

## ارزیابی بیان پروتیین‌های ATF-2 و P38 در سلول‌های کورتکس جنین رت بعد از القای مرگ سلولی در مدل صدمه به DNA

مزگان حسینی Ph.D.\*، کاظم پریور Ph.D.\*، محمد حسین قهرمانی Ph.D.\*، سید ناصر استاد Ph.D.\*

\* دانشگاه آزاد اسلامی تهران، واحد علوم و تحقیقات، گروه زیست‌شناسی

\* دانشگاه علوم پزشکی تهران، دانشکده داروسازی، گروه سم‌شناسی، بخش کشت سلولی

✉ آدرس مکاتبه: تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی

پست الکترونیک: Email: mojgan\_hosseini@gawab.com

### چکیده

دریافت مقاله: ۸۴/۳/۲، پذیرش مقاله: ۸۴/۷/۳۱

**\* هدف:** مطالعه و مقایسه بیان پروتیین‌های ATF-2 (Association Transcription Factor-2) و P38 در سلول‌های کورتکس جنین رت (Rat) بعد از القای مرگ سلولی توسط صدمه به DNA

**\* مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی کورتکس جنین‌های رت ۱۴ تا ۱۶ روزه خارج شد. پس از آن سلول‌ها به شکل سوسپانسیون سلولی در آمدند. سپس تعداد  $10^5 \times 1/2$  سلول نوروئی حاوی محیط کشت بدون سرم بر روی ظروف کشت پوشش شده با Poly-D-Lysine کاشته شدند. ۲۴ ساعت پس از کشت، تیمار با Camptothecin (مهار کننده توپوایزومراز I) در غلظت  $10^{-7}$  مولار انجام گرفت. پس از گذشت ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت، با استفاده از آنتی‌بادی اولیه، بیان ATF و P38، با تکنیک ایمونوسیتوشیمی بررسی گردید. ارزیابی هسته توسط بافر لیز کننده و شمارش هسته زنده و مرده انجام شد. مطالعه و شمارش نوروئها با استفاده از میکروسکوپی فلورسنت و نوری انجام شد. سپس آنالیز آماری بر اساس آنوای یک‌طرفه (One-Way ANOVA) و Post Test به طریق توکی (Tukey) بر روی درصد سلول‌های زنده و درصد سلول‌های بیان کننده انجام گرفت.

**\* یافته‌ها:** میزان بیان P38 در گروه تیمار شده با Camptothecin برای زمان‌های ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۴، ۲۰، ۴۰ و ۵۵ درصد و میزان بقا به ترتیب ۹۵، ۸۵، ۶۴ و ۵۰ درصد، و میزان بیان ATF-2 به ترتیب ۳، ۲۰، ۳۰ و ۴۵ درصد است و میزان بقا به ترتیب ۹۷، ۸۵، ۶۴ و ۵۰ درصد است. درصد بیان P38 و بقای نوروئها در ساعت ۲۴ به ترتیب (۴۰ و ۶۴ درصد) و درصد بیان ATF-2 و بقای نوروئها به ترتیب (۳۰ و ۶۴ درصد) در مقایسه با کنترل افزایش معنی‌داری در سطح  $P < 0.05$  را نشان می‌دهد. بیان پروتیین‌ها، در ۴ ساعت تغییر معنی‌داری نشان نمی‌دهد.

**\* نتیجه‌گیری:** نتایج نشان می‌دهد که بیان پروتیین ATF-2 و P38 افزایش پیدا می‌کند و افزایش بیان P38 همراه با افزایش بیان ATF-2 است، بنابراین Camptothecin در این مدل، موجب مرگ نوروئی از طریق تحریک مسیر ATF-2 - P38 می‌شود.

**کلیدواژگان:** Camptothecin (کامپوتوسین)، P38، ATF-2، صدمه به DNA، کورتکس جنین Rat (رت)

فصلنامه پزشکی یاخته، سال هفتم، شماره ۳، پاییز ۸۴، صفحات ۱۳۱-۱۲۶

است. در کشت اولیه سلول‌های کورتکس مغز، مهار توپوایزومراز I توسط Camptothecin موجب صدمه به DNA و متعاقباً شروع مرگ سلولی می‌گردد (۱).

در این مدل، القای مرگ توسط Camptothecin موجب فعال شدن مسیرهای مرگ آپوپتوزی شده و پس از ۲۴ ساعت مرگ اتفاق می‌افتد. مطالعات نشان داده است که پروتیین‌های P53 و Bax در این روند دخالت دارند و عملاً عدم حضور این پروتیین‌ها، می‌تواند کاملاً مرگ را مهار کند. علاوه بر این در این مدل مسیر c-Jun-JNK فعال می‌شوند و افزایش بیان پروتیین c-Jun مشاهده می‌شود ولیکن نصف مسیرهای دیگر مرگ سلولی در این مدل بررسی نگردیده است. در این روش سلول‌های کورتکس مغز پس از کشت، با Camptothecin مسجور شده و مرگ سلول در طول ۲۴ ساعت اتفاق می‌افتد (۱).

### مقدمه

شناخت مکانیسم‌های مرگ سلول‌های عصبی در ابداع روش‌های درمانی جدید و یا پیش‌گیری بیماری‌های عصبی از جمله آلزایمر و سکنه‌های مغزی از اهمیت خاصی برخوردار است. در این راستا، مدل‌های مختلف کشت سلول‌های عصبی مورد بررسی قرار گرفته‌اند که یکی از مدل‌های مناسب، کشت سلول‌های عصبی کورتکس مغز و القای مرگ سلولی توسط آسیب رسانیدن به DNA است (۱). در سلول‌های عصبی که پس میتوزی (Post mitotic) هستند، شروع چرخه سلولی موجب شروع مکانیسم‌های مرگ سلولی برنامه‌دار (Apoptosis) می‌شود. یکی از مدل‌های مناسب مرگ سلول‌های عصبی، القا مرگ در نوروئهای کورتکس توسط Camptothecin

به صورت یک سوسپانسیون یکنواخت سلولی در آید (۱) این سوسپانسیون در ۲ میلی لیتر محیط DMEM+F12 تهیه شد. سپس تعداد  $10^5 \times 1/2$  سلول از سوسپانسیون سلول نوروئیک حاوی محیط کشت بدون سرم که حاوی ۳ گرم گلوکز (شرکت Sigma)، ۵۰ میلی گرم Transferin (شرکت Sigma)، ۱۲/۵ میلی گرم انسولین (شرکت Sigma)، ۳/۱۵ میلی گرم Progesterone (شرکت Sigma)، ۱۰ میلی گرم Putrescine (شرکت Sigma)، ۲۰ میلی گرم Selenium (شرکت Sigma)، ۲۰ میلی لیتر F12 (شرکت PAN) که به نسبت ۱:۱ با MEM (شرکت Gibco) ترکیب شد (۱) بر روی ظروف کشت پوشش شده با Poly-D-Lysine (از Sigma) کاشته شدند.

۲۴ ساعت پس از کشت، تیمار با Camptothecin (شرکت Sigma) در غلظت  $10^{-5}$  مولار انجام گرفت. پس از گذشت ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت، محیط همراه با دارو خارج شد و سپس یک گروه از سلول‌ها، با متانول: استون فیکس شدند و با افزودن آنتی بادی اولیه ATF-۲ یا P۳۸ (هر دو از شرکت Signaling technology Cell) به نسبت ۱ به ۵۰۰ میکرولیتر به مدت ۱۶-۱۲ ساعت در ۴ درجه سانتی گراد مجاور گردید. و با افزودن آنتی بادی ثانویه Santa Cruz (Fluorescein Isothiocyanate: FITC) از میزان بیان به روش ایمونوسیتوشیمی مطالعه شد. جهت مطالعه تراکم کروموزومی از رنگ آمیزی با Hoechst ۳۳۲۵۸ (هوخست) از Sigma استفاده گردید. با افزودن بافر لیزکننده سلولی (Sigma NaCl, glacial acetic acid, Triton, MgCl<sub>2</sub>, phosphate) buffer saline: PBS از شرکت Merck، Cethylmethyl ammonium bromide از شرکت Sigma، Bromophenol blue به میزان ۱۰۰ میکرولیتر تعداد هسته‌های مرده و زنده مطالعه شد. این بافر غشا سلولی را از بین می برد ولیکن به هسته صدمه نمی زند و می توان زیر میکروسکوپ نوری هسته‌های زنده و مرده را شمارش کرد (۹، ۱۰، ۱۱).

آزمایشات حداقل ۴ بار تکرار گردید. آنالیز آماری نتایج بر اساس آنوای یک طرفه (ANOVA One-Way) و Test post به طریق توکی (Tukey) بر روی درصد زنده‌ها در سطح  $P < 0.05$ ، انجام گرفت.

## یافته‌ها

### کشت سلول‌های کورتکس و مشاهده انشعابات آن

سلول‌های نوروئیک بر روی ظروف پوشش شده با Poly-D-Lysine کشت شدند. پس از ۲۴ ساعت انشعابات اکسونی و پس از ۴۸ ساعت انشعابات دندریتی نیز نمایان شدند (شکل ۱).

### بررسی هسته‌های نوروئیک

در این روش به وسیله بافر لیزکننده سلولی، هسته‌ها از سلول جدا شده و توسط میکروسکوپ نوری هسته‌های زنده از مرده شناسایی شدند

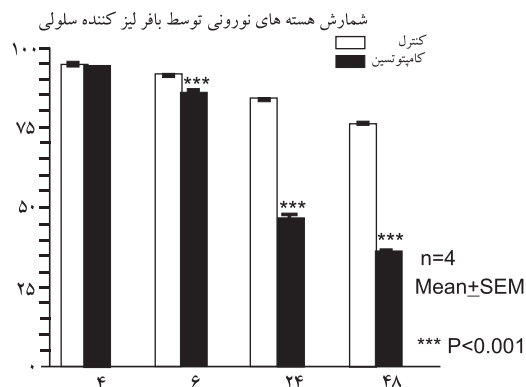
تحقیقات انجام شده نشان می دهد که فعال شدن مسیرهای میتوزن اکتیویند پروتیین کیناز (MAPK) از جمله مسیر P۳۸ موجب آپوپتوز نوروئیک می گردد که تحریک این مسیر و متعاقباً پروتیین‌های پایین دست آن همچون (Association Transcription Factor-2: ATF-۲) می تواند در این فرآیند دخالت داشته باشد. به همین دلیل میزان بیان فاکتور نسخه برداری ATF-۲ که در مدل‌های دیگر موجب مرگ سلولی شده است می تواند نشان گر شروع این فرآیند باشد. در همین راستا، فعال شدن مسیر P۳۸ در سلول‌های سالم و در سلول‌های سرطانی نقش کلیدی در مرگ سلولی دارد. جالب توجه اینکه، فعال شدن P۳۸ در سلول‌های غیر نوروئیک واکنش‌های متفاوتی را نشان داده است و این مسیر معمولاً به محرک‌های استرس واکنش نشان می دهد.

MAPK P۳۸ از اعضای خانواده MAPK است که توسط انواع مختلف استرس‌های محیطی فعال می شود. فعال شدن این مسیر موجب تحریک MKK ۳/۶ و MAP Kinase P۳۸ می شود (۳، ۱۳). MKK ۳/۶ در تنظیم HSP۲۷ و MAPKAP-۲ و چندین عامل نسخه برداری که شامل ۱-ELK، ۲-MEF، MAX/M، STAT و ATF-۲ می شود، دخالت دارند. از طریق فسفریله شدن ترئونین ۱۸۰ و تیروزین ۱۸۲ خود توسط MKK ۳/۶ فعال می شود (۳، ۵). یکی از پروتیین‌های پایین دست P۳۸، فاکتور نسخه برداری ATF-۲ است. ATF-۲ یک عضو از خانواده ATF/CREB از فاکتورهای نسخه برداری است و توسط پروتیین‌هایی که با استرس فعال می شوند (Stress-activated Protein Kinase) همچون P۳۸، JNK، فعال می شود (۴). نتایج نشان داده P۳۸ و JNK می تواند مناطق Thr۹ و Thr۱۹ را در انتهای آمینی P۳۸ فسفریله کنند (۵، ۶). مطالعات نشان می دهد که صدمه DNA به وسیله Camptothecin منجر به مرگ سلولی در نوروئیک‌های کورتکس جنین می شود (۷، ۸). اما اینکه Camptothecin چگونه و از چه مسیری در داخل سیتوپلاسم و سپس هسته سلول، منجر به این عمل می شود، قابل پیگیری است. این تحقیق بر آن است که ارتباط مسیر P۳۸ را در مدل مرگ سلول نوروئیک با توجه به بیان ATF-۲ و P۳۸ مطالعه کند. در این تحقیق ارتباط بین بیان پروتیین ATF-۲ و فعال شدن مسیر P۳۸ که با بررسی میزان بیان این پروتیین در حالت غیرفعال انجام می شود، می تواند نکات مهمی را در مرگ سلول‌های کورتکس مغز آشکار سازد.

## مواد و روش‌ها

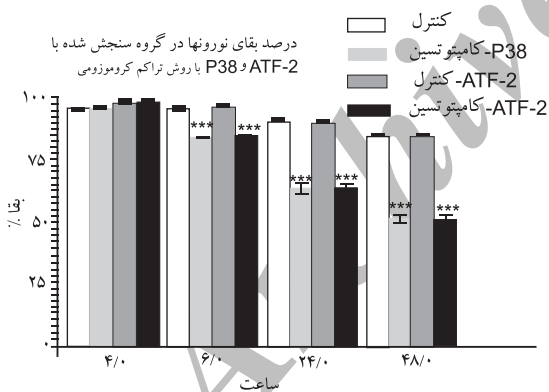
ابتدا جنین‌های رت ۱۴ تا ۱۶ روزه نژاد Sprague Dawley (اسپراگ داوولی) از رحم خارج گردید و سپس مغز جنین‌ها از جمجمه خارج و توسط اسکالپل استریل برشی طولی و سطحی بر روی ناحیه حاشیه‌ای پشتی مخ زده شد تا از این طریق کورتکس مخ جدا شد. جدا سازی کورتکس و نواحی آن بر اساس اطلس پاکسینوس (Paxinos) و روند تکاملی مغز رت انجام گرفت (۲). تمامی مراحل در زیر استریو میکروسکوپ انجام شد. پس از آن کورتکس‌ها در محیط استریل و سرد با استفاده از پیپت پاستور، خرد شد تا اینکه نمونه‌ها

Camptothecin، میزان تراکم کروموزومی که نشان دهنده مرگ آپوپتوزی است، پس از ۶ ساعت مجاورت شروع شده و در ۴۸ ساعت به بیش از ۵۰ درصد می‌رسد.



نمودار ۱: مقایسه درصد بقای Nuclear Integrity، در ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت پس از تیمار با Camptothecin در گروه کنترل و دارو (۱۰<sup>-۵</sup> مولار). پس از ۲۴، ۶، ۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با دارو، ۱۰۰ میکرو لیتر از بافر لیزکننده به سلول‌ها اضافه و هسته‌ها شمارش می‌شود. تعداد هسته‌های زنده بر روی تعداد کل هسته‌ها، به صورت Mean±SE نشان داده شده است (n=۴). همان طور که مشاهده می‌شود، درصد بقای هسته نورون‌ها پس از ۴ ساعت تغییر معنی‌داری نمی‌یابد ولیکن، پس از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در سطح P<۰/۰۰۱ اختلاف معنی‌داری با گروه بدون دارو دارد. (\*\*\*)

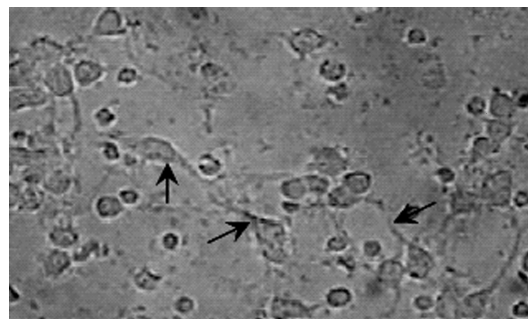
با توجه به اینکه نورون‌ها به دو گروه تقسیم شده‌اند و در یک گروه بیان P38 و در گروه دیگر ATF-2 اندازه‌گیری شده، تراکم کروموزومی در دو گروه یکسان بوده و اعداد مشابه هم است.



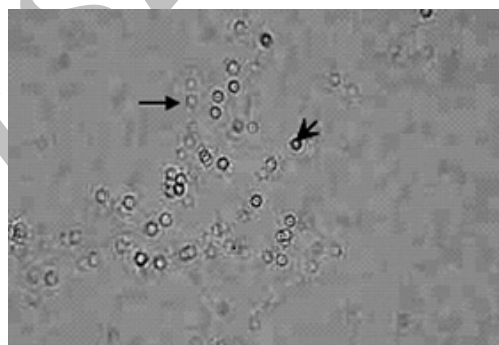
نمودار ۲: مقایسه درصد بقای نورون‌ها در گروه سنجش شده با ATF-2 و P38 باروش تراکم کروموزومی. در این روش پس از ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با Camptothecin و استفاده از آنتی‌بادی اولیه و ثانویه، رنگ‌آمیزی هوخست ۲۲۲۵۸ انجام می‌شود. با توجه به رنگ هوخست نورون‌های زنده از مرده مشخص شده و شمارش می‌شود. تعداد نورون‌های زنده بر روی تعداد کل نورون‌ها، به صورت Mean±SE نشان داده شده است (n=۴).

میزان بقا در گروه دارو که بیان P38 انجام شد، معادل ۹۵±۰/۲۸، ۸۵±۰/۲۷، ۸۵±۱/۵۸ و ۶۴±۰/۴۵ و برای گروه ATF-2 معادل ۹۷±۰/۳۸، ۸۵±۰/۶۶، ۸۵±۱/۳۸ و ۶۴±۱/۵۳ در ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸

(شکل ۲). این عمل در ساعت‌های مختلف تیمار دارویی پس از کشت، انجام شد. پس از به دست آوردن درصد بقای سلول‌ها، آنالیز آماری بر روی آنها انجام شد (نمودار ۱).



شکل ۱: کشت سلول‌های نورونی و انشعابات آن. نورون‌ها پس از شمارش بر روی ظروف پوشش شده با Poly-D-Lysine کاشته شدند. پس از ۲۴ ساعت از کشت، نورون شروع به انشعاب و تولید آکسون نمودند و برای تیمار دارویی آماده شدند. میکروسکوپ نوری معکوس (۴۰۰X)



شکل ۲: بررسی هسته‌های نورونی. پوشش هسته‌های مرده تیره و زنده شفاف است (۱۰۰۰X). فلش کوتاه هسته مرده و فلش کشیده هسته زنده را نشان می‌دهد.

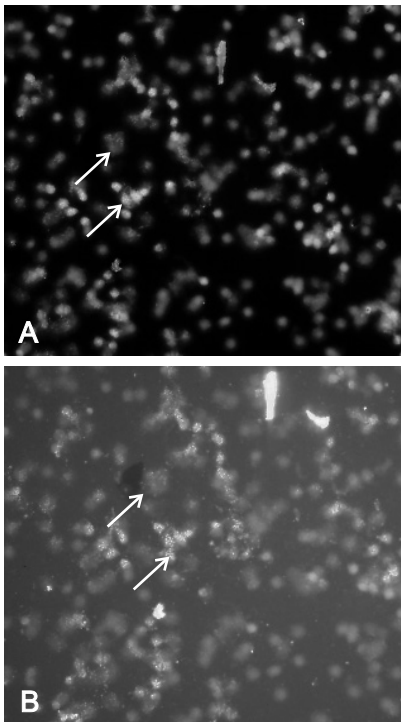
به این ترتیب که درصد بقای هسته نورون‌ها از ۴ تا ۴۸ ساعت بین ۳۵ تا ۹۵ درصد متغیر بود، این میزان بقا در گروه تیمار شده با Camptothecin برای زمان‌های ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۹۵±۰/۲۲، ۸۵±۰/۴۵، ۸۵±۱/۷۳ و ۶۴±۰/۴۳ درصد است (نمودار ۱). همان‌طور که مشاهده می‌شود، در گروه دارو از ساعت ۶ اختلاف معنی‌داری با گروه کنترل نشان می‌دهند که موید القای مرگ توسط دارو است. درصد بقای نورون‌ها در گروه کنترل و دارو در ۴ ساعت در مقایسه با کنترل و دارو در ۶، ۲۴ و ۴۸ دارای افزایش معنی‌دار است. تعداد هسته‌های مرده پس از گذشت ۶ ساعت از تیمار با Camptothecin، افزایش نشان داد. این نشان دهنده آن است که در ۶ ساعت پس از اضافه کردن Camptothecin مرگ نورونی صورت گرفته است.

#### بررسی میزان تراکم کروموزومی در نورون‌ها

میزان تراکم کروموزومی در نورون‌ها توسط رنگ‌آمیزی هوخست بررسی گردید. همان‌طور که نمودار ۲ نشان می‌دهد، در گروه مجاور با

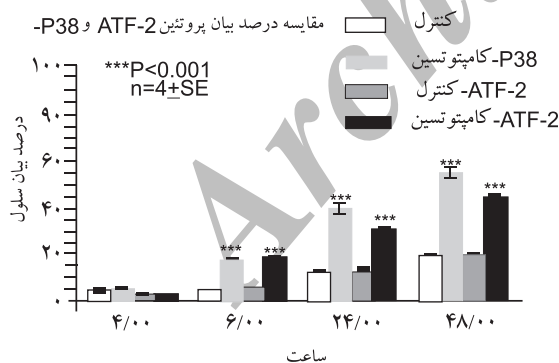
ساعت پس از مجاورت با Camptothecin می‌باشد. این نشان‌دهنده آن است که در ۶ ساعت پس از اضافه کردن Camptothecin مرگ نورونی، شروع شده است.

همان‌طور که مشاهده می‌شود، درصد بقای نورون‌ها پس از ۴ ساعت تغییر معنی‌داری نمی‌یابد. ولیکن، پس از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در سطح  $P < 0.001$ ، اختلاف معنی‌داری با گروه بدون دارو دارد.

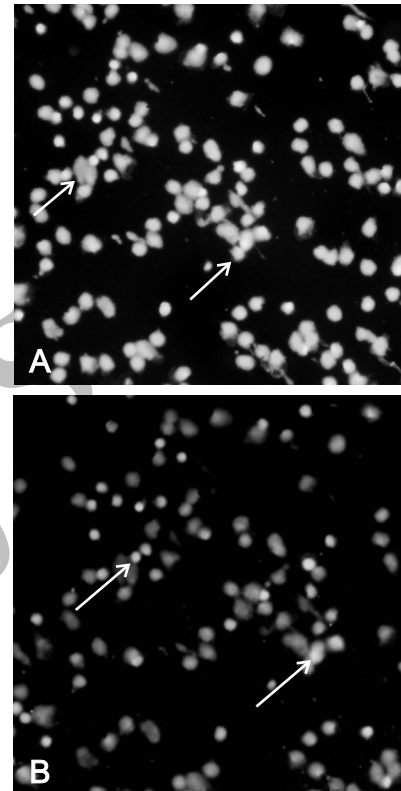


شکل ۴: بررسی بیان ATF-2 در نورون‌ها پس از ۴۸ ساعت القای مرگ توسط Camptothecin. نورون‌ها به تعداد  $10^5 \times 1/2$  در هر Chamber کاشته شدند و به مدت ۴۸ ساعت با Camptothecin (A) و یا بدون آن (B) مجاور گردید. میزان بیان ATF-2 در این سلول‌ها توسط آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی‌بادی ثانویه (FITC) بررسی گردید. مرگ این سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی هسته با هوخست (A) بررسی گردید. فلش کوتاه، سلول مرده و فلش کشیده، سلول زنده را نشان می‌دهد. این تصاویر نشان می‌دهد که پس از ۴۸ ساعت از تیمار با Camptothecin، مرگ بیان ATF-2 هر دو به اوج خود رسیده است (۴۰۰X).

(مشاهده نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)



شکل ۳: مقایسه درصد بیان پروتئین P38 و ATF-2 در گروه کنترل و پس از تیمار با Camptothecin (۱۰<sup>-۵</sup> مولار). در این روش پس از ۴، ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت مجاورت با Camptothecin و استفاده از آنتی‌بادی اولیه و ثانویه، تعداد نورون‌های بیان‌کننده پروتئین ATF-2 و P38 (افزایش رنگ مشخص شده توسط FITC) با نمونه‌های کنترل مقایسه و شمارش شدند. تعداد نورون‌های بیان‌کننده بر روی تعداد کل نورون‌ها، به صورت  $Mean \pm SE$  نشان داده شده است (n=4). همان‌طور که مشاهده می‌شود، درصد بیان پروتئین‌ها، پس از ۴ ساعت تغییر معنی‌داری نمی‌یابد ولیکن، پس از ۶، ۲۴ و ۴۸ ساعت در سطح  $P < 0.001$  اختلاف معنی‌داری با گروه بدون دارو دارد.



شکل ۳: بررسی بیان P38 در نورون‌ها پس از ۴۸ ساعت القای مرگ توسط Camptothecin. نورون‌ها به تعداد  $10^5 \times 1/2$  در هر چاهک کاشته شدند و به مدت ۴۸ ساعت با Camptothecin (A) و یا بدون آن (B) مجاور گردید. میزان بیان P38 در این سلول‌ها توسط آنتی‌بادی اختصاصی و آنتی‌بادی ثانویه (FITC) بررسی گردید. مرگ این سلول‌ها توسط رنگ‌آمیزی هسته با هوخست (A) بررسی گردید. فلش کوتاه، سلول مرده و فلش کشیده، سلول زنده را نشان می‌دهد. این تصاویر نشان می‌دهد که در ۴۸ ساعت از تیمار با Camptothecin، مرگ و بیان P38 به اوج خود رسیده است. میکروسکوپ نوری ایمونوفلورسنت (۴۰۰X).

(مشاهده نمونه رنگی شکل در انتهای مقالات)

### بررسی بیان دو پروتئین P38 Map Kinase و ATF-2 در نورون‌ها

در نمودار ۳ میزان بیان ATF-2 و P38 پس از مجاورت با Camptothecin در مقایسه با گروه کنترل افزایش می‌یابد. نتایج نشان می‌دهد که در ۴ ساعت تغییری در بیان P38 و ATF-2 وجود ندارد (۴۲/۴۰ ± و ۳ ± ۰/۰۹ درصد). در حالی که پس از ۶ ساعت بیان P38 و ATF-2 به ترتیب ۵۴/۲۰ ± و ۴۵/۲۰ ± درصد، در ۲۴ ساعت ۵۸/۴۰ ± و ۵۵/۳۰ ± درصد و در ۴۸ ساعت ۱۵/۳۰ ± و ۵۵/۴۵ ± درصد می‌گردد.

علاوه بر این مشخص شده که در پیام رسانی مرگ سلولی نورون‌های کورتکس، فعال شدن مسیر JNK نیز مهم است (۳، ۵، ۱۵) و همراه با افزایش فعالیت پروتیین JNK، افزایش بیان پروتیین c-Jun و همین‌طور فعال شدن این پروتیین از طریق فسفوریله شدن Ser ۷۳ اهمیت دارد (۷، ۱۶).

مسیرهای دیگر پیام رسانی همچون P38 نیز در مرگ نورونی سلول‌های هسته‌دار مخرجه (۵) و در نورون‌های سمپاتیک توسط Kainic acid (۷) در کورتکس و محرک‌های مختلف در سلول‌های PC۱۲ موش (۱۰) و در سلول‌های سرطانی انسان (۱۱) مطرح گردیده‌اند.

در این مطالعه مشخص شده که در مدل صدمه DNA توسط مهار توپوایزومراز نیز مسیر P38 دخیل است.

با توجه به اینکه یکی از پروتیین‌های پیام رسانی P38، c-Jun نیز است (۱۷، ۱۸)، افزایش بیان و فعالیت P38 علاوه بر اثر بر روی ATF-2 که در این مطالعه افزایش بیان آن مشخص شده که می‌تواند c-Jun را نیز فعال کند. بدین ترتیب P38 می‌تواند القای مرگ را علاوه بر ATF-2 از طریق c-Jun نیز القا کند. البته لازم به ذکر است که این مطالعه، تغییر در میزان فعالیت این آنزیم‌ها و ATF-2 را مطالعه نکرده است که با توجه به این نتایج نیازمند بررسی بیشتر است.

### نتیجه گیری

نتایج مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در مدل مرگ نورونی، پروتیین P38 و ATF-2 هر دو پس از القای مرگ، افزایش بیان دارند. علاوه بر آن پروتیین P38 زودتر از ATF-2 افزایش بیان نشان می‌دهد. با توجه به این که ATF-2 یکی از پروتیین‌های پایین دست P38 است و احتمال اینکه بیان زودتر P38 بر روی فعالیت ATF-2 نیز تاثیر گذارد، وجود دارد. این نتایج موید اهمیت مسیر P38 در مرگ نورونی القا شده توسط صدمه به DNA است. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که علاوه بر مسیرهای دیگر پیام رسانی، مسیر ATF-2 و P38 نیز در القای مرگ نورونی در این مدل دخیل هستند. این اثر ممکن است علاوه بر ATF-2 به مسیرهای دیگر نیز تداخل کند که نیازمند بررسی بیشتر است. با توجه به این نتایج مهار P38 و یا مهار بیان و عملکرد ATF-2 می‌تواند به عنوان یک هدف درمانی در مرگ نورونی کورتکس و احتمالاً بیماری‌های نورودژنراتیو مورد نظر قرار گیرد.

### تقدیر و تشکر

نویسندگان مراتب تقدیر و تشکر خود را از مساعدت‌های صمیمانه معاونت محترم آموزشی و پژوهشی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران، جناب آقای دکتر سید ناصر استاد ابراز می‌نمایند.

در حالی که بیان این پروتیین‌ها در گروه کنترل حداکثر نزدیک به ۲۰ درصد می‌رسد که با ساعت‌های دیگر اختلاف معنی‌داری ندارند. با توجه به روند افزایش بیان و مقایسه آن با درصد بقا در این نورون‌ها پس از صدمه DNA مشخص می‌گردد که افزایش بیان ATF-2 و P38، رابطه مستقیم با مرگ نورون‌ها دارد. البته لازم به ذکر است که افزایش بیان P38 معنی‌دار بوده و بیان آن بیشتر از ATF-2 می‌باشد.

### بحث

نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که در مدل صدمه DNA با استفاده از Camptothecin، مرگ نورون‌های کورتکس در کشت اولیه این سلول‌ها اتفاق می‌افتد. روند مرگ نورونی قابل مقایسه با مطالعات دیگر است (۷، ۸، ۱۲). عمل مهار Camptothecin بر توپوایزومراز I موجب می‌شود که عملکرد این آنزیم مختل گردد و مشخص شده است که در سلول‌های نرمال و توموری این دارو موجب مرگ Apoptosis می‌گردد (۱۳، ۱۴). در سلول‌های نورونی القای مرگ نیز از همین طریق اتفاق می‌افتد با این تفاوت که در این نورون‌ها، به کار افتادن چرخه سلولی موجب القای مرگ می‌گردد. در این مطالعه، کشت اولیه نورون‌های کورتکس مجاور شده با Camptothecin تا ۴ ساعت مرگ مشاهده نمی‌شود و پس از ۶ ساعت مرگ قابل تشخیص است. این مرگ به صورت تراکم کروموزومی و تراکم شدن هسته تا ۲۴ ساعت و قطعه قطعه شدن سلول و تخریب ساختمان سلول پس از ۲۴ ساعت مشخص است (شکل ۳ و ۴، نمودار ۱ و ۲). بررسی بیان پروتیین‌های P38 و ATF-2 که اولی پروتیین کینازی جهت فعال کردن مسیرهای پایین دست از جمله ATF-2 و دومی یک فاکتور نسخه‌برداری است که توسط مسیرهای القا استرس فعال می‌شود، نشان می‌دهد که پس از القای مرگ در نورون‌ها، بیان این پروتیین افزایش می‌یابد (نمودار ۳). مطالعات نشان داده که مسیر P38 توسط محرک‌های استرس فعال می‌شود که فعال شدن این آنزیم از طریق فسفوریله شدن Tyf-۱۸۲ و Thr-۱۸۰ است (۱۵).

از طرف دیگر فعال شدن P38 می‌تواند موجب افزایش فعالیت ATF-2 و فسفوریله شدن این پروتیین گردد (۶).

در این مطالعه مشخص شده که محرک صدمه به DNA، بیان P38 و ATF-2 را افزایش می‌دهد که هر دو این پروتیین‌ها می‌توانند مسیر (استرس اکتیویتد پروتیین کیناز) P38/SAPK را فعال کنند. علاوه بر این نتایج این مطالعه نشان می‌دهد که بیان ATF-2 نیز افزایش می‌یابد. مطالعات دیگر در رابطه با اثر محرک‌های استرس بر مرگ سلولی موید فعال شدن و فسفوریله شدن ATF-2 بوده است (۱۲، ۱۸) اما نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که افزایش بیان پروتیین نیز اتفاق می‌افتد (نمودار ۳). مطالعات قبل در این مدل نشان داده که القا مرگ توسط Camptothecin همراه با افزایش بیان P53 و Bax است (۱، ۹).



### References

- Ghahremani MH, Keramaris E, Shree T, Xia Z, Davis RJ, Flavell R, Slack RS, Park DS: Interaction of

- the c-Jun/JNK pathway and cyclin-dependent kinases in death of embryonic cortical neurons evoked by DNA damage. *J Biol Chem*, 2002; 277: 35586–35596
2. Paxinos G, Tork I, Tecott LH: Atlas of developing rat brain. Academic press, 1991; 52-54
  3. Eilers A, Teng B, Qin W, Ansari HR: Role of the Jun kinase pathway in the regulation of c-Jun expression and apoptosis in sympathetic neurons. *J Neurosci*, 1998; 78: 1713-1724
  4. Sano Y, Akimaru H: Drosophila ATF-2 is involved in stress response via activation by P38, but not JNK. *Mol Biol Cell*, 2003; 2: 35-42
  5. Yamagishi S, Yanada M: P38 mitogen-activated protein kinase regulates low potassium-induced c-jun phosphorylation and apoptosis in culture cerebellar granule neurons. *J Biol Chem*, 2001; 276: 5129-5133
  6. Ouwens DM, Ruitter ND: Growth factors can activate ATF-2 via a two-step mechanism. phosphorylation of Thr 71 through the Ras-MEK-ERK pathway and of Thr 69 through Ral-GDS-Src-P38. *EMBO J*, 2002; 21: 3782-3793
  7. Kanamoto T, Kale VP, Vaidya AA: Role of apoptosis signal-regulating kinase in regulation of the c-Jun N-terminal kinase pathway and apoptosis in sympathetic neurons. *Mol Cell Biol*, 2000; 20: 196-204
  8. Kyriakis JM, Avruch J: Mammalian mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways activated by stress and inflammation. *Physiol Reviews*, 2001; 81: 807-826
  9. Keramaris E, Hirao A, Slack S, Mak T, Park D: Ataxia telangiectasia -mutated protein can regulate p53 and neuronal death independent of Chk2 in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 2003; 278: 37782–37789
  10. Rukenstein A, Rydel R, Greene L: Multiple agents rescue PC12 cells from serum-free cell death by Translation- and transcription-independent mechanisms. *J Neurosci*, 1991; 11: 2552-2583
  11. Sonnenschein C, Soto A: The role of estrogens on the proliferation of human breast tumour cells (MCF-7). *J Stero Biochem*, 1985; 23: 87-94
  12. Girish V, Borasio GD: Intrinsic and extrinsic pathway signaling during neuronal apoptosis. *J Cell Biol*, 2002; 157: 1075-1085
  13. Morris EJ, Geller HM: Induction of neuronal apoptosis by camptothecin, an inhibitor of DNA topoisomerase I. *J Cell Biol*, 1996; 134: 754-770
  14. Fan Y: Molecular modeling studies of the DNA topoisomerase I ternary cleavable complex with camptothecin. *J Med Chem*, 1998; 41: 2216-2226
  15. Mielka K, Avruch J: Activation of JNK and P38 stress kinase, jun phosphorylation and c-Jun /AP-1 DNA binding activity following kainic acid induced seizures. *Neurosci*, 1999; 91: 48310-49000
  16. Ogita K, Nittay Y, Yoned Y: In vivo activation of c-Jun N-terminal kinase signaling cascade prior to granule cell death induced by trimethyltin in the dentate gyrus of mice. *Neuropharmacol*, 2004; 47: 619-630
  17. Papassava P, Gorgoulis VG, Zoumpourlis V: Overexpression of activating transcription factor-2 is required for tumor growth and progression in mouse skin tumor. *Cancer Res*, 2004; 64: 8573-8584
  18. Sano Y, Akimaru H: Drosophila ATF-2 is involved in stress response via activation by P38, but not JNK. *Mol Biol Cell*, 2003; 92: 57-69

