القاء سنتز محافظت کننده نورونی TGFβ در آستروسیتها با مهار اختصاصی آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز"(GSK3β)

آزیتا پروانه تفرشی*[۱،]، علی یار پیروزی[۲]، فاطمه کاشانی[۲]، شمیلا درویشعلیپور[۱] و بهمن زینلی*[۲،]

[۱] تهران، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

[۲] تهران، دانشگاه تهران، پردیس علوم، دانشکده زیست شناسی، گروه تکوین

تاریخ دریافت: ۸۶/۷/۲۷ تاریخ پذیرش: ۸۹/۶/۲

چکیده

آستروسیتها عمده سلولهای گلیال تشکیل دهنده سیستم عصبی مرکزی و با تعداد تقریبی ده برابر نسبت به نورونها دارای عملکرد حفاظت از نورونها در برابرآسیب دیدگیها هستند. یافته های متعددی ارتباط مستقیم بین مرگ آستروسیتها وپیشرفت سریع بیماریهای neurodegenerative را نشان می دهند. آنزیم گلیکوژن سنتاز کیناز"(GSK3β)" به عنوان مولکول کلیدی نقش مهمی را در کنترل بسیاری از پروسه های تکوین نظیر تمایز، مهاجرت و مرگ سلولی ایفاء می کند. مهار GSK3β در فعال شدن مسیرهای پیام رسانی درون سلولی از جمله مسیرهای Wnt و PI_3K-Akt نقش اساسی داشته و افزایش میزان آن باعث اختلال درمسیرهای پیام رسانی و بروز بیماریهای neurodegenerative مانند آلزایمر و پارکینسون میشود. در این تحقیق به منظور بررسی نقش احتمالی GSK3β در ترشح فاکتور محافظت کننده نورونی TGFβ از آستروسیتها درمحیط in vitro، از BIO به عنوان مهارکننده اختصاصی GSK3β استفاده گردید و تأثیر آن بر میزان بیان $TGF\beta_1$ و$TGF\beta_2$ مورد بررسی قرار گرفت. سلولهای آستروسیت ناحیه کورتکس مغز نوزاد ۲-۱ روزه موش صحرایی نژادWistar با غلظتهای ۱μM، ۰/۵ μM و۰/۱ μM BIO تیمار شدند و پس از ۴۸ ساعت به وسیله تریپسین ۰/۲۵ درصد جدا، RNA آنها استخراج و جهت real time RT-PCR مورد استفاده قرار گرفت. نتایج آزمایشات این تحقیق نشان داد که BIO سنتز $TGF\beta_1$ و$TGF\beta_2$ در سلولهای آستروسیت را در مقایسه با سلولهای شاهد افزایش داده است. این امر مؤید آن است که مهار GSK3β در آستروسیتها برای عملکرد آنها در محافظت از نورونها ضروری است.

واژه های کلیدی: GSK3β، BIO ، آستروسیتها، TGFβ

* نویسنده مسئول، تلفن: ۴۴۵۸۰۳۷۶-۰۲۱، پست الکترونیکی:tafreshi@nigeb.ac.ir

مقدمه

سیستم عصبی مرکزی در مهره داران از دو نوع سلول اصلی نورونها و گلیاها تشکیل شده است. تعداد گلیاها بسیار بیشتر از نورونها بوده و آستروسیتها به عنوان یکی از مهم ترین سلولهای گلیا دارای عملکردهای بسیار زیادی هستند. این سلولها فیلامنت حد واسطی به نام glial (fibrillary acidic protein) GFAP را بیان کرده که به واسطه آن از سایر سلولهای گلیال افتراق داده می شوند. از مهم ترین عملکردهای آستروسیتها حفاظت از نورونها در برابر آسیب دیدگیهاست. در هنگام آسیب دیدگیهای مغزی این سلولها فعال (reactive) شده واز لحاظ مورفولوژی و عملکرد دچار تغییر می شوند. سطح فاکتورهای رشد بیان شده در آستروسیتها نظیر نوروتروفینها، TGF و فاکتور رشد اپیدرمال با شروع آسیب دیدگی به میزان زیادی افزایش می‌یابد و بر روی مهاجرت، تکثیر و هیپرتروفی آستروسیتها

Archive of SID

www.SID.ir

اثر می‌گذارد (۱۸).

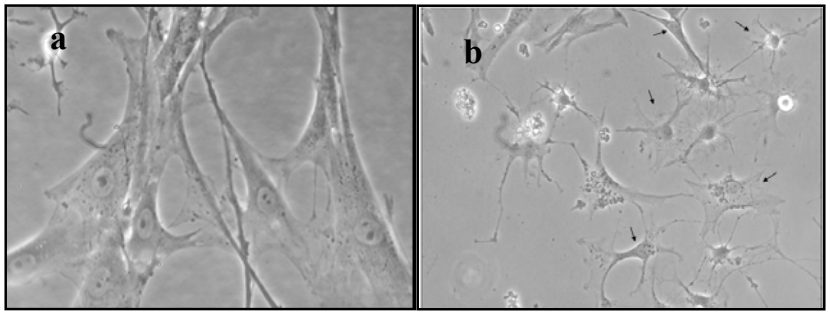
تحقیقات نشان داده است که افزایش در زواید آستروسیتها، بیان GFAP و فاکتورهای محافظت کننده نورونی نظیر $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ باعث افزایش بقای نورونها می گردد(۵). بنا بر گزارش سایر محققین، حضور آستروسیتها در محیطهای بدون سرم، از مرگ زودرس نورونها جلوگیری می کند و باعث افزایش مقاومت آنها در مقابل آپوپتوزیس می شود (۵). مطالعات نشان می دهد که در بیماریهای نورودژنراتیو neurodegenerative مانند آلزایمر، فعالیت آنزیم GSK-3β، یکی از عوامل کلیدی مهم در مسیرهای سیگنال دهی متعددی نظیر مسیر Wnt و PI3K/Akt در آستروسیتها افزایش می یابد(۱۷). با توجه به اینکه مهار فعالیت این آنزیم در افزایش بقای نورونی مؤثر گزارش شده است (۳ و ۱۹) از داروهای مختلف مهار کننده GSK3 نظیر Carbamazepine , Haloperidol, Lamotrigine,Valproate در درمان اختلالات روانی (Psychiatric) استفاده شده است. (۲۸) در مطالعه حاضر از مهارکننده اختصاصی و فارماکولوژیک BIO، GSK-3 (6-bromoindirubin-3 mono oxime)استفاده گردید. BIO اولین بار در سال ۲۰۰۳ کشف و گزارش شد(۲۱). این ماده از خانواده indigo وایزومرهای indirubin است که از منابع طبیعی نظیر نوعی حلزون از خانواده شکم پایان (Gastropod Molusca) استخراج می شود (۱۲ و ۲۹). استفاده کلینیکی از indirubin و آنالوگهای محلول آن در مطالعات پیشین نشان دهنده خاصیت ضد توموری این ترکیبات علیرغم سمیت محدودی آنها است و لذا BIO می تواند به عنوان مهارکننده اختصاصی و فارماکولوژیک GSK-3 عمل کند. نتایج تحقیقات در سلولهای بنیادی جنینی موش نشان داد که BIO با مهار GSK-3β سبب حفظ بیان فاکتورهای نسخه برداری نظیر Rex-1, Oct-3/4 و Nanong می‌شود. با توجه به اینکه بیان این فاکتورهای نسخه برداری از مشخصات سلولهای بنیادی پرتوان است، BIO با حفظ بیان این فاکتورها، سلولهای بنیادی را در وضعیت تمایز نیافته نگه می دارد (۲۵). مطالعات انجام شده بر روی سلولهای بنیادی جنینی اخذ شده از موشهای فاقد GSK-3، نشان داده است که تمایز این سلولها دچار اختلال می‌شود (۱۶). نظر به نقش کلیدی و دخالت GSK-3β در مسیرهای سیگنال دهی Wnt و PI3K/Akt، در این تحقیق از BIO به عنوان مهار کننده اختصاصی GSK-3β در محیط کشت آستروسیتها استفاده شد و سنتز فاکتورهای محافظت کننده نورونی $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روشها

کشت آستروسیتها: مغز نوزاد ۲-۱ روزه Wistar rat (انستیتو پاستور ایران) از جمجمه خارج و پس از حذف منتژ، ناحیه کورتکس آن جدا و در HBSS (محلول بدون منیزیم و کلسیم ;Hank's buffered saline solution) شستشو داده شد. با پیپتاژ کردن مکرر تکه های کوچک مغز در DMEM حاوی۱۰ درصد سرم جنین گاوی (FBS)، پنی سیلین واستریتومایسین (۱ درصد) مغز به صورت کاملا" هموژن در آمده و در انکوباتور (CO2 ۵ درصد) ودمای ۳۷ درجه سانتیگراد کشت داده شدند. پس از مدت ۸-۷ روز و رسیدن سلولها به ۷۰ درصد confluency، سلولهای آستروسیت از دیگر سلولها به روش تریپسینه کردن خالص شدند. این سلولها سریع تر از سایر گلیالها بر اثر تریپسینه شدن (حدود سه الی چهار دقیقه) از کف فلاسک جدا شده و در نتیجه به علت اختلاف در مقاومت به تریپسینه شدن از سایر سلولهای گلیال قابل خالص شدن هستند. بررسیهای مورفولوژیکی با استفاده از میکروسکوپ فاز کنتراست نشان داد که این سلولها مشخصات سلولهای آستروسیتی یعنی شکل ستاره ای و زواید چندگانه را دارند (شکل ۱). درصد خلوص سلولهای جدا شده در سطح مولکولی و با استفاده از بررسی بیان GFAP به روش ایمونوسیتوشیمی مورد ارزیابی قرار گرفت.

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱- a) مورفولوژی سلولهای گلیا، ۶ روز پس از کشت.. b) مورفولوژی سلولهای آستروسیت ۲ روز پس از خالص سازی. با استفاده از میکروسکوپ اینورت Zeiss و بزرگنمایی ۲۰x

ایمونوسیتوشیمی (GFAP immunocytochemistry GFAP): تشخیص GFAP در آستروسیتها به روش ایمونوسیتوشیمی و با استفاده از آنتی‌بادی اختصاصی GFAP (Sigma) و به صورت زیر انجام گرفت. ابتدا سلولها بر روی Cover slip های موجود در چاهک پلیتها، کشت داده شدند و بعد از چسبیدن سلولها بر روی Cover slip مراحل زیر انجام شد: دو بار شستشو با PBS، تثبیت در پارافرمآلدئید چهار درصد به مدت ۱۵ دقیقه در دمای چهار درجه سانتی‌گراد، شستشو با PBST (PBS+Tween)، نفوذ پذیر کردن سلولها در محلول ۲ درصد Triton X-100 به مدت پنج دقیقه در دمای اتاق، شستشو با PBST در ۴ درجه سانتی‌گراد، انکوباسیون به مدت ۴۵ دقیقه با محلول ۱۰ درصد goat serum تهیه شده در PBST در دمای اتاق، سپس انکوبه کردن سلولها با آنتی‌بادی اولیه GFAP (رقیق شده در PBS حاوی .۰/۵ درصد BSA به مدت ۶۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، دوبار شستشو با محلول PBST به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق، انکوباسیون به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد با آنتی‌بادی ثانویه IgG کونژوگه شده با FITC (DAKO) رقیق شده در۰/۵٪ BSA در PBS (۱:۲۰۰)، شستشو با PBST به مدت ده دقیقه در دمای اتاق و تاریکی وسپس رؤیت با میکروسکوپ فلورسنس.

تیمار سلولهای آستروسیت با مهار کننده اختصاصی GSK3β (BIO) : سلولهای آستروسیت به وسیله BIO (مهار کننده اختصاصی GSK3β (Calbiochem), با غلظتهای ۱μM، ۰/۵ μM و۰/۱ μM تیمار شدند. اساس انتخاب غلظتها بر پایه مطالعه Meijer و همکارانش (۲۱) بود. ۴۸ ساعت پس از تیمار، سلولها به وسیله تریپسین ۰/۲۵ درصد جدا و RNA آنها با استفاده از Trizol (Invitrogen) استخراج شد.

سنتز cDNA و **RT-PCR** : از RNAهای استخراج شده، cDNA تحت شرایط و برنامه زیر سنتز شد:

cDNA	Primer (Forward,Reverse)	Taq	$MgCl_2$ (۵۰mM)	Buffer (۱۰x)	dH2O	dNTP (۱۰mM)
۳μl	۲μl	۰/۲μl	۱μl	۲μl	۱۱μl	۱μl

(۷۰ºC : ۱۰' ، ۲h:۴۲ºC ،۱۰':۲۵ºC و ۵':۷۰ºC). سپس PCR بر طبق برنامه زیر و با استفاده از پرایمرهای (شرکت روبین گستر) زیر صورت گرفت. پرایمرهای β اکتین به عنوان کنترل داخلی در نظر گرفته شدند. طول amplicon های بتا اکتین ۷۲ bp ،$TGF\beta_1$ ۸۷ bp ،$TGF\beta_2$ ۷۳ bp مناسب برای real time PCR بودند.

Archive of SID
www.SID.ir

TGFβ1 forward:5- CCT GGA AAG GGGC TCA ACA C-3
TGFβ1 Reverse:5- CAG TTC TTC GTG GAG CTGA-3
$TGF\beta_2$ forward:5-AGT GGG CAG CTTTTG CTC-3

$TGF\beta_2$ Reverse: 5-GTA GAA AGT GGG GGG GAT -3
Actin β forward: 5-CCC GCG AGT ACA ACC TTC T-3
Actin β Reverse: 5-CGT CAT CCA TGG CGA ACT-3

Taq	cDNA	Primer (F,R) 5 pmol	dNTP	$MgCl_2$	Buffer	dH2O
۰/۲µl	۵µl	۲ µl	۱ µl	۱ µl	۲ µl	۹/۸ µl

۷۲ºC : ۵'، ۷۲ ºC): ۲'، ۵۸ºC: ۱'، ۹۵ ºC:۱') ۳۵ سیکل، و ۹۵ºC:۵'

Real time-PCR: real time-PCR با استفاده از کیت Roche (cat# 04673484001)انجام شد که مواد و مقادیر مصرف شده درآن عبارت بودند از (master mix) ۴µl، µl ۲primer، (cDNA) ۵µl، H_2O µl ۹ با حجم نهایی۲۰µl. واکنش real time PCR برای ژنهای TGFβ1 وTGFβ2 طبق برنامه زیر انجام گرفت: ۹۵ºC:۱۰'، (۷۲ ºC: "۱۵ ۶۳ºC: "۳۰) ۵۰ سیکل و ۷۲ ºC :۵'. برای ژن بتا اکتین واکنش real time PCR طبق برنامه زیر انجام گرفت: ۹۵ºC ۱۰' (۷۲ºC ۱۵":، ۶۰ºC ۱۵": ºC a few seconds, ۹۵) ۵۰ سیکل و ۷۲ ºC: ۴۰"

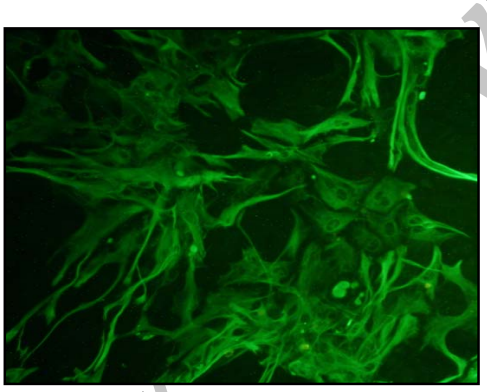
آنالیز کمی و آماری داده ها: آنالیز کمی داده ها با استفاده از فرمول ارائه شده توسط Pfaffl و همکارانش (۲۰۰۳) صورت گرفت(۲۴). اساس این برنامه بر پایه فرمول زیر است که پس از به دست آمدن CT ها می توان محاسبات کمی را انجام داد.

$$ratio = \frac{(E_{target})^{\Delta Ct\ target\ (control-treated)}}{(E_{ref})^{\Delta Ct\ ref\ (control-treated)}}$$

در این فرمول Efficiency به صورت E و آستانه سیکل (Cycle Threshold ؛ سیکلی که در آن فلورسنس نمونه به حد آستانه می رسد) به صورت Ct همچنین ژن هدف (TGFβ1 وTGFβ2) به صورت target و ژن رفرانس (بتا اکتین) به صورت ref نمایش داده شده است. Ct معمولا" نسبت عکس با میزان غلظت نمونه دارد. داده ها پس از سه بار تکرار real time و به صورت Mean±SE به دست آورده شدند و با استفاده از نرم افزار SPSS و آزمون ANOVA تعیین P value گردیدند و P<0.05 های معنی دار در نظر گرفته شدند.

نتایج

بیان پروتئین GFAP در آستروسیتهای خالص شده: با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی بیان پروتئین GFAP مورد آزمون قرار گرفت. همان طور که در شکل ۲ مشاهده می گردد، سلولهای آستروسیت بیان کننده GFAP بوده و در زیر نور فلورسنس به صورت سبز درخشان ظاهر می شوند.

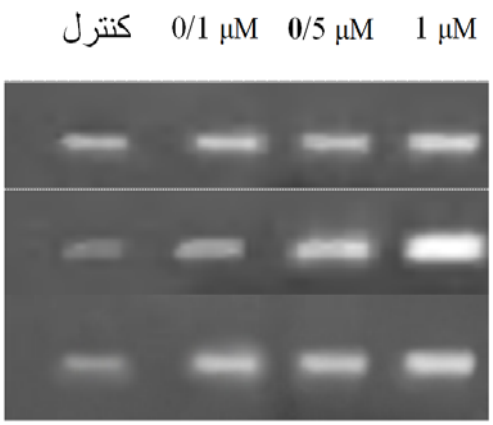


شکل ۲- ایمونوراکتیویته GFAP در سلولهای آستروسیت با استفاده از تکنیک ایمونوسیتوشیمی. سلولهای آستروسیت از کورتکس مغز نوزاد ۲ روزه کشت شده در محیط DMEM، پروتئین GFAP (نشان گر سلولهای آستروسیتی) را به طور اختصاصی بیان میکنند. (میکروسکوپ Zeiss، بزرگنمایی ۲۰x)

افزایش بیان $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ در سلولهای آستروسیت تیمار شده با BIO : تیمار آستروسیتها با غلظتهای ۱µM، ۰/۵ µM و۰/۱ µM ازBIO به مدت ۴۸ ساعت منجر به افزایش در بیان $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ نسبت به بیان ژن house

www.SID.ir

keeping (بتا اکتین) می شود. این افزایش در بیان در تصویر ژل محصولات نهایی real time PCR نیز مشاهده می شود (شکل ۳). نتایج کمی حاصل از real time PCR در جدول ۱ نشان داده شده است. میزان بیان $TGF\beta_1$ در غلظتهای ۱μM، ۰/۵ μM و۰/۱ μM از BIO به ترتیب ۱.۳، ۳.۴، ۶.۴ برابر افزایش و میزان بیان $TGF\beta_2$ در غلظتهای ۱μM، ۰/۵ μM و۰/۱ μM از BIO به ترتیب ۲.۱ ۴.۱ ۷.۱ برابر شده است.



شکل ۳- اثر BIO بر بیان ژنهای فاکتورهای محافظت کننده نورونی $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ در آستروسیتها: سلولهای آستروسیت با غلظتهای ۰/۱μM، ۰/۵μM و۱μM از BIO به مدت ۴۸ ساعت تیمار شده و سپس RNA آنها استخراج و RT-PCR گردید. همانطور که مشاهده می شود به تناسب افزایش غلظتهای BIO، سلولهای آستروسیت تیمار شده در مقایسه با سلولهای شاهد میزان بیشتری از فاکتورهای محافظت کننده نورونی $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ را بیان میکنند. تیمار با BIO تاثیری بر بیان ژن بتا اکتین نداشته است.

جدول۱- نتایج آماری حاصل از real time PCR مربوط به بیان فاکتورهای محافظت کننده نورونی$TGF\beta_2$ و$TGF\beta_1$ در آستروسیتهای تیمار شده باBIO: در نمونه های تیمار شده با غلظتهای ۰/۱μM، ۰/۵μM و ۱μM از BIO. میزان محصول PCR برای ژن $TGF\beta_1$ به ترتیب ۱/۳، ۳/۴، ۶/۴ برابر افزایش و برای ژن $TGF\beta_2$ به ترتیب ۲/۱، ۴/۱ ، ۷/۱ برابر افزایش نسبت به نمونه کنترل را نشان میدهد ($P<0.001$) .

BIO (μM)	Control (beta actin)	BIO treated (beta actin)	Control (TGF beta 1)	Target (TGF beta 1)	Ratio mean
۰/۱μM	۱۳/۶۵	۱۲/۹	۳۲/۴۳	۳۰/۳	۱/۳
۰/۵ μM	۱۳/۱	۱۲/۵	۳۲	۲۸/۱	۳/۴
۱μM	۱۲/۳	۱۱/۸	۲۸	۲۷/۴	۶/۴

BIO (μM)	Control (beta actin)	BIO treated (beta actin)	Control (TGF beta ۲)	Target (TGF beta ۲)	Ratio mean
۰/۱μM	۱۳/۶۵	۱۲/۹	۳۰/۱	۳۰	۲/۱
۰/۵ μM	۱۳/۱	۱۲/۵	۲۹	۲۹	۴/۱
۱ μM	۱۲/۳	۱۱/۸	۳۳/۱	۲۷/۷	۷/۱

بحث

بیماریهای نورودژنراتیو از قبیل آلزایمر و پارکینسون با تأثیر بر سیستم عصبی مرکزی باعث القاء آپوپتوزیس در نورونها شده و لذا سالیانه باعث مرگ افراد زیادی می گردد. از مکانیسمهای فیزیولوژیک برای مقابله با اثرات تحلیل نورونی در این بیماریها، می توان فعال شدن سلولهای

Archive of SID
www.SID.ir

گلیال و مسیرهای سیگنال دهی مختلف فعال شده توسط این سلولها را نام برد. مطالعات *in vitro* نشان داده است که آستروسیتها در مقابل آسیب دیدگی مقاومت زیادتری نسبت به نورونها دارند. به محض شروع آسیب دیدگی در سیستم عصبی مرکزی، آستروسیتهای فعال شده جهت بهبود ناحیه آسیب دیده وارد عمل می شوند(۲، ۸، ۱۴ و ۳۰). در شرایط آسیب دیدگی سیستم عصبی مرکزی، گلوتامات که یک نوروترانسمیتر تحریکی است در سطح مغز به میزان زیادی افزایش یافته که در صورت عدم خروج از سیستم عصبی به عنوان عامل مخرب عمل می کند. آستروسیتهای فعال یکی از عوامل خارج کننده این گلوتامات اضافی از سیستم هستند(۱۰). بعلاوه آستروسیتها به عنوان منبع اصلی ترشح کننده فاکتورهای محافظت کننده نورونی در کنترل بقای نورونها وارد عمل می شوند (۱۳). از فاکتورهای محافظت کننده نورونی ترشح شده توسط آستروسیتها می‌توان به $TGF\beta_1$، $TGF\beta_2$، GDNF، BDNF و NT3 اشاره کرد(۹). اکثر این فاکتورها دارای رسپتورهایی با خاصیت کینازی میباشند که منجر به فعال شدن مسیرهای پیام رسانی درون سلولی می گردد. یکی از عوامل مهم مسیرهای سیگنال دهی، آنزیم گلیکوژن سنتآزکیناز (GSK-3β) است که یک سرین- ترئونین کیناز بوده و مهار فعالیت آن از طریق فسفریله شدن (۲۳) منجر به فعال شدن مسیرهای پیام رسانی درون سلولی از جمله مسیرهای Wnt و PI_3K-Akt می شود. مطالعات نشان می دهد در بیماریهای نورودژنراتیو مانند آلزایمر فعالیت GSK-3β افزایش می یابد که منجر به هیپرفسفریله شدن پروتئینی بنام Tau شده و لذا کلافهای نوروفیبریلاری (NFT;از عوامل مرگ نورونی در بیماری آلزایمر) تشکیل می شود (۱، ۴، ۶ و ۷). نتایج تحقیقات نشان می دهد که آنزیم GSK3β در سلولهای آستروسیت به صورت فعال وجود داشته و لذا استفاده از مهارکننده های این آنزیم در سلولهای آستروسیت میتواند بر سنتز فاکتورهای محافظت کننده نورونی مؤثر باشد. Sutherland وهمکارانش (۲۷) نشان دادند که اضافه کردن ATP به محیط کشت سلولهای آستروسیت باعث فسفریله شدن سرین شماره ۹ در GSK3β و کاهش فعالیت آن می گردد(۲۷). تحقیقات Dhandapani و همکارانش در سال ۲۰۰۳ نشان داد که GSK3β در آستروسیتهای تحت تأثیر 17-β estradiol، مهارشده و موجب فعال شدن مسیر سیگنال دهی PI3K/Akt و افزایش بیان فاکتورهای محافظت کنندهٔ نورونی $TGF\beta_1$ و $TGF\beta_2$ می گردد (۱۳). با توجه به اهمیت GSK-3β در چند مسیر سیگنال دهی دیگر، در این پژوهش از BIO به عنوان مهارکننده GSK-3β استفاده و سنتز فاکتورهای محافظت کننده نورونی توسط آستروسیتها مورد سنجش قرار گرفت. BIO از خانواده indigo و ایزومرهای indirubin است که از منابع طبیعی نظیر نوعی حلزون از خانواده شکم پایان (Gastropod Molusca) استخراج می شود(۲۲). مطالعات اولیه نشان داده است که BIO می تواند به عنوان مهارکننده اختصاصی و فارماکولوژیک GSK-3β عمل کند(۲۰). در این تحقیق آستروسیتهای خالص شده از کورتکس مغز نوزاد دو روزه rat تحت تأثیر BIO قرار گرفته و سنتز فاکتورهای $TGF\beta_1$ و$TGF\beta_2$ بوسیله تکنیکهای RT-PCR وReal-time PCR مورد سنجش قرار گرفتند. آستروسیتها با غلظتهای ۰/۱μM، ۰/۵μM و ۱μM ازماده BIO به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. نتایج به دست آمده از تکنیک Real-time PCR نشان داد که به تناسب افزایش غلظتهای BIO و لذا افزایش درمهار GSK3β، افزایش قابل توجهی در بیان فاکتورهای $TGF\beta_1$ و$TGF\beta_2$ حاصل می شود. در توافق با نتایج به دست آمده، تحقیقات Sinha و همکارانش (۲۶) نیز وجود ارتباط مستقیم بین مهار آنزیم GSK-3β و افزایش بیان فاکتورهای رشد را تأیید می کند. آنها با استفاده از BIO به عنوان مهار کنندهٔ آنزیم GSK-3β افزایش بیان فاکتور شبه انسولینی(IGF) را در سلولهای اپی تلیال کلیه نشان دادند که ناشی از فعال شدن مسیر سیگنال دهی PI_3K/Akt و در نهایت افزایش بقاء سلولی بود(۱۵).

Archive of SID

www.SID.ir

Chin و همکارانش نیز در سال ۲۰۰۳ نشان دادند پروتئینهای Wnt با مهار آنزیم GSK-3β باعث افزایش بیان IGF و مهار آپوپتوزیس می شوند(۱۱). در مجموع می توان مهار GSK-3β در آستروسیتها را مسببی برای افزایش بیان فاکتورهای محافظت کننده نورونی نظیر $TGF\beta_1$ و$TGF\beta_2$ قلمداد کرد ولذا با مهار آن به بهبودی بخشهای آسیب دیده CNS و افزایش بقاء نورونی امیدوار بود.

منابع

1- Aghdam, S.Y. and S.W. Barger, Glycogen synthase kinase-3 in neurodegeneration and neuroprotection: lessons from lithium. Curr Alzheimer Res, 2007. 4(1): p. 21-31.

2- Alam, H.B., et al ,.Profound hypothermia protects neurons and astrocytes, and preserves cognitive functions in a Swine model of lethal hemorrhage. J Surg Res, 2005. 126(2): p. 172-81.

3 - Alvarez, A.R., et al., Wnt-3a overcomes beta-amyloid toxicity in rat hippocampal neurons. Exp Cell Res, 2004. 297(1): p. 186-96.

4 - Alvarez, G., et al., Regulation of tau phosphorylation and protection against beta-amyloid-induced neurodegeneration by lithium. Possible implications for Alzheimer's disease. Bipolar Disord, 2002. 4(3): p. 153-65.

5 - Aschner, M ,.U. Sonnewald, and K.H. Tan, Astrocyte modulation of neurotoxic injury. Brain Pathol, 2002. 12(4): p. 475-81.

6 - Asuni, A.A., et al., GSK3alpha exhibits beta-catenin and tau directed kinase activities that are modulated by Wnt. Eur J Neurosci :(۱۲)۲۴ .۲۰۰۶ , p. 3387-92.

7 - Bhat, R.V. and S.L. Budd, GSK3beta signalling: casting a wide net in Alzheimer's disease. Neurosignals, 2002. 11(5): p. 251-61.

8 - Chen, L.W., K.L. Yung, and Y.S. Chan, Reactive astrocytes as potential manipulation targets in novel cell replacement therapy of Parkinson's disease. Curr Drug Targets, 2005. 6(7): p. 821-33.

9 - Chen, P.S., et al., Valproate protects dopaminergic neurons in midbrain neuron/glia cultures by stimulating the release of neurotrophic factors from astrocytes. Mol Psychiatry, 2006. 11(12): p. 1116-25.

10 - Chen, Y. and R.A. Swanson, Astrocytes and brain injury. J Cereb Blood Flow Metab, 2003. 23(2): p. 137-49.

11 - Chin, P.C., N. Majdzadeh, and S.R. D'Mello, Inhibition of GSK3beta is a common event in neuroprotection by different survival factors. Brain Res Mol Brain Res, 2005. 137(1-2): p. 193-201.

12 - Cooksey, C.J., Tyrian purple: 6,6'-dibromoindigo and related compounds .Mol., 2001. 6: p. 736-769.

13 - Dhandapani, K.M., et al., Astrocyte protection of neurons: role of transforming growth factor-beta signaling via a c-Jun-AP-1 protective pathway. J Biol Chem, 2003. 278(44): p. 43329-39.

14 - Dienel, G.A. and L. Hertz, Astrocytic contributions to bioenergetics of cerebral ischemia. Glia, 2005. 50(4): p. 362-88.

15 - Diviya Sinha, Z.W., 1 Kathleen L. Ruchalski,1 Jerrold S. Levine,2 Selvi Krishnan,1 Wilfred Lieberthal,1 John H. Schwartz,1,* and Steven C. Borkan1,*, Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors Am J Physiol Renal Physiol 2005. 288: p. F703–F713.

16 - Doble, B.W., et al., Functional redundancy of GSK-3alpha and GSK-3beta in Wnt/beta-catenin signaling shown by using an allelic series of embryonic stem cell lines. Dev Cell, 2007. 12(6): p. 957-71.

17 - Koh, S.H., M.Y. Noh, and S.H. Kim, Amyloid-beta-induced neurotoxicity is reduced by inhibition of glycogen synthase kinase-3. Brain Res, 2008 :۱۱۸۸ .p. 254-62.

18 - Liu, H.M., H.B. Yang, and R.M. Chen, Expression of basic fibroblast growth factor, nerve growth factor, platelet-derived growth

Archive of SID
www.SID.ir

factor and transforming growth factor-beta in human brain abscess. Acta Neuropathol, 1994. 88(2): p. 143-50.

19 - Liu, S.J., et al., Overactivation of glycogen synthase kinase-3 by inhibition of phosphoinositol-3 kinase and protein kinase C leads to hyperphosphorylation of tau and impairment of spatial memory. J Neurochem, 2003. 87(6): p. 1333-44.

20 - Meijer, L., et al., GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins. Chem Biol, 2003. 10(12): p. 1255-66.

21 - Meijer, L., et al., Inhibition of cyclin-dependent kinases, GSK-3beta and CK1 by hymenialdisine, a marine sponge constituent . Chem Biol, 2000. 7(1): p. 51-63.

22 - Meijer, L., M. Flajolet, and P. Greengard, Pharmacological inhibitors of glycogen synthase kinase 3. Trends Pharmacol Sci, 2004. 25(9): p. 471-80.

23 - Morrison, R.S., et al., Neuronal survival and cell death signaling pathways. Adv Exp Med Biol, 2002. 513: p. 41-86.

24 - Pfaffl, M.W., A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res, 2001. 29(9): p. e45.

25 - Sato, N., et al., Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. Nat Med, 2004. 10(1): p. 55-63.

26 - Sinha, D., et al., Lithium activates the Wnt and phosphatidylinositol 3-kinase Akt signaling pathways to promote cell survival in the absence of soluble survival factors. Am J Physiol Renal Physiol, 2005. 288(4): p. F703-13.

27 - Sutherland, C., I.A. Leighton, and P. Cohen, Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. Biochem J, 1993. 296 (Pt 1): p. 15-9.

28 - Sutton, L.P., et al., Activation of the canonical Wnt pathway by the antipsychotics haloperidol and clozapine involves dishevelled-3. J Neurochem, 2007. 102(1): p. 153-69.

29 - Tang, W., and Eisenbrand, G., Chinese Drugs of Plant Origin: Chemistry, Pharmacology, and Use in Traditional and Modern Medicine. 1992: Heidelberg, Germany: Springer-Verlag.

30 - Watts, L.T., et al., Astrocytes protect neurons from ethanol-induced oxidative stress and apoptotic death. J Neurosci Res, 2005. 80(5): p. 655-666.

Archive of SID

www.SID.ir

The effect of BIO, a specific GSK3-B inhibitor, on the expression of neuroprotective factor Tgfβ in cultured astrocytes

Parvaneh Tafreshi A.[1],Piroozi A.[2], Kashani F. [2], Darvishalipour S.[1] and Zeynali B.[2]

[1] The National Research Centre For Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, I.R. Of IRAN

[2] Developmental Biology Dept., Faculty of Sciences, Tehran, I.R. of IRAN

Abstract

Astrocytes are the most important glial cells of the central nervous system, ten times as much as neurons and with the ability of neuroprotection against injuries, ischemia, etc. Apoptosis of the astrocytes therefore leads to disease progression in neurodegenerative pateints such as Alzheimer's and Parkinson's diseases. Investigations on possible signaling pathway (s) involved in neuron death suggest that GSK3-β "glycogen synthase kinase-3β", a key molecule of the Wnt and PI-3 kinase signaling pathways, is considerably increased in neurodegenerative diseases. In this study we sought to determine if the expression of neuroprotective factors such as $TGF\beta_1$ and $TGF\beta_2$ in cultured astrocytes is altered by inhibition of GSK3-β. Different concentrations of BIO, a specific inhibitor of GSK3-β (0.1 μM, 0.5 μM and 1μM) were therefore used. The treated and control astrocytes were isolated after 48 hours and monitored for the expression of $TGF\beta_1^{mRNA}$ and $TGF\beta_2^{mRNA}$ using real-time RT-PCR. Our results show that the BIO treated cells express much higher amounts of $TGF\beta_1$ and $TGF\beta_2$ in comparison with the control cells. The increased expression of TGFβs following the inhibition of GSK3-β points at the involvement of GSK3-β in neuroprotective activity of astrocytes.

Keywords: GSK3β, BIO, astrocyte, TGFβ

Archive of SID

www.SID.ir