بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه تربیت معلم

دانشکده علوم-گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد سلولی-تکوینی جانوری

عنوان

بررسی اثر زهر زنبور عسل و کمپلکس جدید پالادیوم بر رده سلولی سرطانی لوکمی لنفوبلاستی حاد انسانی سلولT (MOLT-4)

استاد راهنما

دکتر محمد نبیونی

اساتید مشاور

دکتر کاظم پریور

دکتر عادله دیو سالار

دانشجو

زهرا صفایی نژاد

مهر ماه ۱۳۹۰

اثری است کوچک، خیلی کوچک و شاید هیچ!

اما به رسم ادب تقدیم می کنم به:

پدر و مادر مهربانم، فرشتگانی که سرگردانی و ترس در پناهشان به شجاعت می گراید.

و

خواهر و برادر عزیزم که محبت ها و تشویق هایشان راهگشا است.

سپاس نامه

بار الها اعتراف می کنم که نه زبان شکر تو را دارم و نه توان تشکر از بندگان تو، اما بر خود واجب می دانم تا در حد توان و با زبانی قاصر از زحمات تمام کسانی که به یاری بنده حقیر شتافتند، سپاس گزاری نمایم:

نهایت سپاس و قدر دانی خود را نثار استاد فرزانه جناب آقای دکتر محمد نبیونی می نمایم که با حوصله ای بی نظیر و رأفتی فراوان سخت-کوشی و پشتکار عمل در کار را به من آموخت.

از استاد گرانقدر جناب آقای دکتر کاظم پریور که این پایان نامه بهانه ای شد تا حقیر به اندازه وسع خویش از علم ایشان بهره مند گردم صمیمانه سپاسگزارم.

از استاد محترم سرکار خانم دکتر عادله دیو سالار که بدون هدایت و سخاوت علمی ایشان امکان تکمیل این پژوهش میسر نمی گردید، کمال تشکر و قدردانی را دارم.

از اساتید گرامی جناب آقای دکتر بهمن زینلی و سرکار خانم هما محسنی کوچصفهانی که با قبول زحمت داوری این پایان نامه، ما را از نقطه نظرات ارزشمند خویش بهره مند ساختند، تشکر می نمایم.

از سرکار خانم دکتر شهربانو عریان مدیر محترم گروه زیست شناسی و جناب آقای دکتر فرخ قهرمان نژاد نماینده محترم تحصیلات تکمیلی سپاسگزارم.

از جناب آقای دکتر ایمانی جهت تأمین زهر زنبور عسل و از جناب آقای دکتر منصوری ترشیزی جهت طراحی و سنتز کمپلکس پالادیوم مورد استفاده در این پژوهش تشکر می نمایم.

از دوست عزیز و همیشگی ام سرکار خانم عاطفه همتی به پاس عاطفه سرشارش که در طول دوران کارشناسی و کارشناسی ارشد از من دریغ ننمود بی نهایت سپاسگزارم.

از دوستان مهربان و صمیمی ام خانمها طیبه رمضانی و زهرا نظری که در تمامی مراحل کار دلسوزانه مرا یاری نمودند بی نهایت سپاسگزارم.

از تمامی دوستان عزیزی که در طول این دوران مشوق و یاریگر بنده بودند: خانم ها لیلا محلوجی، سارا میرسپاسی، صدیقه ناصری، خدیجه بهره بر، زهرا قراری، زهره زارع، محدثه محمدی، مریم رحیمی، سمیه ابراهیمی، الهه امینی، الهام امینی و آقای جواد رسولی کمال تشکر و قدردانی را دارم.

در پایان از خانواده عزیزم بالاخص پدر و مادر مهربانم صمیمانه سپاسگزاری می نمایم و این پایان نامه را به عنوان برگ سبزی پیشکش وجود سبزشان می نمایم.

چکیده

زهر زنبور (Bee venom = BV) ترکیبی است که بصورت سنتی برای تسکین درد و درمان بیماری‌های التهابی مزمن مانند آرتریت روماتوئیدها مورد استفاده بوده است. مطالعات اخیر تأثیر بالقوه زهر زنبور را در درمان سرطان اثبات می‌کنند. ملیتین و فسفولیپاز A2 دو جزء اصلی زهر زنبور می‌باشند که از بین این دو ملیتین بعنوان جز اصلی فعال زهر زنبور برای القاء آپوپتوز و دارا بودن اثرات ضد توموری شناخته شده است. از طرف دیگر یک مشکل اساسی که در مورد سیس پلاتین و مشتقات آن وجود دارد عوارض جانبی آنها بر روی کلیه‌ها است. این در صورتی است که این ترکیبات همچنان به عنوان عوامل ضد توموری کاربرد دارند. به علت تشابه شیمی فضایی پالادیوم به پلاتین، امروزه بسیاری از محققین در حال طراحی و ساخت کمپلکس‌های پالادیومی جدید و بررسی خواص ضدتوموری آنها می‌باشند تا با دارا بودن بیشترین خاصیت ضدتوموری دارای حداقل میزان سمیت باشند. لذا هدف از این پژوهش بررسی اثرات ضدتوموری زهر زنبور عسل و کمپلکس پالادیوم بای پریدین دای تیو کربامات نیترات به صورت جداگانه و توأم بر روی رده سلولی MOLT-4 می‌باشد. با این هدف سلولهای MOLT-4در محیط RPMI-1640 همراه با ۱۰٪FBS ، ۱۰۰unit/ml پنی سیلین و ۱۰۰mg/ml استرپتومایسین کشت شدند. در ادامه سلولها با زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم به صورت جداگانه و توأم به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت تیمار شدند. پس از طی مدت زمان مورد نظر، آنالیز مورفولوژی سلولها با استفاده از میکروسکوپ معکوس، درصد بقاء سلولها توسط آزمون MTT و نوع مرگ سلولی القاء شده توسط این ترکیبات توسط آنتی‌بادی انکسین V و به روش فلوسیتومتری مورد مطالعه قرار گرفت و سپس میزان بیان کاسپاز ۳ با استفاده از کیت کاسپاز ۳ به روش رنگ سنجی بررسی شد. بر اساس نتایج حاصل ازتست MTT میزان Cc_{50} زهر زنبور پس از طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۶/۳ و ۰/۶µg/ml و میزان Cc_{50} کمپلکس پالادیوم پس از طی ۲۴ و ۴۸ ساعت به ترتیب ۱/۷ و ۰/۸µM بود. آنالیز مورفولوژیکی و نتایج حاصل از آنتی بادی انکسین V نشان داد که مرگ القاء شده توسط زهر

زنبور و کمپلکس پالادیوم اساساً از نوع آپوپتوز می‌باشد. مسیر آپوپتوتیک فعال شده با کمپلکس پالادیوم و ترکیب این کمپلکس با زهر زنبور وابسته به کاسپاز ۳ بود در صورتی که زهر زنبور در الگوی غیر وابسته به کاسپاز ۳ موجب القاء آپوپتوز گردید. بر اساس یافته های حاصل از این مطالعه زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم قادر به القاء آپوپتوز در یک الگوی وابسته به دوز و زمان در این سلولها می‌باشند و اثرات سیتوتوکسیک این ترکیبات در حضور یکدیگر تقویت می‌گردد. در پایان این گونه نتیجه گیری شد که زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم دارای اثرات ضدتوموری چشمگیری به صورت جداگانه و توأم می‌باشند و با انجام مطالعات بیشتر می‌توانند بعنوان ترکیبات ضدتوموری کارآمدی مورد استفاده قرار گیرند.

کلمات کلیدی: *زهر زنبور عسل، کمپلکس پالادیوم، آپوپتوز، رده سلولی MOLT-4.*

فهرست مطالب

فصل اول: مقدمه

۱-۱ سرطان ۱۳

۱-۱-۱ لوکمی لنفوبلاستی حاد سلول T (T-ALL) ۱۳

۱-۲ مراحل بلوغ سلولهای T ۱۵

۱-۳ سیگنالینگ نرمال Notch ۱۷

۱-۳-۱ نقش سیگنالینگ Notch در مسیر تکوین لنفوسیتT ۱۹

۱-۳-۲ Notch-1 و T–ALL ۲۰

۱-۴ رده سلولی MOLT-4 ..... ۲۱

۱-۵ مرگ سلولی ۲۲

۱-۵-۱ نکروز ۲۲

۱-۵-۲ اتوفاژی ۲۳

۱-۵-۳ آپوپتوز ۲۵

۱-۵-۳-۱ تاریخچه آپوپتوز ۲۵

۱-۵-۳-۲ ویژگی‌های اصلی سلول آپوپتوزی ۲۶

۱-۵-۳-۲-۱ تغییرات مورفولوژیکی ۲۶

۱-۵-۳-۲-۲ تجزیه پروتئینها ۲۷

۱-۵-۳-۲-۳ تجزیه DNA ۲۸

۱-۵-۳-۳ عوامل مهم دخیل در آپوپتوز ۲۸

۱-۵-۳-۳-۱ کاسپازها ۲۸

۱-۵-۳-۳-۲ اعضای خانواده Bcl-2 ..... ۳۰

۱-۵-۳-۳-۳ ژن سرکوبگر تومور P53 ..... ۳۲

۱-۵-۳-۴ مسیرهای مرگ سلولی آپوپتوزی ۳۳

۱-۵-۳-۴-۱ مسیر خارجی یا آپوپتوز القاء شده توسط گیرنده های مرگ ۳۳
۱-۵-۳-۴-۲ مسیر داخلی یا مسیر میتوکندریایی آپوپتوز ۳۴
۱-۵-۳-۵ کنترل اندامکی آپوپتوز ۳۶
۱-۵-۳-۵-۱ شبکه اندوپلاسمی ۳۷
۱-۵-۳-۵-۲ لیزوزم ۳۸
۱-۶ درمان سرطان ۳۹
۱-۷ آپوپتوز و شیمی درمانی ۳۹
۱-۸ زهر زنبور عسل ۴۰
۱-۸-۱ ترکیبات موجود در زهر زنبور ۴۰
۱-۸-۲ خواص درمانی زهر زنبور ۴۲
۱-۹ داروهای ضد سرطان حاوی فلز (متالو داروها) ۴۲
۱-۹-۱ کشف خواص ضد توموری کمپلکس‌های پلاتین ۴۳
۱-۹-۲ کمپلکس‌های پلاتین و مکانیسم عمل آنها ۴۳
۱-۹-۳ ظهور کمپلکس‌های پالادیوم ۴۴
۱-۱۰ فرضیه‌ها و اهداف پایان نامه ۴۶

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱ مواد، وسایل و دستگاههای مورد نیاز ۴۹
۲-۱-۱ مواد مورد نیاز ۴۹
۲-۱-۲ وسایل مورد نیاز ۵۰
۲-۱-۳ دستگاههای مورد نیاز ۵۰
۲-۲- کشت سلول ۵۱
۲-۳ شمارش سلولی ۵۱
۲-۴ پاساژ سلول‌ها ۵۳

۲-۵ ذخیره سلول ها برای مدت طولانی ۵۳
۲-۶ ذوب نمودن سلولهای منجمد شده ۵۴
۲-۷ نحوه بررسی تأثیر زهر زنبور بر سلولهای MOLT-4 ..... ۵۴
۲-۸ نحوه بررسی تأثیر کمپلکس پالادیوم بر سلولهای MOLT-4 ..... ۵۵
۲-۹ نحوه بررسی تأثیر همزمان زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم بر سلولهای MOLT-4 ..... ۵۵
۲-۱۰ ارزیابی مورفولوژی سلولها توسط میکروسکوپ معکوس ۵۵
۲-۱۱ سنجش میزان بقاء سلولی با روش MTT ۵۶
۲-۱۲ ارزیابی آپوپتوز با استفاده از آزمون فلوسیتومتری ۵۷
۲-۱۳ اندازه گیری غلظت کل پروتئین (total protein concentration) به روش بردفورد ۵۹
۲-۱۴ بررسی میزان بیان کاسپاز ۳ با روش رنگ سنجی ۶۱
۲-۱۵ آنالیز آماری ۶۳

فصل سوم: نتایج

۳-۱ نتایج حاصل از آنالیز مورفولوژیک سلولهای MOLT-4 قبل و بعد از تیمار با زهر زنبور، کمپلکس پالادیوم به صورت جداگانه و توأم ۶۵
۳-۲ نتایج حاصل از بررسی میزان بقاء سلولی در رده سلولی MOLT-4 تحت تأثیر زهر زنبور با استفاده از روش MTT ۶۷
۳-۳ نتایج حاصل از بررسی میزان بقاء سلولی در رده سلولی MOLT-4 تحت تأثیر کمپلکس پالادیوم با استفاده از روش MTT ۶۹
۳-۴ نتایج حاصل از اثر هم افزایی زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم بر میزان بقاء سلولهای MOLT-4 با استفاده از روش MTT ۷۱
۳-۵ نتایج حاصل از بررسی نوع مرگ سلولی القاء شده توسط زهر زنبور و کمپلکس پالادیوم و هر دوی این ترکیبات به صورت همزمان در رده سلولی MOLT-4 با استفاده از روش فلوسیتومتری ۷۲
۳-۶ نتایج به دست آمده از بررسی محتوای غلظت کل پروتئین موجود در عصاره سیتوزولی سلولهای تیمار شده و تیمار نشده ۷۳

۳-۷ نتایج حاصل از بررسی میزان بیان کاسپاز ۳ در سلولهای MOLT-4 پس از تیمار با زهر زنبور، کمپلکس پالادیوم و هر دو این ترکیبات به صورت همزمان بر اساس روش رنگ سنجی ۷۴

فصل چهارم: بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ بحث و تفسیر ۷۸

۴-۲ نتیجه‌گیری کلی ۸۵

۴-۳ پیشنهادات..... ۸۶

فصل پنجم: منابع

منابع انگلیسی..... ۷۷

منبع فارسی ۹۶

فصل اول

مقدمه

۱-۱ سرطان

سرطان بعنوان یک مشکل جهانی و دومین عامل مرگ و میر انسانی در کشورهای توسعه یافته است. خود کفا بودن در تکثیر سلولی، عدم حساسیت به سیگنالهای مهار کننده رشد، طفره رفتن از مرگ سلولی برنامه ریزی شده ، عدم محدودیت در توانایی تکثیر، وقوع آنژیوژنز، تهاجم بافتی و متاستاز از جمله تغییرات فیزیولوژیکی می‌باشند که تقریباً در تمامی انواع تومورهای انسانی یافت می‌شوند. تفاوتهای ژنتیکی بیشمار و تغییرات اپی‌ژنتیکی که در سرطان رخ می دهند توضیحی از طبیعت ناهمگن سرطان و پیچیده بودن درمان آن می باشد Hanahan & Weinberg (2000).استفاده از شیمی درمانی بعنوان یکی از روشهای متداول در درمان سرطان به بیش از پنجاه سال پیش بر می‌گردد. مشاهده اثرات گاز خردل سولفوری استفاده شده در طی جنگ جهانی اول بر روی بافتهایی مانند مغز استخوان و بافت‌های لنفوئیدی نظر دانشمندان را به استفاده از مواد شیمیایی در درمان سرطان معطوف ساخت. مشخص شده است که عوامل ضدتوموری قادر به برانگیختن یکسری از پاسخ‌هایی می باشند که تکثیر و تمایز را در سلولهای توموری تحت تأثیر قرار می دهند (Colvin 1999). آپوپتوز بعنوان یکی از انواع مرگ برنامه ریزی شده از جمله این پاسخ ها است که جنبه‌های مختلف آن نیز به خوبی مورد بررسی قرار گرفته است.

۱-۱-۱ لوکمی لنفوبلاستی حاد سلول T(T-ALL)

T-ALL یک اختلال نئوپلاستیک از لنفوبلاستهای متعهد شده به سلول T می‌باشدکه ۱۵٪ و ۲۵٪ از لوکمی لنفوبلاستی حاد (ALL) را به ترتیب در کودکان و بزرگسالان شامل می‌شود (Graux et al., 2006). مبتلایان به T-ALL دارای علائمی همچون افزایش تعداد لوکوسیتها (hyperleukocytosis)، وجود توده‌های صفاقی و بیماری‌های مرتبط با سیستم عصب مرکزی می‌باشند (Tosello &Ferrando, 2009). یکی از برجسته ترین ناهنجاری-

های ژنتیکی شناخته شده در مبتلایان به T-ALLوجود جهش‌های فعال در مولکول Notch-1 می‌باشد به طوری که این ناهنجاری در بیش از ۵۰٪ از مبتلایان به این نوع لوکمی شناسایی شده است(Weng etal.,2006).از طرف دیگر بازآرایی‌های ساختاری در ژنوم نیز، یکی دیگر از دلایل وقوع این نوع لوکمی می باشند. به‌طور مثال در طی تکوین سلول T و زمانی که نوترکیبی V(D)J یا سوماتیک (V(D)J =somatic recombination) recombinationبوقوع می‌پیوندد چندین ژن دیگر نیز از نظر رونویسی فعال می‌باشند و ساختار کروماتینی آنها بصورت باز است. این ژنها نسبت به عملکرد آنزیمهای ریکامبیناز حساس می‌باشند و ممکن است در اثر نوترکیبی نابجا، ژنهای کد کننده برخی از فاکتورهای رونویسی در کنار پروموتورها و یا enhancers ژنهای کد کننده رسپتورهای سلول T(T-cell receptors=TCRs) قرار گیرند که این امر خود زمینه بیان نابجا این ژنها را در طی تکوین تیموسیتها و در نتیجه ابتلا به T-ALL را فراهم می‌کند. این جابه‌جایی‌ها که لوکوسهای TCR را درگیر می‌کنند در حدود ۳۵٪ از مبتلایان به این نوع لوکمی قابل تشخیص می‌باشند ,.et al Cauwelier)(2006. یکی دیگر از انواع بازآرایی ها (در اکثر موارد از نوع جا به‌جایی) ، منجر به ایجاد ژن های فیوز شده می‌گردد. زمانی که دو ژن با یکدیگر فیوز می‌شوند، پروتئین شیمریک (chimeric protein) با خاصیت انکوژنیک را کد می کنند. بطور مثال SIL-TAL1 در حدود ۳۰-۹٪ از کودکان مبتلا به T-ALLو به نسبت کمتر در بالغین مبتلا به این لوکمی مشاهده می‌شود(Asnafi et al., 2003).

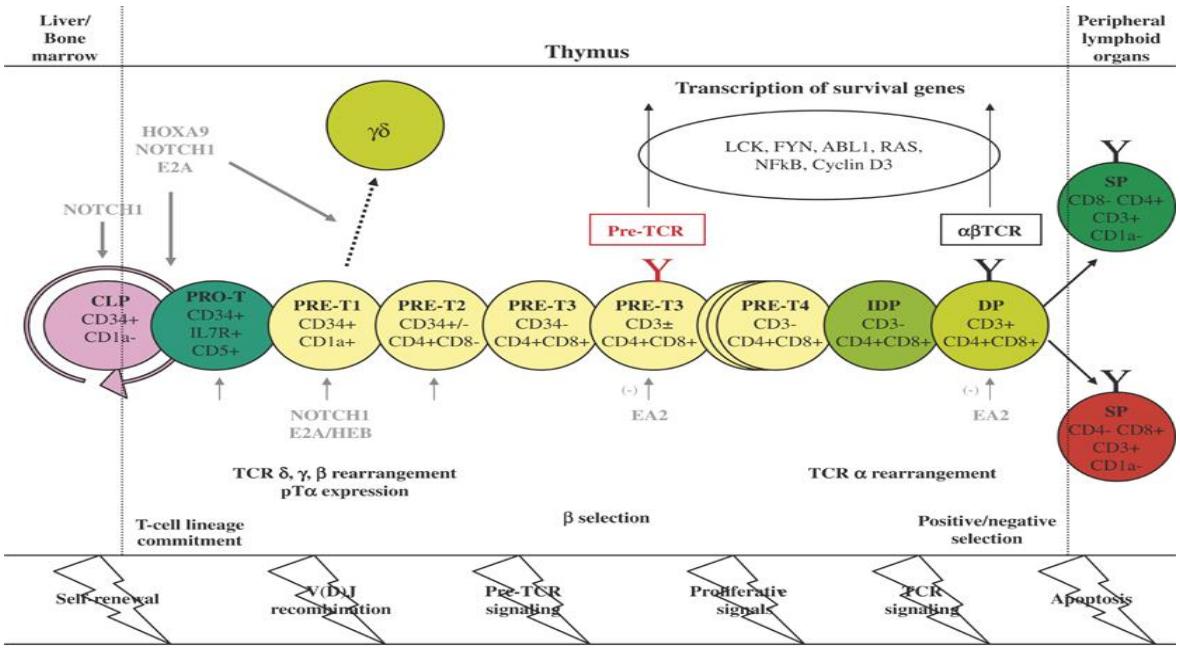
با توجه به اهمیت مولکول Notch-1 در تکوین سلول T و در بیماری‌زایی این نوع لوکمی پس از اشاره مختصر به نحوه تکوین سلولT، بصورت اختصاصی به بررسی این فاکتور و تغییرات آن در T-ALL می‌پردازیم.

۲-۱ مراحل بلوغ سلولهای T

لنفوسیتهای T تنها نوع سلولهای خونی می‌باشند که مراحل بلوغ و تکوین خود را در تیموس سپری می‌کنند. لنفوسیتهای B و T از یک سلول پیشساز مشترک (conmon lymphoid progenitor=CLP)در مغز استخوان منشأ می‌گیرند. تکوین سلول B در مغز استخوان ادامه می‌یابد در حالی که پیشسازان سلولT به تیموس مهاجرت کرده و در آنجا بالغ میشوند (Abbas et al., 1991).

بلوغ سلولهای T مشتمل بر سلسله مراحلی است و هر مرحله با الگوی خاصی از بیان TCR و کمک گیرنده‌های CD4 و CD8 همراه است. نا بالغترین تیموسیت‌های قشری که به تازگی از مغز استخوان فرد بالغ و یا کبد جنین مهاجرت نموده‌اند مولکولهای TCR، CD4، CD8 و CD3را بیان نمی‌کنند. این سلولها به علت عدم بیان CD4، CD8 تیموسیت های دو گانه منفی (double negative thymocyte) نامیده می شوند. در واقع این سلولها در مرحله pro-T از بلوغ سلول قرار دارند (Rolink et al., 2006). مرحله بعدی بلوغ سلول T مرحله pre-T است. در این مرحله جایگاه‌های ژنی مربوط بهTCRy، TCRβوTCRδمتحمل نوترکیبی سوماتیک می-شوند(Carrasco et al., 2002). گیرنده‌های آنتی‌ژنی بسیار متنوع سلولهای Tتوسط ژنهایی کد می‌شوند که در اثر نوترکیبی سوماتیک از تعداد محدودی قطعات ژنی تشکیل می‌شوند. در سلولهای در حال تکوینی که قرار است αβTCR را بیان کنند، جایگاه ژنی زنجیره β قبل از جایگاه ژنی زنجیره α متحمل نوترکیبی می‌شود. با ترجمهmRNA بالغ زنجیره β، پلی پپتید زنجیره β ساخته می‌شود. زنجیره β به زنجیره $Pre\text{-}T_{\alpha}$ که نامتغیر است متصل می‌شود تا گیرنده Pre-T ایجاد شود. این گیرنده سیگنالهایی را به سلول انتقال می‌دهد که سبب القاء بیان CD4 وCD8 و تکثیر بیشتر تیموسیت‌های نابالغ می‌شوند. تیموسیتها در مرحله بعدی بلوغ CD4 و CD8 را بیان می‌کنند و به تیموسیتهای دوگانه مثبت (double positive thymocytes) تبدیل می شوند. در این مرحله از

بلوغ سلول T جایگاه ژنی α متحمل نوترکیبی سوماتیک گشته و پس از این رویداد، پلی پپتید زنجیره α ساخته می‌شود و مقادیر کمی TCR بر روی سلول بیان می‌گردد (Wiest et al., 2006). سلولهای دوگانه مثبت به دلیل بیان TCRکامل قدرت پاسخگویی به آنتی‌ژن را دارند و متحمل گزینش مثبت و منفی (positive and negative selection) می‌شوند. فرآیندهای گزینشی سبب بلوغ تیموسیتهای دو گانه مثبت بیان کننده TCR و شکل‌گیری گنجینه سلول T می‌شوند. گنجینه سلول T به نحوی شکل می‌گیرد که اولاً محدود به MHC خودی است و ثانیاً نسبت به اجزاء خودی تحمل دارد. تیموسیت‌های دو گانه مثبت زمانی که برای اولین بار TCRsαβ را بیان می‌کنند، با پپتیدهای خودی عرضه شده با مولکولهای MHC خودی مواجه می‌شوند. گزینش مثبت فرآیندی است که در آن تیموسیت‌هایی کهTCR آنها با شدت اتصالی پایینی به کمپلکسهای پپتید خودی-MHC خودی متصل می‌شوند وادار به ادامه حیات می‌شوند در حالی که تیموسیتهایی که این کمپلکس را شناسایی نمی‌کنند از بین می‌روند. این فرآیند موجب می‌شود که سلولهای T بالغ محدود به MHCخودی باشند. گزینش منفی فرآیندی است که در جریان آن تیموسیت هایی که گیرنده‌های آنتی‌ژنی آنها با قدرت اتصالی زیاد به آنتی ژنهای پپتیدی همراه مولکولهای MHC خودی اتصال می یابند از بین می‌روند این فرآیند سبب حذف تیموسیت-هایی می‌شود که علیه آنتی‌ژنهای فراگیر خودی به شدت واکنش نشان می دهند. سلولهایی که فرآیندهای گزینشی را با موفقیت پشت سر می‌گذارند به بلوغ خود ادامه می‌دهند و به سلولهای $CD4^+$ و یا $CD8^+$ تبدیل می‌شوند که این سلولها، تیموسیتهای یگانه مثبت (single positive thymocyte)نامیده می‌شوند (Boehmer & Fehling 1997; Graux et al., 2006). سلولهای یگانه مثبت سپس تیموس را ترک نموده و وارد بافت های لنفوئیدی محیطی می‌گردند (شکل۱-۱)(Graux et al., 2006).

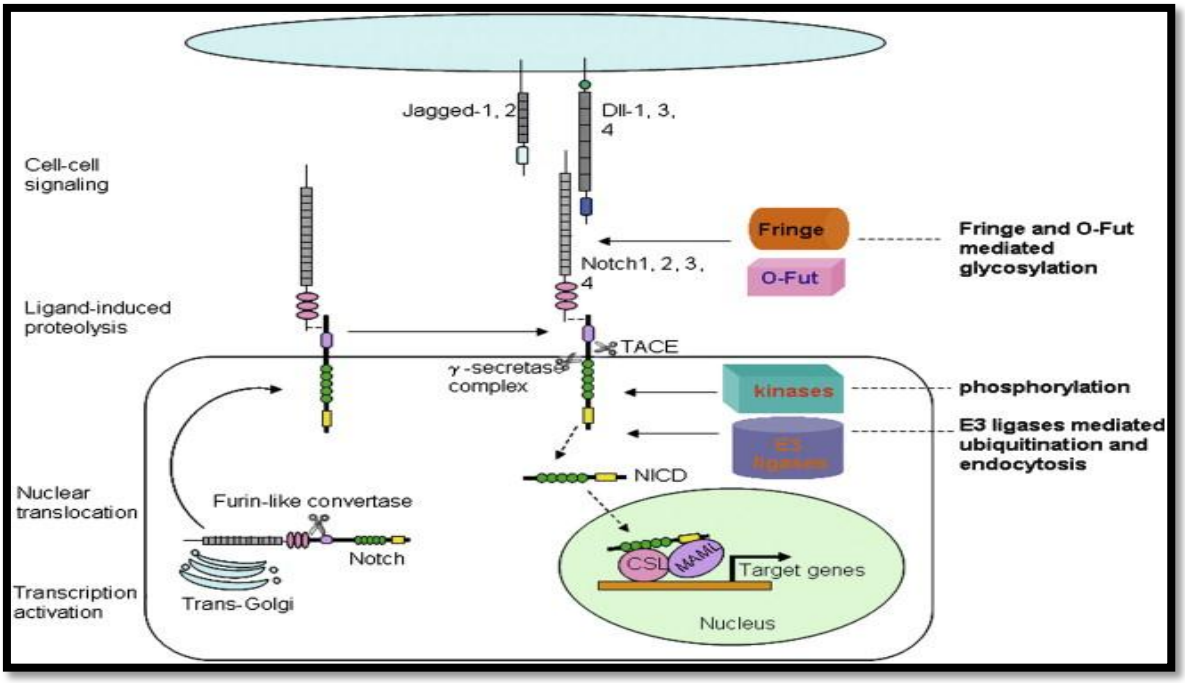


شکل۱-۱) تصویر شماتیک از مراحل مختلف تکوین سلول T در تیموس. این مراحل به ترتیب شامل مهاجرت CLP از کبد جنینی و یا مغز استخوان فرد بالغ به تیموس، مرحله Pro-T (دوگانه منفی) (که در این مرحله مولکولهای TCR، CD3، CD4 وCD8 بیان نمی‌شوند)، مرحله Pre-T(که بازآرایی γ, δ, TCRβو بیان Pre-Tα را در بر می‌گیرد)، مرحله دو گانه مثبت (که بازآراییTCRα، گزینش مثبت و گزینش منفی را در بر می‌گیرد)، مرحله یگانه مثبت و مهاجرت سلول‌های یگانه مثبت به بافتهای لنفوئیدی محیطی می‌باشند (Graux et al.,2006).

۱-۳ سیگنالینگ نرمال Notch

Notch.و همولوگهای آن در مهره داران به عنوان رسپتورهایی در مسیرهای انتقال سیگنال عمل می کنند که بسیاری از جنبه های تکوینی و هومئوستازی بافتی را کنترل می‌نمایند. پستانداران دارای چهار رسپتور Notch(Notch1-4) و پنج لیگاند مربوط به این رسپتور به نام-های Jagged1 , 2(همولوگ Serrate در دروزوفیلا) و Delta 1, 3, 4 (همولوگهای Deltaدر دروزوفیلا) می‌باشند. این رسپتورها در بسیاری از انواع سلولها بیان می‌شوند و در بسیاری از فرآیندهای تمایزی و تصمیم گیری‌های دودمانی در طی تکوین جنینی، همچنین در

فرآیند خود نوسازی(self-renewing) در بالغین، تمایز سلولی و حفظ حالت بنیادی سلول درگیر می باشند (Greenwald, 1998). Notch1 یک رسپتور عرض غشایی است که دارای زیر واحدهای خارج سلولی، عرض غشایی و داخل سلولی می باشد. زیر واحد خارج سلولی آن از دومینهای مختلفی از جمله دومین دایمری شدن(heterodimerization domain =HD) تشکیل شده است. زیر واحد داخل سلولی آن نیز دارای دومین های مختلفی از جمله دومین PEST می‌باشد که turnover، دومین داخل سلولی مولکول Notch(intracellular Notch domain=ICND) را تنظیم می‌کند(Tosello & Ferrando, 2009). برهمکنش بین لیگاند و رسپتور یک تغییر در شکل سه بعدی رسپتورهای Notch ایجاد می‌کند که منجر به کلیواژ پروتئولیتیک این رسپتورها می‌گردد. اولین کلیواژ بوسیله متالوپروتئیاز ADAM در دومین خارج سلولی بوقوع می‌پیوندد(Mumm et al., 2000) که این کلیواژ رسپتور Notch را برای وقوع دومین کلیواژ که بوسیله γسکرتاز (γ-secretase) در زیر واحد عرض غشایی بوقوع می‌پیوندد حساس می سازد(Schroeter et al., 1998). به دنبال این دو کلیواژ NICD به سیتوپلاسم آزاد شده و وارد هسته می‌گردد تا در آنجا با همکاری CSL رونویسی ژنهای هدف خود را فعال نماید (شکل ۱-۲) (Yin et al., 2010).



شکل۱-۲) تصویر شماتیک از آبشار سیگنالینگ Notch.رسپتورهای Notch پروتئین‌های عرض غشایی تک عبوری هستند که توسط لیگاندهای متصل به غشاء خانواده‌های Jagged و-Delta like فعال می‌گردند. پس از هضم بواسطه Furin، Notch در دستگاه گلژی، این مولکول به غشاء پلاسمایی منتقل شده و یک رسپتور هترودایمر بالغ را در سطح غشاء تشکیل می‌دهد. برهمکنش این رسپتور با لیگا ندهایش منجر به انجام دو کلیواژ پروتئولیتیکی در این رسپتور و آزاد شدن NICD از غشاء می‌گردد. در نهایت NICD وارد هسته شده تا در آنجا با همکاری CSL رونویسی ژنهای هدف خود را فعال نماید (Yin et al., 2010).

۱-۳-۱ نقش سیگنالینگ Notch در مسیر تکوین لنفوسیتT

سیگنالینگNotch وظایف مهمی را در مسیر تکوین سلولT به عهده دارد. مطالعات نشان می-دهند که بیان Notch-1 در سلولهای بنیادی مغز استخوان منجر به پیشبرد مراحل تکوین سلول T در خارج از تیموس گشته و عدم بیان این مولکول توقف تکوین سلولT در مرحله پروژنیتورهای اولیه را موجب می شود(Macdonald et al., 2001).عملکرد اساسی مولکول

Notch-1 در تخصص یافتگی سرنوشت سلولT از جنبه‌هایی است که به بهترین نحو مورد بررسی قرار گرفته است. در غیاب رسپتور Notch-1 پروژنیتورهایی که از مغز استخوان به تیموس وارد شده‌اند به سلول Bتکوین می یابند. این یافته نشان می‌دهد که این رسپتور، پروژنیتورهای لنفوئیدی اولیه را برای تکوین یافتن به دودمان سلول T آموزش می‌دهد. به عبارت دیگر این سیگنالینگ یک فاکتور لازم وکافی برای متعهد شدن به دودمان سلولT است (Radtke et al., 2004). پس از متعهد شدن به دودمان سلول T، دومین تصمیم گیری در مورد سرنوشت سلولی که پروژنیتورهای تیموسیتی اولیه با آن مواجه می‌شوند این است که به سمت βα تمایز یابند یا(Macdonald et al., 2001). yδبرخی مطالعات نشان می‌دهند که سیگنالینگNotch-1 Notch-1 منجر به شروع تکوین βα می‌گردد. سیگنالینگ Notch-1عملکرد دوگانه‌ای در طی تکوین سلول βα دارد که با بازآرایی سوماتیک و حذف تیموسیتهایی که قادر به تشکیل TCR عملکردی نمی‌باشند مرتبط می‌باشد (Newton et al., 2000; Wolfer e al., 2002). از طرف دیگر Notch-3 در تمایز سلولT کمکی دخیل می‌باشد. پس از تحریک آنتی‌ژنی سلولهای $CD4^{+}T$، این سلولها به دوکلاس از سلولهای T کمکی (TH_1 و TH_2) که بوسیله الگوی سایتوکاینیشان مشخص می‌شوند، تمایز می‌یابند. سیگنالینگ Notch3 از طریق Delta1 سلولهای$CD4^{+}T$را به سمت فنوتیپ TH_1 سوق میدهد (Maekawa et al., 2003).

۱-۳-۲ Notch-1و T–ALL

اولین همولوگ Notch دروزوفیلا در پستانداران، در انسان هایی که از T-ALLرنج می‌بردند شناسایی شد. در نتیجه جابه‌جایی کروموزومی (7;9) (q34;q34.3) که C ترمینال رسپتور Notch-1را در کنار لوکوس TCRβقرار می‌دهد، یک پروتئین شیمریک بیان می‌گردد که منجر به بروزT-ALL می‌شود. اما این نوع جابه جایی تنها در حدود ۱٪ از مبتلایان به T-