

Induction of Autophagy by the Beclin 1 Gene and Its Effect on MDCK Cell Line Necrosis

Fatemeh Tajiri¹, Homa Mohseni Kouchesfehiani², Farzaneh Sheikholeslami³,
Kazem Baesi⁴, Fatemeh Motavalli⁵, Asghar Abdoli^{4*}

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
- 2- Associated Professor, Department of Animal Biology, Faculty of Biological Science, Kharazmi University, Tehran, Iran
- 3- Assistant Professor, WHO Collaborating Center for Reference and Research on Rabies, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 4- Assistant Professor, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran
- 5- M.Sc., Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1316943551, Department of Hepatitis and AIDS, Pasteur Institute of Iran, Tehran, Iran

Email: A_abdoli@pasteur.ac.ir, Asghar.abdoli7@gmail.com

Received: 21/Feb/2017, Accepted: 24/May/2017

Abstract

Objective: Autophagy (self-digestion) is a highly regulated process for the degradation of damaged proteins and intracellular components. Autophagy has multifunctional roles in the protection of cellular homeostasis. Beclin1 is a key regulator molecule in autophagosome formation. Inhibition of autophagy by destruction of the Beclin 1 allele creates sensitivity to metabolic stress. Inhibition of the autophagy under conditions of nutrient deprivation in tumors resistant to apoptosis can lead to necrosis, inflammation and increased tumor growth. This study aims to assess the effect of autophagy induction on the necrosis pathway of MDCK cells.

Methods: We evaluated induction of autophagy by the Beclin1 gene in MDCK cells and assessed the percentage of necrosis cell death by flow cytometry using an Annexin V Staining kit. In order to induce autophagy, the recombinant pcDNA3.1-Beclin 1 was transfected into the MDCK cell line using lipofectamine TM 3000.

Results: Overexpression of the Beclin1 gene in MDCK cells led to induction of autophagy as seen by intracellular autophagosomal indicator LC3-II staining. There were 9.92% positive LC3 structures in transfected cells and 0.15% in untransfected cells. In the transfected and control groups, the rate of necrosis cell death was 1.66% and 0.06%, respectively.

Conclusion: Crosstalk between autophagy and necrosis pathways might affect the fate of the cell life span. Strategies that involve in modulation of autophagy and cell death might lead to therapeutic interventions in diseases. Therefore manipulation of cell death pathways could create new areas in therapeutic uses and interventions.

Keywords: Autophagy, Beclin 1, Necrosis, MDCK cell, Flow cytometry

القای اتوفازی با ژن Beclin 1 و تأثیر آن روی نکروز رده سلولی MCDK

فاطمه تاجی^۱، هما محسنی کوچصفهانی^۲، فرزانه شیخ الاسلامی^۳، کاظم باعنی^۴، فاطمه متولی^۵، اصغر عبدلی^{۶*}

۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه زیست شناسی تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۲- دانشیار، گروه زیست شناسی تکوینی جانوری، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه خوارزمی، تهران، ایران

۳- استادیار، مرکز همکاری سازمان بهداشت جهانی، مرجع تحقیقات هاری، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

۵- کارشناس ارشد، بخش هیاتیت و ایدز، انستیتو پاستور تهران، تهران، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدیستی: ۱۳۱۶۹۴۳۵۵۱، انستیتو پاستور تهران، بخش هیاتیت و ایدز

Email: A_abdoli@pasteur.ac.ir, Asghar.abdoli7@gmail.com

پذیرش مقاله: ۹۶/۰۳/۰۳

دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۰۲

چکیده

هدف: اتوفازی (خودخواری) یک فرآیند بسیار تنظیم شده برای تخریب پروتئین‌های آسیب‌دیده و اجزا درون سلولی از کارافتاده است. اتوفازی نقش‌های چندگانه‌ای در حفظ هموستازی سلول دارد. بکلین ۱ (Beclin 1) یک مولکول تنظیمی بسیار مهم در شروع و شکل‌گیری اتوفازگوزوم است. مهار اتوفازی به وسیله تخریب آلی بکلین ۱ حساسیت به استرس متابولیک را ایجاد می‌کند. مهار کردن اتوفازی تحت شرایط محدودیت مواد مغذی در تومورهای مقاوم به مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده، منجر به نکروز التهاب و رشد تومور افزایش یافته همراه است.

هدف از این مطالعه، القای اتوفازی با ژن بکلین ۱ و تأثیر آن در روند نکروز رده سلولی MCDK بود.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، القای اتوفازی با ژن بکلین ۱ در سلول‌های MDCK بررسی شد. سپس درصد مرگ سلولی نکروز در این سلول‌ها با روش فلوسایتومتری با استفاده از کیت رنگ‌آمیزی آنکسین V سنجیده شد. به منظور القا کردن اتوفازی، سازه Beclin1(-)-pcDNA 3.1 با استفاده از لیپوفکتامین ۳۰۰۰ درون رده سلولی MDCK ترنسفکت شد.

نتایج: در مطالعه حاضر مشاهده شد که بیان بالای ژن بکلین ۱ در سلول‌های MDCK به القای اتوفازی منجر می‌شود، همان‌گونه که با رنگ‌آمیزی شاخص اتوفازگوزومی داخل سلولی دیده شد. درصد ساختارهای LC3 مثبت در سلول‌های ترنسفکت شده و نشده به ترتیب ۹۲/۹ و ۱۵/۰ درصد بود. در گروه‌های ترنسفکت شده و کنترل، درصد مرگ سلولی نکروز، به ترتیب ۶۶/۱ و ۰۶/۰ درصد بود.

نتیجه‌گیری: تداخل بین مسیرهای اتوفازی و نکروز ممکن است بر سرنوشت طول عمر سلول اثر داشته باشد. استراتژی‌های درگیر در تعدیل کردن اتوفازی و مرگ سلولی ممکن است بر روند درمان بیماری‌ها مؤثر باشد. بنابراین دستکاری مسیرهای مرگ سلولی ممکن است حوزه‌های جدیدی را در استفاده‌های درمانی و مداخله‌ای ایجاد کند.

کلید واژگان: اتوفازی، بکلین ۱، نکروز، فلوسایتومتری

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۲۰، شماره ۱، بهار ۱۳۹۶، صفحات: ۱-۱۵

اتفاق می‌افتد اما در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در مراحل بعدتر دیده می‌شود [۹]. آزمایش‌ها در سلول‌های توموری، احتمال تداخل بین اتوفاژی و نکروز را در این سلول‌ها پیشنهاد کرده است [۱۰]. در شرایط استرس متابولیک، اتوفاژی، برای محدود کردن نکروز و التهاب توموری، سلول را حمایت می‌کند؛ به گونه‌ای که در زمان عمل کردن اتوفاژی به عنوان سدی در برابر استرس متابولیک، به علت این که در فرآیند مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و اتوفاژی اختلال وجود دارد، اتوفاژی منجر به ایجاد نکروز و مرگ سلولی در آزمایشگاه و محیط طبیعی می‌شود [۱۱]. در تداخل بین مسیرهای مرگ سلولی، مولکول‌های تنظیمی مهمی نقش ایفا می‌کنند. ژن بکلین ۱ (Bcl-1) دارای نقش مهمی در مسیرهای مرگ سلولی است [۶، ۱۲]. شناسایی بکلین ۱ به عنوان ژن‌های دیپلوئیدی که به جای دو ژن فقط یک ژن عملکردی دارند (haplo insufficient)، در تعداد زیادی از سرطان‌های انسانی شامل سرطان سینه، تخمدان و پروستات، نشان از ارتباط مستقیم بین اتوفاژی و سرطان دارد. حضور یک آلل از بکلین ۱ در موش منجر به شیوع سرطان ریه، کارسینومای سلول کبدی و لنفوما (Lymphoma) شده است [۱۳، ۱۴]. حذف یکی از آلل‌های بکلین ۱ در کارسینومای سلول کبدی منجر به تجمع p62/SQSTM (p62/Sequestosome) می‌شود [۱۵]. مطالعات نشان داده‌است که بکلین ۱ متوقف کننده رشد و نمو تومور است [۱۳، ۱۴، ۱۶]. بیان بکلین ۱ در سلول‌های MCF-7 (Human breast adenocarcinoma cell line)، سلول سرطانی کارسینومای سینه منجر به القای اتوفاژی شده و باعث کاهش تکثیر و کلون‌زایی در آزمایشگاه شد [۱۶]. بکلین ۱ در ابتدا به عنوان مولکول برهمکنش کننده با پروتئین ضد مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) شناسایی شد [۱۲]. Bcl-2 تنظیم کننده منفی اتوفاژی است و این کار را از طریق متصل شدن به ژن بکلین ۱ انجام می‌دهد [۱۷-۲۰]. با شکسته شدن این اتصال، اتوفاژی به صورت افزایشی تنظیم می‌شود [۱۹]. همچنین با

مفهوم مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (Apoptosis) در برگیرنده " مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده (نوع ۱)، اتوفاژی (Autophagy) (نوع ۲) و نکروز (Necrosis) مرگ سلولی " است. اتوفاژی فرآیندی است که در آن وزیکول‌های با غشای دولایه می‌توانند پروتئین‌ها و اندامک‌های آسیب‌دیده را برای تخریب، به لیزوزوم انتقال دهند و انرژی تولید کنند [۱، ۲]. اتوفاژی پاسخی به فرآیند آنابولیکی ساختن ماکرومولکول‌هاست و به منظور حفظ هموستاز انرژی (Energy homeostasis)، تأمین کننده انرژی است [۳]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی که به آن مرگ سلولی فیزیولوژیکی اطلاق می‌شود از نظر ریخت شناسی از نکروز قابل تشخیص است [۴]. سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی با هسته قطعه قطعه شده، کروماتین یا سیتوپلاسم متراکم و شکل‌گیری اجسام مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی مشخص می‌شوند، در حالی که سلول‌های نکروزی با سیتوپلاسم روشن و شفاف، میتوکندری‌های متورم و کاهش یکپارچگی غشای پلاسمایی بدون صدمه شدید به هسته، قابل تشخیص هستند.

دانشمندان با ارایه شواهد ثابت کرده‌اند که بین انواع مختلف مرگ سلولی، ارتباطی درونی وجود دارد [۵، ۶]. مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروز به موازات یکدیگر عمل کرده و اتوفاژی را هم درگیر می‌کنند [۷]. شرایط و عوامل درونی می‌توانند تعادل بین مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی و نکروز را تعیین کنند. در حالت ناتوانی برای سازگار شدن با شرایط گرسنگی، مسیر اتوفاژی به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا نکروز می‌رود [۵، ۶]. وقتی آدنوزین تری فسفات در سلول‌ها حضور داشته باشد، کاسپازها (Caspases) فعال می‌شوند، در حالی که کاهش سریع سطوح آدنوزین تری فسفات، به نکروز منجر می‌شود [۸]. کاهش سطوح آدنوزین تری فسفات، همراه با کمبود اکسیژن (استرس فیزیولوژیکی) و القای نکروز، به سرعت

۳۰۰۰ (Lipofectamine 3000) و سازه‌های (-)pcDNA3.1 و pUC57-kan از شرکت Invitrogen (آمریکا) تهیه شدند. آنتی‌بادی اولیه به نام آنتی‌بادی ضد میکروتوبول مرتبط با پروتئین ۱ زنجیره سبک ۳ (LC3) (Antibodies against microtubule-associated protein 1 light chain 3)، (آنتی‌بادی ۴۸۳۹۴) و آنتی‌بادی ثانویه کونژوکه با فلورسئین ایزوتیوسیانات (آنتی‌بادی ۹۸۴۶۶) از شرکت Abcam (آمریکا) خریداری شدند. ژن توسط شرکت Eurofins MWG آلمان تهیه شد. کیت استخراج DNA از شرکت یکتا تجهیز آزما (ایران) خریداری شد. آنزیم‌های محدود کننده BamHI و Xba از شرکت Fermentas (آمریکا) تهیه شدند. کیت رنگ‌آمیزی Annexin V-Fluor از شرکت Roche (آلمان) خریداری شد.

ساخت سازه نو ترکیب

cDNA کدکننده ژن بکلین ۱ انسانی از سایت NCBI تهیه و سپس در ناقل puc-kan که یک ناقل تکثیر است کلون شد. سپس عمل جداسازی ژن با دو آنزیم محدود کننده BamHI و Xba انجام و قطعه ژنی به پلاسمید (-)pcDNA3.1 زیرهمسانه‌سازی شد. در مرحله بعد ابتدا پلاسمید با دو آنزیم فوق هضم و سپس قطعه ژنی از روی ژل آگارز خالص سازی شد.

کشت سلول

ابتدا سلول‌های MDCK به تعداد 1×10^6 سلول در محیط کشت DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) همراه با سرم جنین گاوی ۱۰ درصد، پنی سیلین (Penicillin) (۱۰۰ واحد بر میلی‌لیتر) و استرپتومایسین (Streptomycin) (۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) در پلیت‌های ۶ خانه کشت داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و دی اکسید کربن به میزان ۵ درصد، برای رشد

شکستن ژن بکلین ۱، اتوفازی که دارای اثر حمایت‌کننده از سلول است، ممکن است در سلول‌های متعهد به مرگ، مهار شود [۲۱]. بنابراین مولکول‌های تنظیمی مشترک انواع مختلف مرگ سلولی که در یک سطح بر همکنش دارند، می‌توانند در مهار یکی از مسیرهای تعدیل‌کننده مرگ درگیر شوند و سپس مسیر دیگر را به شکلی دیگر، تحت تأثیر قرار دهند. بنابراین به علت تداخل بین انواع مختلف مرگ سلولی، شناسایی و درک مسیرهای مختلف مرگ سلولی و مولکول‌های تنظیمی مشترک که ممکن است منجر به مهار رشد و نمو سلول‌های توموری شوند، امری لازم و ضروری است. با توجه به رشد سریع سلول‌های MCDK در محیط کشت و با توجه به این که گزارش‌های کمی مبنی بر استفاده از گونه‌های مختلف انواع سلول‌های MCDK در تحقیقات مرتبط با سرطان وجود دارد بنابراین در این مطالعه با در نظر گرفتن فرضیه القای اتوفازی و اثر آن بر نکروز سلولی، اثر القای مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع دو (اتوفازی) را با استفاده از ترنسفکت کردن ژن بکلین ۱ به سلول‌های MCDK بررسی شد و اثر آن بر سرنوشت سلول‌های MCDK در مسیر نکروز ارزیابی گردید.

مواد و روش‌ها

باکتری، سلول و پلاسمید مورد استفاده

در این تحقیق از باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli: E.coli*) سویه DH5a استفاده شد. سلول MDCK از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه شد. پلاسمیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل pUC-kan با نشان‌گر انتخابی مقاومت به کانامایسین (Kanamycin) و (-)pcDNA3.1 با نشان‌گر انتخابی مقاومت به آمپی سیلین (Ampicillin) بود.

مواد شیمیایی و سایر معرف‌های مورد استفاده

سرم جنین گاوی، محیط‌های کشت سلول، لیپوفکتامین

به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. در نهایت خانه‌های مورد نظر ۳ مرتبه با PBS و یک مرتبه با آب شستشو شد [۲۳].

سنجش سلول‌های نکروزی MDCK با تکنیک

فلوسایتومتری

هفتاد و دو ساعت بعد از ترنسفکشن، سلول‌های کشت داده شده در پلیت‌های ۶ خانه به تعداد 1×10^6 سلول دو بار با PBS شستشو داده شدند و سپس در دمای اتاق، به مدت ۵ دقیقه با دور ۶۷۰ g سانتریفوژ شدند. سپس سلول‌ها مجدداً در ۴۰۰ میکرولیتر از PBS به حالت تعلیق در آمدند. سلول‌های ترنسفکت شده، ۱۰۰ میکرولیتر از بافر انکوباسیون با ۲ میکرولیتر از آنکسین با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و ۲ میکرولیتر از پروپیدیوم یداید (Propidium iodide)، با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر را دریافت کردند. بعد از انکوبه کردن سلول‌ها در تاریکی به مدت نیم ساعت، درصد سلول‌های نکروزی با فلوسایتومتری بررسی شد. به این ترتیب که در تنظیمات نرم‌افزار دستگاه، کانال‌های FL1 و FL2 انتخاب شد. سپس جمعیت سلولی از نظر اندازه و دانه دانه بودن پیدا شد و عمل گیت کردن روی محور افقی و عمودی انجام شد. سپس ولتاژ دستگاه، برای دیدن سلول‌ها در گراف‌های حاصل تنظیم شد. به گونه‌ای که هر میزان که ولتاژ بیشتر شد سلول‌ها در روی محورهای افقی و عمودی به ترتیب به سمت جلو و بالا قرار می‌گرفتند.

نتایج

القای اتوفاژی در سلول‌های MDCK به دنبال

انتقال ژن بکلین ۱

در این مطالعه، توانایی ژن بکلین ۱ در القای اتوفاژی با

قرار داده شدند.

انتقال سازه 1 Beclin(-)-pcDNA3.1 به

سلول‌های MDCK با استفاده از لیپوفکتامین

بعد از اطمینان از رسیدن تراکم سلول‌ها به میزان ۷۰ تا ۸۰ درصد، سلول‌ها با ۵ میکروگرم از Beclin1(-)-pcDNA 3.1 و همچنین ۵ میکروگرم از پلاسمید Beclin1(-)-pcDNA 3.1 به عنوان گروه کنترل با معرف لیپوفکتامین ۳۰۰۰ ترنسفکت شدند. سپس سلول‌های ترنسفکت شده به مدت زمان ۷۲ ساعت در انکوباتور انکوبه شدند [۲۲].

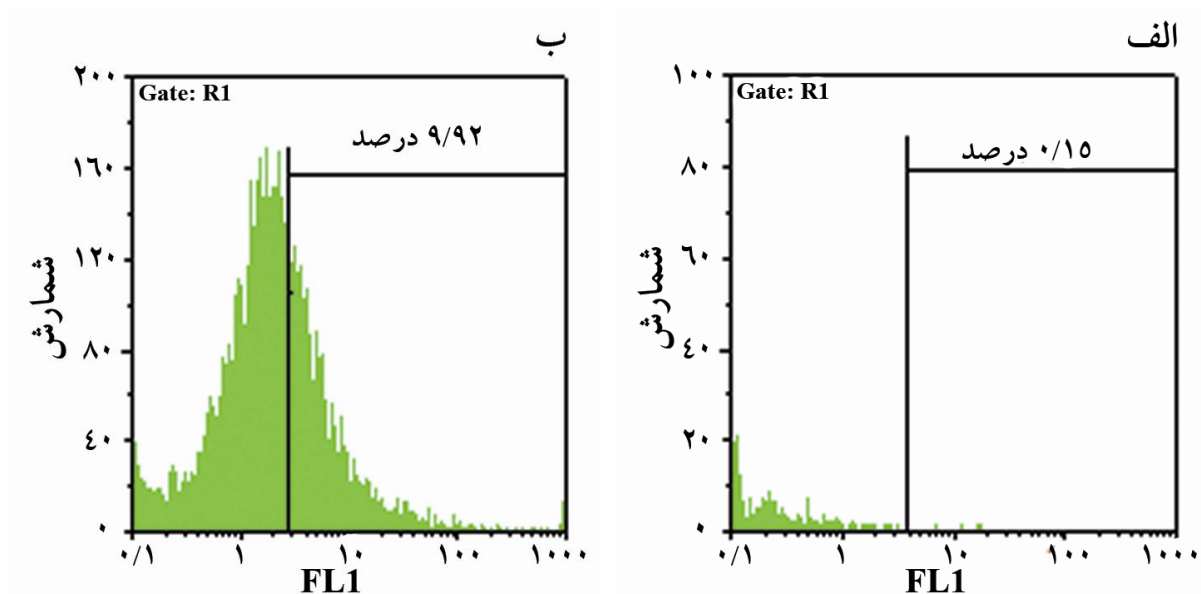
بررسی میزان پروتئین LC3II به عنوان نشان‌گر

اتوفاژی در سلول‌های MDCK

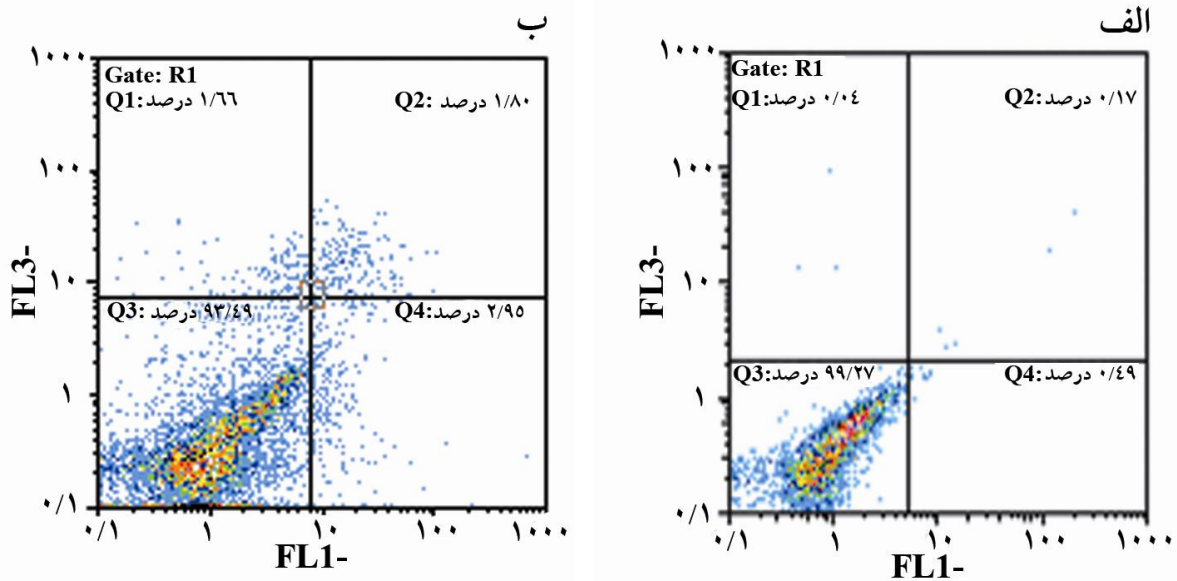
ابتدا محیط رویی خارج و سلول‌ها دو بار با PBS (Phosphate buffered saline) شستشو شد. سپس فرمالدئید ۴ درصد در حجم ۱۰۰ میکرولیتر به روی هر کدام از خانه‌های پلیت اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شد. سلول‌ها با PBS شستشو شدند و تریتون $X100$ (Triton-X100) ۰/۰۲ درصد در حجم ۱۰۰ میکرولیتر روی هر کدام از خانه‌ها اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه در دمای اتاق انکوبه شدند. مجدداً سلول‌ها ۳ مرتبه با بافر فسفات سالین شستشو شدند و محلول ۱/۲۰۰ آنتی‌بادی اولیه در PBS حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاوی تهیه و در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه و پلیت به مدت ۱ ساعت در دمای اتاق انکوبه شد. در مرحله بعد، پلیت حاوی سلول‌ها ۳ مرتبه با PBS شستشو شد. محلول ۱/۲۰۰ آنتی‌بادی ضد ایمنوگلوبولین G (Immunoglobulin G: IgG) موشی متصل به فلورسین (Fluorescein) (آنتی‌بادی ثانویه) در PBS حاوی ۱ درصد آلبومین سرم گاوی تهیه و در حجم ۲۰۰ میکرولیتر به هر خانه اضافه و پلیت کشت سلول‌ها

استفاده از رنگ آمیزی نشانگر اتوفلاگوزومی LC3-II با آنتی بادی پلی کلونال ضد LC3-II در رده سلولی MDCK بررسی شد. سپس درصد شکل گیری ساختارهای LC3-II مثبت در سلول های ترنسفکت شده در مقایسه با سلول های ترنسفکت نشده با روش فلوسایتومتری تحلیل شد. نتایج نشان داد که در رده سلولی MDCK درصد تشکیل ساختارهای LC3-II مثبت افزایش یافته است که این امر نشان از القای اتوفاژی به دنبال ترنسفکشن با ژن بکلین ۱ بود. نتایج نشان داد که اثر القای اتوفاژی ژن بکلین ۱ در سلول های ترنسفکت شده در مقایسه با گروه کنترل مربوط بیشتر است. در سلول های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱، بیش از ۹ درصد سلول ها LC3-II مثبت بودند، این

در حالی بود که تراکم و درصد شکل گیری ساختارهای LC3-II در گروه کنترل کمتر از یک درصد بود (شکل ۱). همچنین در این مطالعه، درصد نکروز سلول های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱ و حاوی سازه بدون ژن بکلین ۱ با روش فلوسایتومتری اندازه گیری شد. نتایج نشان داد که درصد نکروز سلول های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱ بیشتر از درصد نکروز سلول های MDCK بدون ژن بکلین ۱ بود. به گونه ای که در گروه آزمون (MDCK ترنسفکت شده)، ۱/۶۶ درصد سلول ها دچار نکروز شدند و در گروه کنترل MDCK (ترنسفکت نشده)، ۰/۰۶ درصد سلول ها دچار نکروز شدند. این نتایج در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۱ هیستوگرام درصد تشکیل نشانگر اتوفلاگوزومی LC3-II در سلول های MDCK؛ خطوط رسم شده در شکل ۱، نشان دهنده تشکیل ساختارهای LC3-II بر طبق علامت های فلورسنت تولید شده است که بعد از محصور شدن (gating) در کل زیر مجموعه سلول های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱ و سلول های کنترل حاوی سازه بدون ژن بکلین ۱، قابل تشخیص شده است (الف) تشکیل ساختارهای LC3-II در گروه کنترل معادل با ۰/۱۵ درصد بود. (ب) تشکیل ساختارهای LC3-II در سلول های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱ معادل با ۹/۹۲ درصد بود.



شکل ۲ نمودار درصد نکروز در سلول‌های MDCK؛ درصد نکروز سلول‌های MDCK حاوی سازه دارای ژن بکلین ۱ و حاوی سازه بدون ژن بکلین ۱ به وسیله فلوسایتمتری اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل از محصور شدن، نشان داد که تراکم سلول‌های بخش Q3 از "نمودار الف" در شکل فوق، در مقایسه با همین بخش از "نمودار ب" کمتر است. مقایسه درصد نکروز سلول‌ها نشان داد که در گروه کنترل MDCK (ترنسفکت نشده)، ۰/۰۶ درصد سلول‌ها دچار نکروز شدند (الف). در گروه آزمون (MDCK ترنسفکت شده)، ۱/۶۶ درصد سلول‌ها دچار نکروز شدند (ب).

شده است [۲۹]. بیان بالای بکلین ۱ در رده سلولی MCF7 منجر به کاهش تومورزایی در آزمایشگاه شد [۲۹]. شیوع تومورهای بافت خونساز با کاهش ژن بکلین ۱ مرتبط است [۱۳، ۱۴]. مطالعات قبلی نشان داد که اثر حذف یکی از آلل‌های ژن بکلین ۱ در سرطان‌های سینه و تخمدان، به ترتیب منجر به شیوع ۷۵ و ۵۰ درصد از این سرطان‌ها است [۱۳].

در بخشی از مطالعه حاضر ژن بکلین ۱ به رده سلولی MDCK ترنسفکت شد؛ سپس میزان القای اتوفازی در این سلول‌ها بررسی شد. محققان گزارش کرده‌اند که بکلین ۱ تعدیل‌کننده اصلی اتوفازی است [۳۰] و در تکثیر و تومورزایی شرکت می‌کند. با بیان بیرونی ژن بکلین ۱، تکثیر و تومورزایی در سلول‌های MCF-7 مهار می‌شود [۱۶]. عدم عملکرد ژن بکلین ۱ در موش ترا ریخت، به طور قابل توجهی منجر به شیوع انواع سرطان مثل: سرطان کبد، ریه و لنفوما می‌شود [۱۳، ۳۱]. کاهش بیان ژن بکلین ۱ در سرطان ریه، نشان از این دارد که اتوفازی ممکن است در بیماری‌زایی

بحث

مرگ سلولی اتوفازی یا مرگ سلولی برنامه‌ریزی شده نوع ۲ که با شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌ها مرتبط است، هموستاز سلولی را حفظ می‌کند [۳، ۲۴]. نشان داده شد که موش‌های با نقص در اتوفازی، نشانه‌هایی از کاهش انرژی و غلظت اسیدهای آمینه را در پلاسما و بافت‌های خود دارند و در دوره‌های گرسنگی زنده نمی‌مانند [۲۵]. تعداد زیادی از ژن‌ها ممکن است بر فرآیند اتوفازی اثر بگذارند. نقش بازار ژن بکلین ۱ همراه با پروتئین‌های دیگر اتوفازی، در شکل‌گیری ساختارهای پیش اتوفاگوزومی نشان داده شده است [۲۶]. از میان این پروتئین‌ها LC3 یکی از زیر واحدهای اصلی شرکت‌کننده در مکان‌های شکل‌گیری اتوفاگوزوم در شبکه آندوپلاسمی است که با بلوغ غشاهای اتوفاگوزومی مرتبط است [۲۷، ۲۸]. نقش ژن بکلین ۱ از نظر تکاملی در فرآیندهای رشد، تمایز و قدرت زیست‌پذیری سلول، حفظ

سرطان نقش داشته باشد [۳۲]. در مطالعه‌ای که لیانگ (Liang) و همکاران در بررسی نقش اتوفاژی در ارتباط با مهار سرطان زایی و مسیرهای تکثیر در سلول‌های کارسینوما سینه انسانی تحت شرایط آزمایشگاهی و محیط طبیعی، انجام دادند، نشان داده شد که بکلین ۱ منجر به القای اتوفاژی در رده‌های سلول سرطانی می‌شود [۱۶]. القای اتوفاژی به دنبال ترنسفکشن ژن بکلین ۱ در مطالعه حاضر، در راستای نتایج حاصل از مطالعات لیانگ و همکاران است. از آنجا که مهارکنندگان و پیش‌برنده‌های اتوفاژی، تومورزایی را با مکانیسمی ناشناخته، مهار می‌کنند، بنابراین عمل اتوفاژی در سرطان زایی مورد بحث و گفتگو است [۳۳، ۳۴]. در حالی که ارتباط بین اتوفاژی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی به میزان زیادی مطالعه شده است، نقش اتوفاژی در نکروز ناشناخته باقی مانده است. مرگ سلولی نکروز اغلب به‌عنوان مرگ سلولی برنامه‌ریزی نشده نام برده می‌شود، با تأکید بر این که در یک ارگانسیم چند سلولی، این نوع از مرگ سلولی یک فرآیند تنظیم نشده است. تخریب غشای پلاسمایی مشخصه مرگ سلولی نکروز است و منجر به نشست پروتئین‌های داخل سلولی شده که این خود، پاسخ صدمه را از سیستم ایمنی میزبان فعال می‌کند. این پاسخ التهابی سریع و گسترش علامت صدمه ایمنی، در مقابل به سلول‌های با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی که به آرامی توسط ماکروفاژهای بافتی حذف می‌شوند، حاد است. بنابراین نکروز به‌عنوان شکلی بیماری‌زا از مرگ سلولی است که از نظر فیزیولوژیکی فرآیندی برنامه‌ریزی شده نیست [۳۵]. بر خلاف مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، نکروز بعد از یک استرس درمانی یا متابولیک، از یک سازش انرژی زیستی نتیجه می‌شود که به مرگ سلولی سریع منجر می‌شود. سلول‌های توموری می‌توانند از ابتدایی‌ترین شکل مرگ سلولی القا شده با درمان، فرار کنند و این کار را با سازگار شدن به کاهش سطوح آدنوزین تری فسفات از طریق عمل کمپلکس LKB1/AMPK (liver kinase B1/AMP-activated)

(protein kinase) حسگر انرژی انجام می‌دهند [۳۶]. کمپلکس LKB1/AMPK از طریق توانایی‌اش در مهار مسیر پیام‌رسانی راپامایسین (Rapamycin) [۳۷] و فعال کردن ژن‌های متوقف‌کننده تومور p27 [۳۸] و p53 [۳۹] به‌عنوان تنظیم‌کننده اصلی اتوفاژی، پیشنهاد می‌شود. یکی از ژن‌های هدف که بعد از فعال‌سازی p53 القا می‌شود به آسیب تعدیل‌کننده اتوفاژی مربوط است که یک پروتئین غشای لیزوزومی و ضروری برای p53 است، p53 القاکننده اتوفاژی است [۴۰]. علاوه بر نسخه‌برداری مستقیم پروتئین‌های مرتبط با اتوفاژی، p53 ممکن است به‌طور غیر مستقیم اتوفاژی را از طریق مهار بازخورد مسیر پیام‌رسانی راپامایسین هدف پستانداران، فعال نماید [۴۱]. در سلول‌های توموری که از نظر ژنتیکی دارای نقص در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی هستند، اتوفاژی فعال شده و سلول را از سازش سوخت و سازی و مرگ حمایت می‌کند. اتوفاژی اغلب می‌تواند در سلول‌های تحت نکروز، مشاهده شود. این یافته‌ها پیشنهاد می‌کند که در نکروز تومورهای مشابه، اتوفاژی و مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ممکن است با یکدیگر همکاری نمایند و کمک نسبی این سه فرآیند می‌تواند فرمان‌دهنده مسیر رشد تومور یا پسرقت آن و پاسخ میزبان باشد.

در مطالعه حاضر به دنبال القای اتوفاژی، درصد نکروز سلول‌های MDCK بررسی شد. میزان نکروز در بررسی حاضر در سلول‌های MDCK معادل با ۱/۶۶ درصد و در گروه کنترل معادل با ۰/۰۶ درصد بود.

بین انواع مختلف مرگ سلولی، ارتباطی درونی وجود دارد. در حالت ناتوانی به سازگار شدن با شرایط گرسنگی، مسیر اتوفاژی به سمت مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی یا نکروز می‌رود. [۵، ۶]. اتوفاژی حمایت‌کننده، در شرایط کمبود اکسیژن و استرس متابولیک، التهاب را در مکان‌های اولیه شکل‌گیری تومور که برای شروع متاستاز (Metastasis) لازم هستند، مهار می‌کند. بنابراین، نکروز و به دنبال آن رشد تومور کاهش می‌یابد [۱۰، ۴۲]. غلظت متابولیت‌های تغذیه‌ای

القای اتوفاژی و نکروز سلول MCDK

شده سلولی و اتوفاژی مرگ سلولی نکروزی را در *vitro* و *In vivo* جلو می‌برد. بنابراین مهار کردن اتوفاژی تحت شرایط محدودیت مواد مغذی می‌تواند منجر به بازگرداندن مرگ سلولی به تومورهای مقاوم به مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی شود، اما این نکروز با التهاب و افزایش رشد تومور همراه است. بنابراین اتوفاژی ممکن است در سرکوب تومور توسط کاهش استرس متابولیک عمل کند و در هماهنگی با مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، با جلوگیری کردن از مرگ، با نکروز همراه باشد [۱۱]. نشان داده شد که اتوفاژی برای مرگ سلولی نکروز نیاز است به گونه‌ای که در مکانیسم‌های کاتابولیک لیزوزومی، برای تسهیل مرگ سلولی، به تخریب سلول در طول نکروز کمک می‌کند [۴۷]. با مهار کردن اتوفاژی از طریق ژنتیکی، غیرفعال شدن ژن‌های اتوفاژی یا با تیمار دارویی، مرگ سلولی نکروز مهار می‌شود [۴۷]. فیروبلاست‌های جنینی موش که فاقد ژن *Bax* و *Bak* هستند، قادر به القای مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی ذاتی (*Intrinsic*) نیستند و تیمار آن‌ها با عوامل شیمی درمانی گوناگون، منجر به مرگ سلولی غیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی نکروز مانند می‌شود و با شکل‌گیری اتوفاگوزوم‌های فراوان همراه است [۴۸].

مطالعات زیادی اتوفاژی را به‌عنوان عامل مؤثر در مرگ سلولی سلول‌هایی می‌دانند که مسیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی در آن‌ها به خطر افتاده یا دارای نقص در کاسپاز هستند. سلول‌های تیمار شده با مهارکننده‌های عمومی کاسپازها یا با مهارکننده‌های کلپین (*Calpain*) و کاسپاز ۸ از طریق مسیری غیر مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی که به‌طور ویژه با تجمع واکوئل‌های اتوفاژی، مشخص می‌شود می‌میرند [۴۹-۵۲]. شکل‌گیری واکوئل‌های اتوفاگوزومی فراوان در مراحل اولیه مرگ سلولی نکروز، در کرم الگانس (*C. elegans*) دیده شد [۴۷]. مطالعه سامارا (*Samara*) و همکاران نشان داد که به محض شروع مرگ سلولی نکروز، بیان بیش از حد اتوفاژی، القا می‌شود و پروتئولیز لیزوزومی و

مانند اکسیژن موضعی، می‌تواند تکثیر سلول‌های کارسینوما را تحت تأثیر قرار دهد [۴۳]. با کاهش اکسیژن، نکروز در نواحی حاشیه‌ای تومور اتفاق می‌افتد. مشخص شده است که سلول‌های توموری در تومورهای آسیت (*Ascites*) به کاهش اکسیژن مقاومند در حالی که تومورهای با بافت محکم‌تر ممکن است در شرایط کاهش اکسیژن، عمل عوامل سمی را که از ناحیه نکروزی شده منتشر می‌شوند، افزایش دهند [۴۴]. در مطالعاتی که با ترکیبی از روش‌های رنگ‌آمیزی و کامپیوتری بر تخمین زمان چرخه سلولی روی سلول‌های آندوتلیال مویرگی، فیروبلاست‌ها و سلول‌های پارانشیمی انجام شد، نشان داده شد که علت اصلی آهسته بودن رشد تومور، ممکن است میزان نسبتاً متفاوت تکثیر سلول‌های استرومایی و پارانشیمی باشد. این مطالعه نشان داد که همراه با رشد تومور، تکثیر نسبتاً آهسته سلول‌های آندوتلیال می‌تواند منجر به افزایش میانگین فاصله درون مویرگی، کاهش غلظت مواد تغذیه‌ای در نواحی دور از عروق خونی و احتمالاً تکثیر آهسته‌تر سلول‌های کارسینوما و در نهایت مرگ سلولی شود به گونه‌ای که نواحی دورتر از رگ‌های خونی، با نکروز، از لحاظ ریخت‌شناسی، ارتباط دارد. در مطالعه قبلی محققان حاضر در بررسی چرخه سلولی نشان داده شد که با القای اتوفاژی در سلول‌های *HeLa* طول عمر سلول کاهش یافت [۴۶]. در مطالعه پیش‌رو، نتایج حاصل از مطالعه حاضر در بررسی درصد نکروز مشاهده شده در دو گروه سلول‌ها بعد از القای اتوفاژی قابل توجه نبود. در مطالعه دجنهاردت (*Degenhardt*) در سال ۲۰۰۶ با عنوان اتوفاژی بقای سلولی را پیشرفت می‌دهد و نکروز، التهاب و تومورزایی را محدود می‌کند [۱۱] نشان داده شد که در سلول‌های دارای نقص در مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، مهار اتوفاژی به‌وسیله فعال شدن *AKT* یا به‌وسیله تخریب آللی بکلین ۱ حساسیت به استرس متابولیک را با مهار یک مسیر بقای وابسته به اتوفاژی ایجاد می‌کند. در حالی که اتوفاژی به‌عنوان بافر استرس متابولیکی عمل می‌کند، اختلال ترکیبی از مرگ برنامه‌ریزی

اتوفاژی، دارای نقشی آسیب‌زا در بیماری‌های انسانی است. مطالعات بیشتر برای تعریف تعادل پویا بین اتوفاژی، مرگ برنامه‌ریزی شده سلولی، نکروز تنظیم‌شده و دیگر حالت‌های مرگ سلولی در زمینه بیماری‌زایی بیماری‌های انسان نیاز است. بنابراین مطالعات بیشتر برای توسعه اهداف درمانی در مسیر اتوفاژی ضروری به نظر می‌رسد. همچنین استفاده از روش‌های دیگر در ادامه روش‌های به کار برده شده در مطالعه حاضر برای تأیید بیشتر نتایج حاصل لازم و ضروری به نظر می‌رسد.

تشکر و قدر دانی

کلیه هزینه‌های این پژوهش از سوی دانشگاه خوارزمی تهران و انستیتو پاستور تهران تأمین شده است.

اتوفاژی برای پیشبرد مرگ سلولی با یکدیگر ادغام می‌شوند و سطوح تنظیم‌کننده‌های کلیدی اتوفاژی، مانند Atg6/Beclin 1 و Atg8/LC3 بعد از آسیب‌های مغزی کاهش پیدا می‌کنند [۵۳، ۵۴]. با ممانعت کردن از القای نابه‌جای اتوفاژی ممکن است صدمه سلولی در طول حملات حاد عصبی مانند سکته مغزی ایسکمیک (Ischemic stroke) کاهش یابد [۴۷]؛ بنابراین اتوفاژی مکانیسمی مهم و محافظت‌شده برای تخریب سلولی در طول مرگ سلولی نکروز است.

با وجود نقش هموستاتیک اتوفاژی، درک نقش اتوفاژی در برنامه‌های مرگ سلولی پیچیده است. اتوفاژی دارای عملکردهایی است که به طور کامل درک نشده است. اتوفاژی ممکن است در بیماری‌های خاص، توانایی بالقوه برای ایجاد نتایج مضر یا سازگار در آن ارگانیزم داشته باشد، نقش‌های چندگانه ایفا کند. بنابراین وجود نقص یا فقدان عملکرد

منابع

- [1] Klionsky DJ, Emr SD. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* 2000; 290(5497): 1717-21.
- [2] Mizushima N, Ohsumi Y, Yoshimori T. Autophagosome formation in mammalian cells. *Cell Struct Funct* 2002; 27(6): 421-9.
- [3] Yang Z, Klionsky DJ. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol* 2010; 12(9): 814-22.
- [4] Wyllie AH, Kerr JF, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Int Rev Cytol* 1980; 68: 251-306.
- [5] Denton D, Xu T, Kumar S. Autophagy as a pro-death pathway. *Immunol Cell Biol* 2015; 93(1): 35-42.
- [6] Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8(9): 741-52.
- [7] Kondo Y, Kanzawa T, Sawaya R, Kondo S. The role of autophagy in cancer development and response to therapy. *Nat Rev Cancer* 2005; 5(9): 726-34.
- [8] Ryter SW, Mizumura K, Choi AMK. The impact of autophagy on cell death modalities. *International journal of cell biology*. 2014; 2014: Article ID 502676, 12 pages.
- [9] Shimizu S, Eguchi Y, Kamiike W, Waguri S, Uchiyama Y, Matsuda H, Tsujimoto Y.

- Bcl-2 blocks loss of mitochondrial membrane potential while ICE inhibitors act at a different step during inhibition of death induced by respiratory chain inhibitors. *Oncogene* 1996; 13(1): 21-9.
- [10] Mathew R, Karantza-Wadsworth V, White E. Role of autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* 2007; 7(12): 961-7.
- [11] Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S, White E. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 2006; 10(1): 51-64.
- [12] Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B, Levine B. Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; 72(11): 8586-96.
- [13] Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100(25): 15077-82.
- [14] Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112(12): 1809-20.
- [15] Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen HY, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, Dipaola RS, Karantza-Wadsworth V, White E. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 2009; 137(6): 1062-75.
- [16] Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, Levine B. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; 402(6762): 672-6.
- [17] Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD, Levine B. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; 122(6): 927-39.
- [18] Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* 2007; 26(10): 2527-39.
- [19] Maiuri MC, Criollo A, Tasdemir E, Vicencio JM, Tajeddine N, Hickman JA, Geneste O, Kroemer G. BH3-only proteins

- and BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 and Bcl-2/Bcl-X(L). *Autophagy* 2007; 3(4): 374-6.
- [20] Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M, Levine B. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol Cell* 2008; 30(6): 678-88.
- [21] Rubinstein AD, Eisenstein M, Ber Y, Bialik S, Kimchi A. The autophagy protein Atg12 associates with antiapoptotic Bcl-2 family members to promote mitochondrial apoptosis. *Mol Cell* 2011; 44(5): 698-709.
- [22] Abdoli A, Soleimanjahi H, Jamali A, Mehrbod P, Gholami S, Kianmehr Z, Feizi N, Saleh M, Bahrami F, Mokhtari-Azad T, Abdoli M, Kheiri MT. Comparison between MDCK and MDCK-SIAT1 cell lines as preferred host for cell culture-based influenza vaccine production. *Biotechnol Lett* 2016; 38(6): 941-8.
- [23] Shvets E, Fass E, Elazar Z. Utilizing flow cytometry to monitor autophagy in living mammalian cells. *Autophagy* 2008; 4(5): 621-8.
- [24] Shen HM, Codogno P. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species? *Autophagy* 2011; 7(5): 457-65.
- [25] Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhiya T, Mizushima N. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; 432(7020): 1032-6.
- [26] Wang J. Beclin 1 bridges autophagy, apoptosis and differentiation. *Autophagy* 2008; 4(7): 947-8.
- [27] Axe EL, Walker SA, Manifava M, Chandra P, Roderick HL, Habermann A, Griffiths G, Ktistakis NT. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol* 2008; 182(4): 685-701.
- [28] Noda T, Fujita N, Yoshimori T. The Ubi brothers reunited. *Autophagy* 2008; 4(4): 540-1.
- [29] Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC, Levine B. Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 1999; 59(1): 59-65.
- [30] Ruck A, Attonito J, Garces KT, Núñez L, Palmisano NJ, Rubel Z, Bai Z, Nguyen KC, Sun L, Grant BD, Hall DH, Meléndez A. The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy*

- 2011; 7(4): 386-400.
- [31] Lozy F, Karantza V. Autophagy and cancer cell metabolism. *Semin Cell Dev Biol* 2012; 23(4): 395-401.
- [32] Jiang ZF, Shao LJ, Wang WM, Yan XB, Liu RY. Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 2012; 39(1): 259-67.
- [33] Martinez-Outschoorn UE, Whitaker-Menezes D, Pavlides S, Chiavarina B, Bonuccelli G, Casey T, Tsirigos A, Migneco G, Witkiewicz A, Balliet R, Mercier I, Wang C, Flomenberg N, Howell A, Lin Z, Caro J, Pestell RG, Sotgia F, Lisanti MP. The autophagic tumor stroma model of cancer or "battery-operated tumor growth": A simple solution to the autophagy paradox. *Cell Cycle* 2010; 9(21): 4297-306.
- [34] Maycotte P, Aryal S, Cummings CT, Thorburn J, Morgan MJ, Thorburn A. Chloroquine sensitizes breast cancer cells to chemotherapy independent of autophagy. *Autophagy* 2012; 8(2): 200-12.
- [35] Amaravadi RK, Thompson CB. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2007; 13(24): 7271-9.
- [36] Buzzai M, Bauer DE, Jones RG, Deberardinis RJ, Hatzivassiliou G, Elstrom RL, Thompson CB. The glucose dependence of Akt-transformed cells can be reversed by pharmacologic activation of fatty acid beta-oxidation. *Oncogene* 2005; 24(26): 4165-73.
- [37] Høyer-Hansen M, Jäättelä M. AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* 2007; 3(4): 381-3.
- [38] Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007; 9(2): 218-24.
- [39] Jones RG, Plas DR, Kubek S, Buzzai M, Mu J, Xu Y, Birnbaum MJ, Thompson CB. AMP-activated protein kinase induces a p53-dependent metabolic checkpoint. *Mol Cell* 2005; 18(3): 283-93.
- [40] Crighton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N, Smith P, Harrison PR, Gasco M, Garrone O, Crook T, Ryan KM. DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; 126(1): 121-34.
- [41] Feng Z, Zhang H, Levine AJ, Jin S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102(23): 8204-9.

- [42] Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S, White E. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 2007; 21(11): 1367-81.
- [43] Ben-Porat T, Stere A, Kaplan AS. The separation of nascent deoxyribonucleic acid from the remainder of the cellular deoxyribonucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1962; 61(1): 150-2.
- [44] Bertalanffy FD. Tritiated thymidine versus colchicine technique in the study of cell population cytodynamics. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 1964; 13: 871-86.
- [45] Bertalanffy FD, Lau C. Rates of cell division of transplantable malignant rat tumors. *Cancer Res* 1962; 22: 627-31.
- [46] Taji F, Kouchesfahani HM, Sheikholeslami F, Romani B, Baesi K, Vahabpour R, Edalati M, Teimoori-Toolabi L, Jazaeri EO, Abdoli A. Autophagy induction reduces telomerase activity in HeLa cells. *Mech Ageing Dev* 2017; 163: 40-45.
- [47] Samara C, Syntichaki P, Tavernarakis N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ* 2008; 15(1): 105-12.
- [48] Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6(12): 1221-8.
- [49] Xu Y, Kim SO, Li Y, Han J. Autophagy contributes to caspase-independent macrophage cell death. *J Biol Chem* 2006; 281(28): 19179-87.
- [50] Yu L, Wan F, Dutta S, Welsh S, Liu Z, Freundt E, Baehrecke EH, Lenardo M. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103(13): 4952-7.
- [51] Madden DT, Egger L, Bredesen DE. A calpain-like protease inhibits autophagic cell death. *Autophagy* 2007; 3(5): 519-22.
- [52] Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; 304(5676): 1500-2.
- [53] Diskin T, Tal-Or P, Erlich S, Mizrachy L, Alexandrovich A, Shohami E, Pinkas-Kramarski R. Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. *J Neurotrauma* 2005; 22(7): 750-62.
- [54] Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, Kiyama H. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor

القائ اتوفائى و نكروز سلول MCDK

neurons. Biochem Biophys Res Commun

2005; 337(4): 1206-13.