژه به دلیل طبیعت مرتبط هر دو فرایند، باید با احتیاط انجام شود. برخی هدف ها مانند کیناز Akt، هم اتوفاژی و هم آپوپتوز را تحت تاثیر قرار می دهد. این مورد، اتوفاژی را هم از طریق مهار Foxo۳ و هم فعالسازی mTOR ، بلوکه می کند(٤٨). Akt سیتوپلاسمی ممکن است به عنوان یک کیناز پیش بقایی عمل کند، در حالی که در زمان قرارگیری در هسته، ممکن است در تحریک مرگ سلولی شرکت نماید (٤٩). تاثیرات Akt هسته ای روی اتوفاژی، تاکنون مشخص نشده است. با این که تعدیل گر های اتوفاژی و آپوپتوز ممکن است برخی ترمیم های سریع برای بیماری ارائه دهند، اما راه حل های طولانی مدت در این بخش، باید بر اساس پزشکی ترمیم و روش های مهندسی بافت، ارائه شود(٥٠).

در این تحقیق سعی شد تا با نشان دادن اهمیت عملکرد اتوفاژی و آپپتوز از آن ها به عنوان ابزاری قدرتمند جهت درمان اختلالات نورونی استفاده شود.

Reference

1. Eisenberg-Lerner, A., Bialik, S., Simon, H.U., Kimchi, A., 2009. Life and death partners: apoptosis, autophagy and the cross-talk between them. Cell Death Differ. 16, 966–975.

2. Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farre, J.C., Subramani, S., 2010. Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. FEBS Lett. 584, 1367–1373.

3. Suzuki, K., 2013. Selective autophagy in budding yeast. Cell Death Differ. 20, 43–48. Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cualing, H.D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J.U., Cheng, J.Q., Mule, J.J., Pledger, W.J., Wang, H.G., 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. Nat. Cell Biol. 9, 1142–1151.

4. Trempe, J.F., Fon, E.A., 2013. Structure and function of Parkin, PINK1, and DJ-1, the three musketeers of neuroprotection. Front. Neurol. 4, 38.

5. Los, M., Mozoluk, M., Ferrari, D., Stepczynska, A., Stroh, C., Renz, A., Herceg, Z., Wang, Z.-Q., Schulze-Osthoff, K., 2002. Activation and caspase-mediated inhibition of PARP: a molecular switch between fibroblast necrosis and apoptosis in death receptor signaling. Mol. Biol. Cell 13, 978–988.

6. Rashedi, I., Panigrahi, S., Ezzati, P., Ghavami, S., Los, M., 2007. Autoimmunity and apoptosis – therapeutic implications. Curr. Med. Chem. 14, 3139–3151.

7. Ghavami, S., Hashemi, M., Ande, S.R., Yeganeh, B., Xiao, W., Eshraghi, M., Bus, C.J., Kadkhoda, K., Wiechec, E., Halayko, A.J., Los, M., 2009b. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. J. Med. Genet. 46, 497–510.