

## ارزیابی ارتباط بین سن و فعالیت پروتئین کیناز مشابه رنا در شبکه آندوپلاسمی (PERK) در مدل تراریخت بیماری آلزایمر

مریم غفاری<sup>۱</sup>، محمد حدادی<sup>۲</sup>، پریسا مالکی<sup>۳</sup>، نیما سندگل<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت ۱۳۹۹/۰۹/۰۱ تاریخ پذیرش ۱۴۰۰/۱۰/۰۹

### چکیده

**پیش‌زمینه و هدف:** آلزایمر شایع‌ترین فرم زوال عقل و بیماری تخریب‌کننده عصبی در افراد مسن است. در این مطالعه ارزیابی ارتباط سن با میزان بیان ژن ATF4 طی فرآیند پیری در مدل تراریخت آلزایمر بررسی گردید.

**مواد و روش‌ها:** ژن جهش‌یافته آمیلوئید بتای انسانی (hAβ42) توسط سیستم بیانی *GAL4/UAS* در دروزوفیلا بیان و جهت ایجاد مدل مگس‌های *UAS-Abβ42* با مگس‌های ماده *elav-GAL4* و یا *ok107-GAL4* لقاح داده شدند. تأیید مدل توسط بررسی شاخص برتری یادگیری (PLI) در لاروهای نسل اول و همچنین تغییر ساختار چشم مگس‌های بالغ انجام شد. در این مطالعه تحلیلی بیان ژن ATF4 در روزهای ۱۰، ۲۰ و ۳۰ توسط فن RT-PCR مورد ارزیابی قرار گرفت. **یافته‌ها:** ایجاد مدل آلزایمر توسط کاهش معنادار در PLI ( $P < 0.05$ ) و همچنین تخریب ساختارهای چشم مگس‌ها ( $P < 0.01$ ) تأیید شد. در این مدل با کاهش فعالیت سیستم *GAL4-UAS* در دمای پایین (۱۸ درجه سانتی‌گراد)، بیان ژن hAβ42 و سمیت آن در قبل از بلوغ کاهش داده شد ( $P < 0.05$ ) و با افزایش مجدد دما (۲۴ درجه سانتی‌گراد)، بیشترین بیان و سمیت این ژن در مغز مگس‌های بالغ دیده شد. بیان ژن ATF4 به‌صورت یکسانی در هر دو گروه سنی (روزهای ۲۰ و ۳۰) مگس‌های مدل نسبت به گروه کنترل افزایش معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) داشت.

**بحث و نتیجه‌گیری:** با توجه به این یافته که الگوی بیان ATF4 القا شده توسط سمیت hAβ42 با افزایش سن یکسان است، می‌توان نتیجه گرفت فرآیند پیری اثری بر فعالیت مسیر پیام‌رسانی PERK که مهم‌ترین عامل افزایش بیان ATF4 در شبکه آندوپلاسمی است ندارد. مطالعات تکمیلی بعدی می‌توانند نقش پیری را در فعال شدن سایر مسیرهای پاسخ به پروتئین‌های تا نخورده (ATF6 و IRE1) طی روند بیماری آلزایمر نشان دهند.

**کلیدواژه‌ها:** بیماری آلزایمر، دروزوفیلاملانوگاستر، آمیلوئیدبتای انسانی، فاکتور رونویسی ATF4

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و دوم، شماره هشتم، ص ۶۱۸-۶۰۷، آبان ۱۴۰۰

آدرس مکاتبه: دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، زابل، ایران، تلفن: ۰۹۱۵۷۴۴۴۶۹۶

Email: Sanadgol.n@gmail.com/n.sanadgol@uoz.ac.ir

### مقدمه

بیماری به‌طور بالقوه برای درمان هدفمند مورد استفاده قرار گیرند (۱). برخی دیگر از پروتئین‌های مرتبط با تخریب نورون در این روند عبارت‌اند از پروتئین آمیلوئید بتا، تائو، آلفا ساینوکلین و پروتئین سارکوما. مهم‌ترین اختلالات نوروزنیک مرتبط شامل بیماری آلزایمر، بیماری پارکینسون، اسکروز جانبی آمیوتروپیک، و بیماری هانتینگتون می‌باشند (۲). بیماری آلزایمر شایع‌ترین اختلال زوال عقل و ششمین علت مرگ در امریکا است که به‌عنوان یک بیماری مزمن نورودژنراتیو با مکانیسم‌های پاتوفیزیولوژیک،

بیماری‌های تخریب‌کننده نورون (نورودژنراتیو)، طیف وسیعی از اختلالات عصبی را در برمی‌گیرند که همراه با بسیاری از علائم، از جمله مشکلات گفتاری، حرکتی و شناختی هستند. این علائم به دلیل تحلیل رفتن سلول‌های عصبی در مغز و نخاع ایجاد گشته، در نقاطی که تخریب اتفاق می‌افتد، ویژگی‌های مولکولی بیماری مانند وجود پروتئین‌های تا نخورده نمایان می‌شود. این پروتئین‌ها و تغییرات بیوشیمیایی مرتبط با آن‌ها می‌توانند به‌عنوان بیومارکرهای

<sup>۱</sup> دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، زابل، ایران

<sup>۲</sup> دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، زابل، ایران

<sup>۳</sup> دانشگاه اراک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، اراک، ایران

<sup>۴</sup> دانشگاه زابل، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، زابل، ایران (نویسنده همسئول)

PERK، یک کیناز غشایی شبکه آندوپلاسمی است و فعال‌سازی آن به مهار مستقیم سنتز پروتئین از طریق فسفوریلاسیون eIF2 $\alpha$  منجر می‌شود. در طی فسفوریلاسیون eIF2 $\alpha$ ، برخی از mRNAها با ترجمه ضعیف که شامل چند چارچوب خوانش بالادست (uORF) هستند، به میزان زیاد ترجمه می‌شوند که بیان ATF4 را ممکن می‌سازند. ATF4 یک فاکتور رونویسی است که نه تنها در هومئوستازی اکسایش-کاهش در شبکه آندوپلاسمی، بیوسنتز آمینواسید، اتوفاژی و تا خوردن پروتئین دخیل است بلکه سرنوشت سلول را با القای فاکتور پرو آپوپتوز CHOP و پروتئین BCL-2 مشخص می‌کند. CHOP همچنین می‌تواند میزان سطح فسفوریلاسیون eIF2 $\alpha$  را در طی القای فسفاتاز GADD34 کاهش دهد (۹). با توجه به مشارکت عمده PERK در بیماری‌های سرطان و زوال عقل، مطالعات زیادی روی اهداف دارویی آن انجام گردیده (۱۰، ۱۱). مولکول‌های کوچک مؤثر بر پیام‌رسانی PERK/ATF4 شامل مهارکننده‌های فسفاتازها هستند که eIF2 $\alpha$  را کنترل کرده اثرات مهار ترجمه پروتئین را طولانی می‌کنند (۱۲). به نظر می‌رسد فعال‌سازی PERK قبل از شکل‌گیری پروتئین‌های پاتوزن در مغز مبتلایان آلزایمر باشد، اما فعال شدن آن می‌تواند از طریق تجمع پروتئین‌های Tau به وجود آید (۱۳). مطالعات بر روی مدل حیوانی آلزایمر نشان می‌دهد که تخریب PERK سطح پروتئین BACE1 و آمیلوئید بتا را به‌طور معناداری کاهش می‌دهد. برعکس، قرار گرفتن سلول در معرض eIF2 $\alpha$  فسفریله افزایش سطوح پروتئین BACE1 را مهار می‌کند (۱۴). در این مطالعه برای اولین بار توسط ارزیابی ارتباط سن با میزان بیان ژن ATF4 در مدل ترازیخت مگس سرکه الگوی بیان این ژن کلیدی در بیماری آلزایمر مورد بررسی قرار گرفت.

#### انتخاب مدل و سیستم بیان ژن آمیلوئید بتای انسانی:

مگس سرکه یکی از مناسب‌ترین مدل‌های ژنتیکی در دسترس است و کمک بسیاری در درک مراحل تکوین، تکامل موجودات و نیز علت شناسی بیماری‌های انسانی کرده است. این حشره، از راسته دو بالان، کلاس حشرات، خانواده Drosophilidae، جنس *Drosophila* و گونه *Melanogaster* هست که به‌طور عامیانه به‌عنوان مگس میوه شناخته می‌شود و اولین موجودی است که توالی ژنومی کامل آن مشخص شده است (۱۵). تقریباً ۱۳,۶۰۰ ژن کدکننده پروتئین در تنها چهار کروموزوم مگس سرکه قرار دارند. آناتومی مگس به‌خوبی مطالعه شده و اجزای مغز و سیستم عصبی آن مشخص است و ویژگی‌هایی مانند چشم مرکب آن دسترسی آسان به خصوصیات فنوتیپ را فراهم می‌کند. محدوده رفتار مگس از فرار ساده تا یادگیری و حافظه کوتاه تا درازمدت متغیر است.

به‌طور عمده بر بخش میانی لوب گیجگاهی و دیگر ساختارهای قشر مخ اثر می‌گذارد (۳). اختلال شدید در ظرفیت فکری در اثر از دست دادن یا آسیب دیدن سلول‌های عصبی مغز را زوال عقل می‌گویند. پلاک‌های عصبی و گره‌های نوروفیبریلی از مهم‌ترین علائم پاتولوژیکی آلزایمر هستند و به ترتیب مرتبط با افزایش رسوب آمیلوئید بتا ( $A\beta$ ) در بافت‌های مغزی و تغییرات اسکلت سلولی که از طریق افزایش فسفوریلاسیون پروتئین تاو مرتبط با میکروتوبول در نوروون ایجاد می‌شود هستند. با توجه به فرضیه آمیلوئیدی بیماری آلزایمر، تولید بیش‌ازحد  $A\beta$  ناشی از اختلال در فرآیندهای هومئوستازی است که برش پروتئولیتیکی پیش‌ماده پروتئین آمیلوئید (APP) را تنظیم می‌کند. عوامل ژنتیکی، عوامل مرتبط با سن و فاکتورهای محیطی به تغییر متابولیسم کمک می‌کنند و پردازش APP را در مسیر فیزیولوژیکی ترشحی تحت تأثیر قرار می‌دهند (۴). پپتیدهای  $A\beta$  با برش‌های متوالی APP به‌وسیله بتا سکرناز (BACE-1) و گاما سکرناز تولید می‌شوند که این آنزیم‌ها به‌تازگی به‌عنوان بخشی از مجموعه پرسینلین شناخته شده‌اند. از میان چندین ایزو فرم آمیلوئید بتا که با توجه به تعداد اسیدهای آمینه پایانه C تفاوت دارند، آمیلوئید بتا ۴۲-۱ نقش مهمی در بیماری‌زایی آلزایمر دارند. سمیت نورونی پپتید آمیلوئید بتا از خصوصیات بیوشیمیایی آن ناشی می‌شود که به‌صورت الیگومرها و پروتوفیبریل‌های نامحلول درمی‌آیند. این نوع آمیلوئید بتای فیبری به‌صورت پلاک‌های غیرطبیعی انباشته شده و باعث کاهش پاک‌سازی آمیلوئید بتا از مغز و انباشت آمیلوئید بتای خارج سلولی می‌شوند. در نهایت فعالیت آبخاری سمیت نورونی منجر به تغییرات سیتو اسکلتی، اختلالات عصبی و مرگ سلولی می‌شود (۵).

استرس اکسیداتیو نقش مهمی در بیماری‌زایی آلزایمر دارد. با انباشت پپتید آمیلوئید بتا، یون‌های فلزاتی چون مس، آهن و روی در بافت مغز تشکیل می‌شوند. فعالیت اکسایش-کاهش یون‌هایی مانند مس، می‌تواند تولید گونه‌های واکنش‌پذیر اکسیژن (ROS) و اتصال آن‌ها به آمیلوئید بتا را کاتالیز کند (۶). استرس شبکه آندوپلاسمی به‌عنوان مهم‌ترین جنبه علت شناسی آلزایمر شناخته می‌شود. تجمع پروتئین‌های بد تاخورد و آشفستگی هومئوستازی یون کلسیم داخل سلولی به‌عنوان محرک‌های استرس شبکه آندوپلاسمی منجر به اختلال عصبی و مرگ سلولی می‌شوند (۷). در شرایط استرس، سلول‌ها به کمک فعال کردن مسیرهای پاسخ که به‌عنوان پاسخ پروتئین تا نخورده (UPR) شناخته می‌شوند از آسیب جدی فرار می‌کنند. پاسخ پروتئین تا نخورده از طریق سه مسیر کلیدی از راه غشای شبکه آندوپلاسمی فعال می‌شود: (الف) PERK؛ (ب) ATF-6؛ (ج) IRE1 (۸).

جداسازی مگس‌های ماده ویرجین، ابتدا مگس‌های بالغ یا والدین از محیط‌های کشت شفیره دار جدا شدند، سپس به فواصل ۴ ساعت مگس‌های بیرون آمده از شفیره با پد CO<sub>2</sub> بی‌هوش گردیده در زیر استریو میکروسکوپ مگس‌های ماده ویرجین که فاقد شانه جنسی و دارای لکه سیاه در ناحیه شکمی هستند جدا شدند.

از لاین *GMR-Gal4* برای تائید القای جهش با تغییر مورفولوژی چشم و از لاین *OK107-Gal4* برای انجام تست‌های مربوط به حافظه و یادگیری استفاده شد (۱۸). پس از اطمینان از ایجاد سمیت آمیلوئید بتا توسط تغییرات مورفولوژی چشم و تست یادگیری پرهیز از بو در لارو، از لاین *elav-Gal4* برای القای جهش در نوروها استفاده شد. مگس‌های آمیزش داده‌شده به مدت یک روز جهت تخم‌ریزی در دمای اتاق قرار داده‌شده و لاروهای نسل اول لاین *UAS-Ab42-OK107-Gal* برای انجام تست یادگیری و حافظه استفاده شدند. در این آمیزش، شیشه محیط کشت حاوی تخم برای القای جهش و تائید آن در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد گذاشته شد. سایر لاین‌ها تا تولید مگس بالغ ۱۰ روزه در محیط سرما (۱۸ درجه) نگهداری شدند. با این روش میزان بیان آمیلوئید بتا در ده روز اول زندگی مگس سرکه کنترل شد (۱۹). پس از بی‌هوش کردن مگس‌های ۱۰ روزه دارای جهش و بدون جهش (به‌عنوان کنترل) به مدت یک روز در الکل ۲۵ درصد برای عکس‌برداری و مشاهده تغییرات مورفولوژی فیکس شدند. سپس مگس‌ها در الکل‌های ۵۰، ۷۵، ۹۵ و ۱۰۰ هرکدام به مدت یک روز آبیگری شدند. سپس عکس‌برداری از نمونه‌ها توسط دوربین عکاسی صورت گرفت. اثر بیان جهش در ابتدا بر ویژگی‌های مورفولوژی مانند چشم مگس سرکه تأثیر دارد و تائیدی بر صحت آزمایش است. پس از مشاهده تغییرات چشم در مگس‌های روز ۱۰، ادامه آزمایشات انجام شد.

برای تست ریل تایم پی سی آر مگس‌های سرکه لاین *UAS-Ab42-elav-Gal4* روز دهم پس از بی‌هوشی و شمارش، در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد فریز شدند. مگس‌های مربوط به روزهای ۲۰ و ۳۰ نیز تا رسیدن به عمر ۲۰ روزه و ۳۰ روزه در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند و مراحل فریز کردن و انجام تست ریل تایم پی سی آر برای هرکدام از این سنین نیز انجام گردید (۱۹).

#### تست یادگیری پرهیز از بو لارو (( Odor avoidance learning (OAL):

لاروهای مگس سرکه را می‌توان برای پرهیز از بو به کمک شوک الکتریکی آموزش داد. در این روش در موقعیت آزاردهنده (شوک) مرحله کاهش علائم یادگیری دیده می‌شود که محققان از آن در تجزیه و تحلیل کمی فازهای مختلف حافظه از جمله کوتاه‌مدت (Short term (STM)، دوره متوسط (Middle term (MTM))

بسته به تغذیه و استرس، میانگین عمر آن حداکثر ۱۲۰ روز است و تمامی این موارد مگس سرکه را تبدیل به یک موجود ایدئال در تحقیقات بیماری‌های مرتبط با پیری مانند آلزایمر کرده است (۱۶). بنابراین در این پژوهش از مگس سرکه جهت ایجاد مدل استفاده شد.

سیستم Gal4-UAS سیستم قدرتمندی در القای بیان ژن‌ها و بررسی عملکرد آن‌ها در مگس سرکه و سایر موجودات مدل است. این سیستم بیانی شامل دو جز است: (۱) محرک که در آن فاکتور القاکننده رونویسی با منشأ مخمر، موسوم به Gal4 تحت کنترل یک پروموتور اختصاصی بافت قرار می‌گیرد و (۲) پاسخ‌دهنده که یک توالی تنظیمی دارای موتیف متصل به DNA برای اتصال به Gal4 است و توالی‌های فعال‌ساز بالادست (Upstream Activation Sequences) نام دارد. بیان اختصاصی Gal4 در بافت سبب تولید و اتصال این فاکتور رونویسی به نواحی تنظیمی UAS شده و بیان توالی و ژن‌های تحت کنترل UAS را تحریک می‌کند؛ بنابراین آمیزش دو لاین مگس سرکه یکی حاوی جز Gal4 تحت پروموتور اختصاصی بافت و دیگری حاوی توالی UAS که توالی موردنظر (گزارشگر یا سرکوبگر) را تحت کنترل دارد سبب قرار گرفتن و بیان این دو جز در زاده‌های نسل اول می‌شود. بنابراین در این پژوهش از این سیستم جهت بیان آمیلوئید بتای انسانی و ایجاد مدل استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

##### نگهداری و تغذیه مگس سرکه:

مگس‌های سرکه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و در حضور محیط کشت نیمه جامد حاوی شکر، جو پرک آسیاب شده، سبوس، مخمر، آگار-آگار و اسید پروپیونیک به‌عنوان ضد قارچ پرورش داده شدند. برای تهیه این محیط کشت پس از رساندن آب به دمای جوش، به ترتیب شکر، جو پرک آسیاب شده، سبوس و آگار-آگار را اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. سپس مخمری که از قبل در ۱۵ میلی‌لیتر آب حل شده بود اضافه گردید. در نهایت پس از رسیدن دمای مخلوط به ۴۰ تا ۵۰ درجه، اسید پروپیونیک به مخلوط اضافه شد. محیط کشت تهیه‌شده را درون بطری‌های مناسب ریخته و درب آن‌ها با مقدار کمی پنبه یا اسفنج بسته شد (۱۷).

##### تکثیر مگس سرکه ترا ریخته و تهیه نمونه:

در این مطالعه از لاین‌های *GMR-Gal4*، *OK107-Gal4*، *elav-Gal4* مگس ماده ویرجین (آمیزش نکرده) و لاین *UAS-Ab42* مگس نر استفاده شد. سپس مگس‌های ماده ویرجین از هر لاین با مگس‌های نر لاین *UAS-Ab42* آمیزش داده شد. برای



## تحلیل آماری:

در این مطالعه تحلیلی جهت انجام محاسبات آماری داده‌ها، از نرم‌افزار Graphpad prisma 6 استفاده شد.

به‌عنوان معیار معنی‌دار بودن اختلاف در نظر گرفته شد. داده‌ها بر اساس میانگین  $\pm$  انحراف معیار (SD) گزارش گردید.

## ملاحظات اخلاقی:

رعایت نکات اخلاقی با توجه به موازین کمیته اخلاق و منطبق با منشور اخلاقی هلسینکی در مورد کلیه مدل‌های آزمایشگاهی جهت به حداقل رساندن آزار صورت گرفت (UOZ-GR-9618-5).

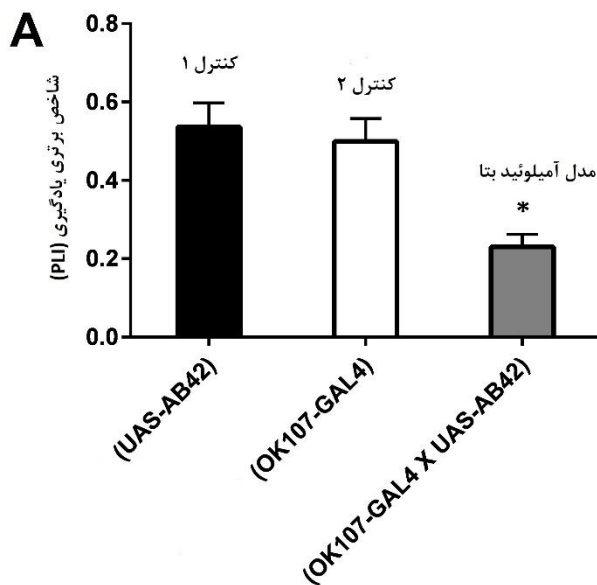
## یافته‌ها

## تأیید مدل توسط تست رفتاری و تغییر مورفولوژی

چشم:

نتایج مطالعه نشان داد میزان حافظه و یادگیری در مدل‌های جهش‌یافته دارای آمیلوئید بتای انسانی hA $\beta$ 42 نسبت به مدل‌های کنترل (کنترل ۱ و ۲) کاهش معناداری ( $P < 0.05$ ) داشته است به طوری که با اعمال شوک الکتریکی همراه با بو، در مرحله انتخاب، مگس‌های مدل بیشتر به سمت بو رفته‌اند که نشان‌دهنده کاهش یادگیری در مگس‌های سرکه جهش‌یافته و تأیید ایجاد مدل آلزایمر در این مگس‌ها می‌باشد (شکل 1A).

همچنین نتایج مطالعه نشان داد میزان تخریب واحدهای بینایی در مدل‌های جهش‌یافته دارای آمیلوئید بتای انسانی hA $\beta$ 42 نسبت به مگس‌های سالم افزایش داشته است که نشان‌دهنده سمیت بالای آمیلوئید بتای انسانی در مگس‌های سرکه جهش‌یافته و تأیید ایجاد مدل آلزایمر در این مگس‌ها می‌باشد (شکل 1B).



شکل (۱): (A) نمودار تغییرات یادگیری در لاین جهش‌یافته OK107-A $\beta$ 42 در مقایسه با نمونه‌های کنترل (UAS-A $\beta$ 42 و OK107-)

(Gal4). \* =  $P < 0.05$  نشان‌دهنده تفاوت با گروه کنترل است. (B) مورفولوژی چشم و میزان قابل توجه تخریب واحدهای بینایی در لاین

جهش‌یافته OK107-A $\beta$ 42 در مقایسه با مگس‌های سالم.

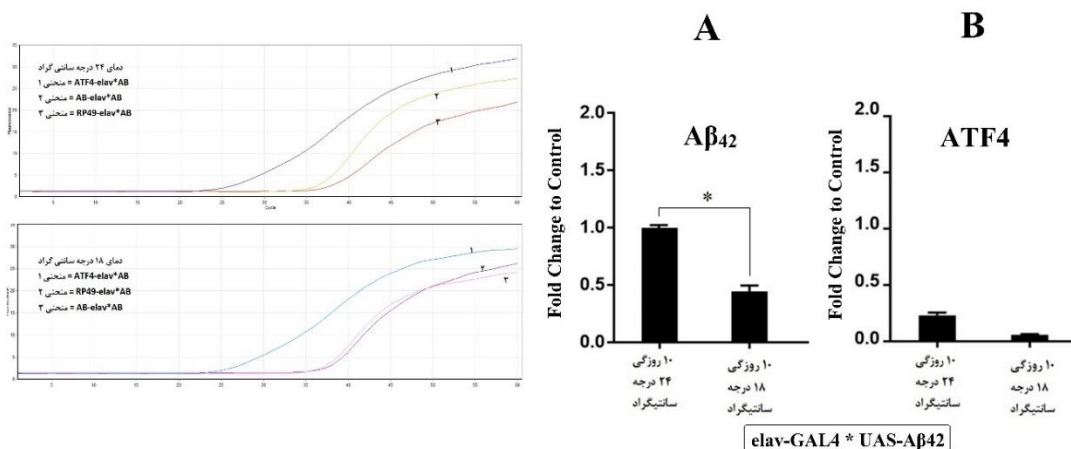
معنی‌داری بیان ژن hA $\beta$ 42 را کاهش داد و صحت عملکرد این سیستم کنترلی را تأیید نمود (شکل 2A).

همان‌طور که انتظار می‌رفت به دلیل اینکه ژن ATF4 تحت کنترل سیستم UAS-Gal4 نیست کاهش دما نیز تأثیری بر بیان این ژن در مگس‌ها نداشت (شکل 2B). کاهش مشاهده‌شده در بیان این ژن می‌تواند به دلیل کاهش کلی متابولیسم مگس‌ها در نتیجه پایین آمدن دمای محیط باشد.

## تأیید اثرات سیستم کاهش دما در سنین پایین بر کاهش

بیان و سمیت نرونی hA $\beta$ 42:

در ده روز اول زندگی مگس بالغ (از زمان تخم‌ریزی مگس‌ها تا ده روز پس از بیرون آمدن از شفیره)، مگس‌های نسل اول در محیط ۱۸ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند تا با کاهش دما بیان ژن hA $\beta$ 42 نیز کاهش یابد. نتایج نشان داد کاهش دما به‌صورت



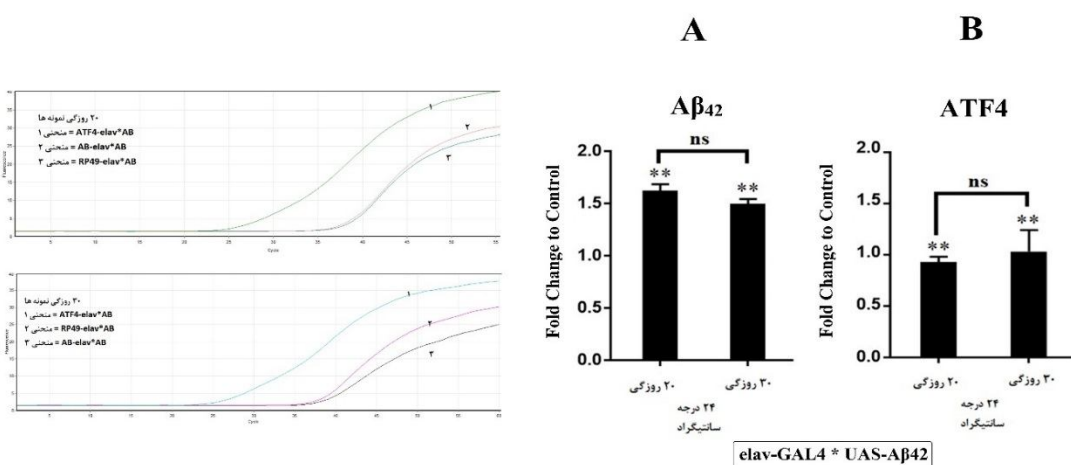
**شکل (۲):** منحنی ریل تایم پی سی آر مربوط به دماهای ۲۴ و ۱۸ درجه مگس‌های ده‌روزه (سمت چپ) و (A) نمودار تغییرات بیان آمیلوئید بتا در دماهای ۲۴ و ۱۸ درجه مگس‌های ده‌روزه.  $P < 0.05$  = \* نشان‌دهنده تفاوت با دمای ۲۴ درجه است. (B) نمودار تغییرات ATF4 در دماهای ۲۴ و ۱۸ درجه مگس‌های ده‌روزه.

ده‌روزگی (دمای ۱۸ درجه) افزایش معنادار بیان این ژن را نشان دادند (شکل 3A). کاهش اندک مشاهده‌شده در بیان این ژن می‌تواند به دلیل اختلال کلی در بیان پروتئین‌های مگس‌ها در نتیجه افزایش سن باشد. از طرف دیگر نتایج این بررسی نشان داد، فرآیند پیری تأثیر معناداری بر بیان ژن ATF4 در مگس‌های مبتلا شده به آلزایمر نداشت هرچند این مگس‌ها نسبت به سن ده‌روزگی (دمای ۱۸ درجه) افزایش معنادار بیان این ژن را نشان دادند (شکل 3B).

### عدم تغییر در بیان ژن‌های hAβ42 و ATF4 با افزایش

سن:

از ۱۰ روزگی به بعد مگس‌ها به محیط استاندارد (۲۴ درجه سانتی‌گراد) منتقل شدند و اثر سن (۲۰ و ۳۰ روزگی) بر بیان ژن‌های hAβ42 و ATF4 بررسی شد. همان‌طور که مشاهده می‌شود فرآیند پیری تأثیر معناداری در سیستم *UAS-Gal4* ندارد و بنابراین بیان ژن hAβ42 در مگس‌ها با افزایش سن تغییری نداشت، هرچند این مگس‌ها نسبت به سن



**شکل (۳):** منحنی ریل تایم پی سی آر مربوط به دمای ۲۴ درجه مگس‌های بیست و سی روزه (سمت چپ) و (A) نمودار تغییرات بیان آمیلوئید بتا در دمای ۲۴ درجه مگس‌های بیست و سی روزه.  $P < 0.05$  = \*\* نشان‌دهنده تفاوت با سن ده‌روزه است. (B) نمودار تغییرات ATF4 در دمای ۲۴ درجه مگس‌های بیست و سی روزه.  $P < 0.05$  = \*\* نشان‌دهنده تفاوت با سن ده‌روزه است.

## بحث

ال هیپومورفیک ATF4، و نقش مسیر PERK/ATF4 در تکامل مگس سرکه اولین بار در سال ۱۹۴۰ به عنوان جهشی که در اتصال سر به قفسه سینه طی تکامل دوره شفیرگی اختلال ایجاد می کند توصیف شد. ال Null نشان دهنده نقص در لانه گزینی و شفیره شدن لارو است. طبق این ایده، رونویسی ATF4 در مگس سرکه تحریک هورمون‌هایی را در سلول‌های غدد درون‌ریز القا می کند که باعث پوست‌اندازی می شوند. جالب توجه است که اخیراً یک مطالعه نشان داده است که ATF4 به عنوان فعال کننده گیرنده Ecdysone عمل کرده و ژن‌های هدف متعددی را که در دگردهی درگیر هستند، کنترل می کند. از آنجائی که پروتئین ATF4 نمی تواند بدون فسفوریلاسیون الفاکتند استرس eIF2 $\alpha$  سنتز شود، این مشاهدات ارتباط مبهمی بین دگردهی و استرس شبکه آندوپلاسمی فراهم کرد که هنوز کاملاً کشف نشده است (۲۳). همچنین PERK در سلول‌های بنیادی روده بالغ سالم فعال است و بدون PERK، تکثیر سلول‌های بنیادی روده کاهش می یابد. جالب توجه است که فعالیت PERK در سلول‌های بنیادی اپیتلیال روده نتایج منفی دارد و خاموش کردن PERK در این بافت طول عمر مگس سرکه را افزایش می دهد (24). این مشاهدات نشان می دهد که مسیر PERK/ATF4 در بافت‌های سالم فعال است و از آنجائی که نقش مثبت در بافت‌های ویژه بر اساس الزامات تکامل تعیین می شود، فعالیت نامناسب این مسیر می تواند اثرات منفی در سایر بافت‌ها داشته باشد (۲۵).

برگز و همکاران در سال ۲۰۱۷ به بررسی روش‌های کنترل بیان ATF4 در اختلالات شبکه و تخریب نورون پرداختند. آن‌ها دریافتند که تاخوردگی غیرطبیعی پروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی به وسیله پروتئین چاپرون GRP78 شناخته شده و موجب فعال شدن مسیر PERK می گردد. در نتیجه با استرس حاد شبکه آندوپلاسمی واسطه‌های پائین دست کیناز PERK فسفوریلاسیون eIF2 $\alpha$  را ممکن و آن نیز فعالیت ATF4 را تنظیم می کند. این فاکتور به همراه پروتئین CHOP رونویسی از چاپرون‌های استرس شبکه آندوپلاسمی را فعال و با مهار موقتی ترجمه به سمت برقراری مجدد هومئوستازی سلولی پیش می رود (۲۶).

پس از ادامه استرس شبکه آندوپلاسمی، ATF4 با تحریک پیام نادرست اتوفازی، مهار ترجمه و پاسخ التهاب، سلول‌های نورون را به سمت فاز پیش آپوپتوزی هدایت می کند. با سرکوب مداوم این پیام‌رسانی مرگ سلولی نورون‌ها با فعال شدن آپوپتوز ممکن می شود و موجب اختلالات تخریب نورون مانند بیماری پارکینسون، بیماری آلزایمر، بیماری هانتینگتون و تخریب شبکه می گردد.

شواهد جدید نشان می دهد که استرس شبکه آندوپلاسمی و به طور خاص تغییر در پاسخ پروتئین تا نخورده نورونی ممکن است در آسیب‌شناسی بیماری آلزایمر مؤثر باشد. بر این اساس فاکتور ATF4، جزء جدایی‌ناپذیر پاسخ پروتئین تا نخورده است و توسط استرس شبکه آندوپلاسمی فعال و بیان فاکتور رونویسی پیش آپوپتوزی CHOP را تنظیم می کند (شکل ۴). آشنایی کامل با نقش عملکردی استرس شبکه آندوپلاسمی در علت شناسی بیماری آلزایمر در توسعه اهداف درمانی گسترده‌تر بسیار کمک کننده است (۲۷).

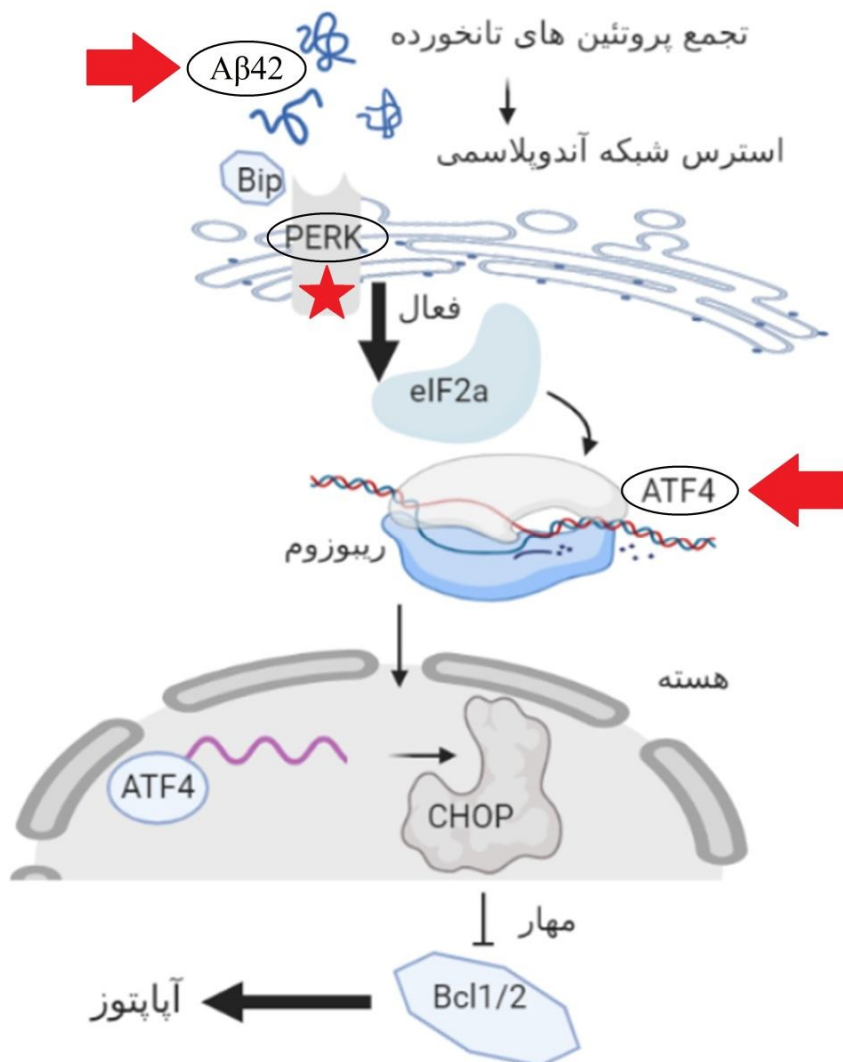
اینو و همکاران در سال ۲۰۱۸ نقش نوعی اسید چرب در مرگ سلولی مرتبط با استرس اکسیداتیو در سلول‌های نوروبلاستوما انسانی بیان کردند. همچنین این اسید چرب فسفوریلاسیون eIF2 $\alpha$  و افزایش ATF4 را تحریک می کند و سبب فعال شدن مسیر پاسخ استرس اکسیداتیو و پاسخ استرس شبکه آندوپلاسمی می شود (۲۸،۲۹).

کورونا و همکاران در سال ۲۰۱۸ نیز نقش ATF4 در تحریک‌پذیری نورونی بررسی کردند و نشان دادند که خاموش کردن ATF4 به مدت طولانی در نورون‌های هیپوکمپ موش به طور قابل توجهی باعث افزایش فعالیت خود به خودی می شود. این مطالعات را در یک مدل که در آن ATF4 باعث تنظیم بیان Cdc42 (پروتئینی که در چرخه سلولی دخیل است) می شود پیشنهاد دادند و در نهایت موجب تعدیل تحریک‌پذیری نورون‌ها می شود (۳۰). در مطالعه دیگری ژو و همکاران در سال ۲۰۱۷ نشان دادند که ATF4 آنزیم آنتی‌اکسیدان HO-1 را تنظیم می کند. این آنزیم نیز باعث تمایز استئوبلاست ناشی از این ترکیب گیاهی می شود (۳۱).

سلاردو و همکاران در سال ۲۰۱۷ با مدل سازی مگس سرکه نشان دادند که ATF4 بیان ژن‌های مسئول پاسخ حفاظتی در برابر سمیت میتوکندری تنظیم می کند. این کشف نقش پیام‌رسانی ATF4 در بیماری پارکینسون را نشان داد که می تواند یک استراتژی درمانی جدید باشد. در پژوهشی دیگر مهار آپوپتوز ناشی از استرس شبکه آندوپلاسمی موجب تحریک مجدد عملکرد مغز و اعصاب گردید (۳۲). این پژوهش نشان داد که با وجود نقش بسیار مهم ATF4 در حفظ عملکرد صحیح نورون‌ها و هدف قرار دادن این فاکتور در بسیاری از درمان‌های بیماری‌های تخریب نورون، با افزایش سن توانایی شبکه آندوپلاسمی در حذف قطعات آمیلوئید بتای انباشته شده از مسیر PERK کاهش یافته در نتیجه هدف از دید ATF4 مرگ سلول و آپوپتوز به عنوان آخرین پاسخ سلول

ژن‌های دخیل در ER-phagy بیان پراکنده‌ای در مدل‌های مختلف بیماری آلزایمر دارند و تنها افزایش دو ژن FAM134B و NPC1 احتمالاً در بیماری آلزایمر نقش دارند (۳۴). مطالعه انجام‌شده اولین پژوهش در نوع خود بوده و هم از نظر به‌کارگیری مدل اصلاح‌شده تراویخت مگس سرکه و هم از نظر بررسی بیان ژن ATF4 در فرآیند پیری مگس سرکه منحصربه‌فرد می‌باشد.

است و این امر موجب شدت یافتن علائم مرتبط با بیماری آلزایمر و کاهش حافظه می‌شود (۳۲). مرکادو و همکاران در سال ۲۰۱۸ با مهار مسیر پیام‌رسانی PERK به نتایجی دست یافتند که در پی آن سطوح استرس شبکه آندوپلاسمی کاهش یافته و سطوح دوپامین و بیان پروتئین‌های سیناپس افزایش یافت. این استراتژی در کاهش تخریب نورون در بیماری آلزایمر مؤثر بود (۳۳). همچنین مشخص شده است که



شکل (۴): نقش  $hA\beta_{42}$  در فعال‌سازی مسیر PERK در طی استرس شبکه آندوپلاسمی و القای مرگ برنامه‌ریزی شده (آپوپتوز) سلول

مگس‌ها در دمای ۲۴ درجه سانتی‌گراد مجدداً حداکثر بیان آمیلوئید بتا مشاهده شد (القای بیشترین میزان سمیت در سنین بالاتر). نتایج نشان داد سیستم Gal4-UAS استفاده‌شده برای القای بیان آمیلوئید بتای انسانی تحت تأثیر سن قرار نگرفته و در روزهای بیست و سی روزگی بیان تقریباً یکسانی از  $hA\beta_{42}$  در مغز

### نتیجه‌گیری

کاهش دما در ده روز اول باعث کاهش بیان معنادار آمیلوئید بتا ( $P < 0.05$ ) از طریق کاهش فعالیت سیستم Gal4-UAS گردید. بدین ترتیب در این پژوهش، کاهش بیان آمیلوئید بتا در مراحل اولیه تکاملی انجام گرفت و پس از سن ده روزگی با قرار دادن



نقشی در بیان ATF4 در مدل مورد مطالعه ندارد و ممکن است مسیرهای دیگری به جز PERK در تغییر در استرس شبکه آندوپلاسمی در طی پیری در بیماری آلزایمر نقش داشته باشند. از طرف دیگر این مطالعه تأیید نمود کاهش دمای محیط می‌تواند به‌عنوان روشی ساده و کم‌هزینه برای کنترل بیان ژن‌های القا شده توسط سیستم Gal4-UAS در مگس‌های سرکه تراریخت استفاده شود و تأثیر کمتری بر کاهش سایر ژن‌ها می‌گذارد.

### تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه زابل در انجام این پروژه کمال تشکر و قدردانی را ابراز می‌نمایند. این پژوهش با کد UOZ.GR9718-13 توسط دانشگاه زابل حمایت گردیده است.

مگس‌ها مشاهده گردید. با توجه به یافته‌های ذکر شده وقفه ده روز اول در بیان آمیلوئید بتای انسانی مگس‌های تراریخته که توسط کاهش دمای محیط زندگی ایجاد شد باعث شد تا اثرات سمیت آمیلوئید بتا در مراحل اولیه رشد و تکامل مگس‌ها کاهش داده شده و حداکثر سمیت پس از رسیدن مگس‌ها به سن بیست روزگی اعمال گردد ( $P < 0.01$ ). تغییرات معناداری در بیان ATF4 در دماهای ۲۴ و ۱۸ درجه سانتی‌گراد دیده نشد، هرچند کاهش در بیان این ژن در ۱۸ درجه وجود داشت. بیان این فاکتور طی روزهای بیست و سی زندگی مگس، در مقایسه با سطح بیان روز ده (دمای ۱۸ درجه سانتی‌گراد) افزایش معناداری نشان داد ( $P < 0.01$ ) ولی بین دو سن بیست و سی تفاوت معناداری دیده نشد. در مجموع از یافته‌های فوق می‌توان نتیجه‌گیری نمود فرآیند پیری

### References:

- Sureda A, Daglia M, Argüelles Castilla S, Sanadgol N, Fazel Nabavi S, Khan H, Belwal T, Jeandet P, Marchese A, Pistollato F, Forbes-Hernandez T, Battino M, Berindan-Neagoe I, D'Onofrio G, Nabavi SM. Oral microbiota and Alzheimer's disease: Do all roads lead to Rome? *Pharmacol Res* 2020;151:104582.
- Zarini-Gakiye E, Amini J, Sanadgol N, Vaezi G, Parivar K. Recent Updates in the Alzheimer's Disease Etiopathology and Possible Treatment Approaches: A Narrative Review of Current Clinical Trials. *Curr Mol Pharmacol* 2020;13(4):273-94.
- States U, States U, Hampshire N, Carolina N, Dakota N, Carolina S, et al. Deaths: Final Data for 2016. *Natl Vital Stat Reports* 2018;67(5):1-76.
- Ghaffari M, Sanadgol N, Abdollahi M. A Systematic Review of Current Progresses in the Nucleic Acid-Based Therapies for Neurodegeneration with Implications for Alzheimer's Disease. *Mini Rev Med Chem* 2020;20(15):1499-1517.
- Armstrong RA. The molecular biology of senile plaques and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Folia Neuropathol* 2009;47(4):289-99. PMID: 20054780.
- Cheignon C, Tomas M, Bonnefont-Rousselot D, Faller P, Hureau C, Collin F. Oxidative stress and the amyloid beta peptide in Alzheimer's disease. *Redox Biol* 2017;14:450-64.
- Zarini-Gakiye E, Sanadgol N, Parivar K, Vaezi G. Alpha-lipoic acid ameliorates tauopathy-induced oxidative stress, apoptosis, and behavioral deficits through the balance of DIAP1/DrICE ratio and redox homeostasis: Age is a determinant factor. *Metab Brain Dis* 2021;36(4):669-83.
- Hashimoto S, Saido TC. Critical review: involvement of endoplasmic reticulum stress in the etiology of Alzheimer's disease. *Open Biol* 2018;8(4):180024.
- Han J, Back SH, Hur J, Lin YH, Gildersleeve R, Shan J, et al. ER-stress-induced transcriptional regulation increases protein synthesis leading to cell death. *Nat Cell Biol* 2013;15(5):481-90.
- Maly DJ, Papa FR. Druggable sensors of the unfolded protein response. *Nat Chem Biol* 2014;10(11):892-901.
- Hetz C, Chevet E, Harding HP. Targeting the unfolded protein response in disease. *Nat Rev Drug Discov* 2013;12(9):703-19.
- Das I, Krzyzosiak A, Schneider K, Wrabetz L, D'Antonio M, Barry N, et al. Preventing proteostasis diseases by selective inhibition of a phosphatase regulatory subunit. *Science* 2015;348(6231):239-42.13. Nijholt DAT, Van Haastert ES, Rozemuller AJM, Scheper W, Hoozemans JJM. The unfolded

- protein response is associated with early tau pathology in the hippocampus of tauopathies. *J Pathol* 2012;226(5):693–702.
14. Devi L, Ohno M. PERK mediates eIF2 $\alpha$  phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* [Internet]. 2014;35(10):2272–81. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.04.031>
  15. Adams MD. The Genome Sequence of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* 2002;161(4):1507–16.
  16. Lenz S, Karsten P, Schulz JB, Voigt A. *Drosophila* as a screening tool to study human neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 2013;127(4):453-60.
  17. Zarini-Gakiye E, Sanadgol N, Parivar K, Vaezi G. Age and Dose-dependent Effects of Alpha-lipoic Acid on Human Microtubule-associated Protein Tau-induced Endoplasmic Reticulum Unfolded Protein Response: Implications for Alzheimer's Disease. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 2021;20(5):451-64.
  18. Mhatre DS. Modeling Alzheimer's Disease in *Drosophila melanogaster*. Drexel University; 2014.
  19. Baxter SL, Allard DE, Crowl C, Sherwood NT. Cold temperature improves mobility and survival in *Drosophila* models of autosomal-dominant hereditary spastic paraplegia (AD-HSP). *Dis Model Mech* 2014;7(8):1005–12.
  20. Malik BR, Hodge JJ. *Drosophila* adult olfactory shock learning. *J Vis Exp* 2014; (90):e50107.
  21. Mehrabi S, Sanadgol N, Barati M, Shahbazi A, Vahabzadeh G, Barzroudi M, et al. Evaluation of metformin effects in the chronic phase of spontaneous seizures in pilocarpine model of temporal lobe epilepsy. *Metab Brain Dis* 2018;33(1):107-14.
  22. Sanadgol N, Golab F, Askari H, Moradi F, Ajdary M, Mehdizadeh M. Alpha-lipoic acid mitigates toxic-induced demyelination in the corpus callosum by lessening of oxidative stress and stimulation of polydendrocytes proliferation. *Metab Brain Dis* 2018;33(1):27-37.
  23. Gauthier SA, VanHaafden E, Cherbas L, Cherbas P, Hewes RS. Cryptoccephal, the *Drosophila melanogaster* ATF4, is a specific coactivator for ecdysone receptor isoform B2. *PLoS Genet* 2012;8(8):e1002883.
  24. Ryoo HD. *Drosophila* as a model for unfolded protein response research. *BMB Rep*. 2015;48(8):445-53.
  25. Malzer E, Szajewska-Skuta M, Dalton LE, Thomas SE, Hu N, Skaer H, et al. Coordinate regulation of eIF2 phosphorylation by PPP1R15 and GCN2 is required during *Drosophila* development. *J Cell Sci* 2013;126(6):1406-15.
  26. Briggs DI, Defensor E, Memar Ardestani P, Yi B, Halpain M, Seabrook G, et al. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Learning and Memory Impairment and Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in the PS19 and APP Swe Mouse Models of Tauopathy and Amyloidosis. *eNeuro* 2017;4(4):ENEURO.0025-17.2017.
  27. Sanadgol N, Shahraki Zahedani S, Sharifzadeh M, Khalseh R, Reza Barbari G, Abdollahi M. Recent updates in imperative natural compounds for healthy brain and nerve function: a systematic review of implications for multiple sclerosis. *Current drug targets* 2017; 181: 1499-1517.
  28. Inoue Y, Hara H, Mitsugi Y, Yamaguchi E, Kamiya T, Itoh A, et al. 4-Hydroperoxy-2-decenoic acid ethyl ester protects against 6-hydroxydopamine-induced cell death via activation of Nrf2-ARE and eIF2 $\alpha$ -ATF4 pathways. *Neurochem Int* 2018;112:288–96.
  29. Sanadgol, N., Shahraki Zahedani, S., Sharifzadeh, M., Khalseh, R., Reza Barbari, G., Abdollahi, M., 2017. Recent updates in imperative natural compounds for healthy brain and nerve function: a systematic review of implications for multiple sclerosis. *Curr. Drug Targets* 181, 1499-1517.
  30. Corona C, Pasini S, Liu J, Amar F, Greene LA, Shelanski ML. Activating Transcription Factor 4 (ATF4) Regulates Neuronal Activity by Controlling

- GABABR Trafficking. *J Neurosci* 2018; 38 (27): 6102-13.
31. Ju SM, Jo YS, Jeon YM, Pae HO, Kang DG, Lee HS, et al. Phosphorylation of eIF2 $\alpha$  suppresses cisplatin-induced p53 activation and apoptosis by attenuating oxidative stress via ATF4-mediated HO-1 expression in human renal proximal tubular cells. *Int J Mol Med* 2017;40(6):1957-64.
32. Celardo I, Lehmann S, Costa AC, Loh SH, Miguel Martins L. dATF4 regulation of mitochondrial folate-mediated one-carbon metabolism is neuroprotective. *Cell Death Differ* 2017;24(4):638-48.
33. Mercado G, Castillo V, Soto P, López N, Axtén JM, Sardi SP, et al. Targeting PERK signaling with the small molecule GSK2606414 prevents neurodegeneration in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2018;112:136-48.
34. Gatta V, D'Aurora M, Granzotto A, Stuppia L, Sensi SL. Expression Changes of Genes Involved in Autophagy of the Endoplasmic Reticulum Network in Animal Models of Alzheimer's Disease. *Cell Death Dis* 2014;5(2):e1054.

## EVALUATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN AGE AND ACTIVATION OF PROTEIN KINASE RNA-LIKE ER KINASE (PERK) IN A TRANSGENIC MODEL OF ALZHEIMER DISEASE

Maryam Ghaffari<sup>1</sup>, Mohammad Haddadi<sup>2</sup>, Parisa Maleki<sup>3</sup>, Nima Sanadgol<sup>4</sup>

Received: 21 November, 2020; Accepted: 30 December, 2021

### Abstract

**Background & Aims:** Alzheimer's disease (AD) is the main form of dementia and neurodegenerative disorder among the elderly. In this study, we evaluated the activation of protein kinase RNA-like ER kinase (PERK) by monitoring the expression patterns of activating transcription factor 4 (ATF4) during aging in a transgenic Alzheimer's model.

**Materials & Methods:** The human beta-amyloid (hA $\beta$ <sub>42</sub>) mutant gene was expressed in *Drosophila* by GAL4/UAS system and male flies with UAS-A $\beta$ <sub>42</sub> were mated with elav-GAL4 or Ok<sub>107</sub>-GAL4 female to model AD. The model was confirmed by assessment of performance learning index (PLI) of larvae from first-generation (Ok<sub>107</sub>) and adult fly's eyes structure (elav). The expression of ATF4 was evaluated on the 10th, 20th, and 30th days by real-time PCR.

**Results:** The AD model was confirmed by decreasing PLI of larvae ( $p < 0.05$ ) and degeneration of fly's eyes structure ( $p < 0.01$ ). We declined the activity of the GAL4-UAS system by temperature reduction (18 °C) in the first 10 days to decrease neurotoxicity and expression of hA $\beta$ <sub>42</sub> ( $p < 0.05$ ) and have the relevant model with maximum toxicity in the adult brain. Expression of ATF4 was similarly upregulated ( $p < 0.01$ ) in both ages (20 and 30) of the model flies compared to the control group.

**Conclusion:** Given that hA $\beta$ <sub>42</sub>-induced over-expression of ATF4 is the same in different age periods and because PERK signaling is the main source of ATF4 expression, we could conclude that aging is unable to influence the activation of PERK signaling in our model. Further complimentary molecular studies will warrant the possible effects of aging in the activation of other unfolded protein response (IRE1 and ATF6) pathways during AD.

**Keywords:** Alzheimer's disease, *Drosophila melanogaster*, Human beta-amyloid, ATF4

**Address:** Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

**Tel:** +989157444696

**E-mail:** Sanadgol.n@gmail.com/n.sanadgol@uoz.ac.ir

SOURCE: STUD MED SCI 2021: 32(8): 618 ISSN: 2717-008X

Copyright © 2021 Studies in Medical Sciences

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

<sup>1</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>2</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran

<sup>3</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Arak, Arak, Iran

<sup>4</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Zabol, Zabol, Iran (Corresponding Author)