بسم الله الرحمن الرحيم

وزارت علوم تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

دانشگاه علوم پزشکی تهران

مرکز تحقیقات بیماری های گوارش و کبد

رساله دکترای تخصصی در

رشته ژنتیک مولکولی

مطالعه بیان cDNA فاکتور۹ انسانی در سلولهای سرطانی شده کبدی(HepG2) با استفاده از پروموترهای کایمریک غیر اختصاصی و اختصاصی کبدی

نگارش

محمد رضا سام

استاد راهنما

دکتر علیرضا زمردی پور

اساتید مشاور

دکتر محمد علی شکرگزار

دکتر موسی گردانه

بهمن ۱۳۸۸

چکیده

بیماری هموفیلی B، بصورت مغلوب وابسته به جنس به ارث می رسد و فراوانی آن در جمعیت مـردان ۱/۳۰۰۰۰ می‌باشد. فقدان و یا نقص در عملکرد پروتئین فاکتور۹ در پلاسما منجـر بـه ایـن بیمـاری مـی گردد. سلولهای کبدی به عنوان جایگاه اصلی تولید فاکتور ۹ انعقادی، میزبان مناسبی جهت بررسـی بیـان فاکتور ۹ قلمداد می شوند. جهت بیان اختصاصی در سلولهای کبدی، به توالی هـای تنظیمـی اختـصاصی کبدی نیاز است. در این ارتباط تلفیقی از توالی افزاینده آلدولاز B کبدی رت با پروموتر اختصاصی کبدی آلفا-۱ آنتی تریپسین و با پروموتر CMV جهت ساخت پلاسمیدهای غیر ویروسی به منظور بیان فاکتور ۹ در سلولهای کبدی انجام پذیرفت. سپس کارائی پلاسمیدهای ساخته شـده در سـلولهای مقـاوم HepG2 توسط آزمون الایزا بر روی محـیط کـشت و درون سـلولهای نوترکیـب و آزمـون نیمـه کمـی RT-PCR بررسی گردید.

توالی افزاینده آلدولازB ، عملکرد هر دو پروموتر اختصاصی کبدی و غیر اختصاصی را به ترتیـب ۸ و ۳ برابر بهبود بخشید. بالاترین بیان فاکتور ۹ از تلفیق توالی افزاینده آلدولاز B با پروموتر ویروسی CMV حاصل گردید که بالاترین تجمع فاکتور۹ در درون سلول نیز از این سازه ژنی بدست آمد. بنابراین، توالی افزاینده آلدولاز کبدی به عنوان یک توالی تنظیمی سیس مناسب جهـت بیـان پـروتئین هـای مختلـف در هپاتوسیتها پیشنهاد می گردد.

با توجه به نقش و عملکرد اینترون ها در مراحل پس از رونویسی، در نسل دوم پلاسمیدهای نوترکیـب، اینترون های ۱، ۲ بتا گلوبین انسانی بطور جداگانه و بطور همزمان در موقعیت مشابه در cDNA فاکتور۹

قرار داده شدند. همچنین، جهت افزایش کارائی ترجمه، توالی کوزاک قبل از شروع کدون ترجمه در سازه های ژنی ساخته شده قرار داده شد. استفاده از اینترون های بتا گلوبین در cDNA فاکتور۹ بیان این پروتئین را کاهش داد. این کاهش بیان را می توان با احتمال، به اسپلایسینگ نادرست اینترون های بتا گلوبین در cDNA فاکتور۹ نسبت داد.

کلید واژه: هموفیلی B ، فاکتور ۹ انسانی ، پروموتر آلفا-۱ آنتی تریپسین ، پروموتر CMV ، افزاینده آلدولاز B کبدی ، اینترون های بتا گلوبین انسانی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱. بیماری هموفیلی B یا کریسمس ۱

۱-۱-۱. تاریخچه بیماری هوفیلی ۱

۱-۱-۲. علائم بیماری هموفیلی ۱

۱-۱-۳. ارتباط فامیلی در بیماری هموفیلیB ۲

۱-۱-٤. طبقه بندی بیماران هموفیلیB ۳

۱-۱-۵. روش های درمانی بیماران هموفیلی B ٤

۱-۲. مکانیسم های انعقاد ۵

۱-۲-۱. مسیر داخلی انعقاد

۶ ۱-۲-۲. مسیر خارجی انعقاد ۷

۱-۳. بررسی های آزمایشگاهی ۸

۱-۳-۱. آزمون زمان پروترومبین ۹

۱-۳-۲. آزمون زمان نسبی ترومبوپلاستین فعال شده ۹

۱-۳-۳. آزمون زمان ترومبین ۱۰

۱-۳-٤. آزمایشات تائیدی جهت اختلالات انعقادی ۱۰

۱-۳-٤-۱. آزمایشات PT و APTT بر روی پلاسمای غنی شده ۱۰

۱-۳-٤-۲. آزمون الایزا ۱۱

۱-٤. ساختار ژنی و پروتئینی فاکتور۹ انعقادی درانسان ۱۱

۱-۵. تغییرات پس از ترجمه فاکتور ۹ و نقش این تغییرات در فعالیت بیولوژیکی این پروتئین ۱۴

۱-۶. پلی مورفیسم در ژن فاکتور ۹ ۱۶

۱-۶-۱. انواع جهش های ژنی در فاکتور ۹ ۱۷

۱-۶-۱-۱. جهش های نقطه ای ۱۷

۱-۶-۱-۲. سایر جهش ها ۱۸

۱-۷. آسیب شناسی مولکولی ۱۹

۱-۷-۱. جهش های تاثیرگذار در اتصال فاکتور۹ به فاکتور۸ ۲۰

۱-۷-۲. جهش های موثر در کمبود فاکتور۹ درطول درمان با ضد انعقادها ۲۰

۱-۷-۳. جهش ها در پروموتر فاکتور۹ ۲۱

۱-۸ تعیین جهش ۲۲

۱-۹. مروری بر مطالعات انجام شده در رابطه با درمان هموفیلی به روش ژن درمانی ۲۳

۱-۹-۱. وکتورهای رتروویروسی ۲۴

۱-۹-۲. وکتورهای آدنو ویروسی ۲۴

۱-۹-۳. وکتورهای Adeno-associated ۲۵

۱-۹-۴. وکتورهای غیر ویروسی (پلاسمیدی) ۲۵

۱-۹-۵. پیشرفتهای اخیر در رفع نسبی برخی از معایب وکتورهای ویروسی در ژن درمانی ۲۶

۱-۹-۶. تنظیم بیان ژن ۲۸

۱-۱۰. رده های سلولی استفاده شده در بیان ژن فاکتور ۹ و مزیت استفاده از سلولهای کبدی ۳۲

۱-۱۱. اهمیت و ضرورت انجام تحقیق در زمینه بیماری هموفیلی B ۳۳

۱-۱۲. اهداف این تحقیق ۳۴

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱. مواد و وسایل لازم جهت بخش مولکولی ۳۵

۲-۲. مواد و وسایل لازم جهت بخش سلولی ۴۸

۲-۳. طرز تهیه محیط کشت باکتریایی ۵۲

۲-۴. کشت باکتری ها بر روی محیط جامد (پلیت) و مایع ۵۲

۲-۵. انجماد و ذخیره سازی باکتری ها ۵۳

۲-٦. تهیه سلولهای باکتریایی مستعد و ذخیره سازی آنها ۵۳

۲-۷. روش‌های بخش مولکولی ۵۴

۲-۷-۱. استخراج DNA ژنومی از گلبولهای سفید خون انسان و رتوس نوروژیکوس با استفاده از لیز قلیائی

بوسیله جوشانیدن ۵۴
۲-۸. واکنش PCR ۵۵
۲-۸-۱. واکنش Hot start-PCR جهت تکثیر توالی افزاینده ژن آلدولاز B ۵۷
۲-۸-۲. Colony PCR ۵۷
۲-۹. تهیه ژل آگارز و رنگ آمیزی آن با اتیدیوم بروماید ۵۸
۲-۱۰. خالص سازی محصولات بدست آمده از هضم‌های آنزیمی و PCR از ژل آگارز ۵۹
۲-۱۱. تهیه پلاسمید ۶۰
۲-۱۱-۱. تهیه DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیائی در مقیاس کم ۶۰
۲-۱۱-۲. تهیه DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیائی در مقیاس کم با استفاده از کیت شرکت Roche ۶۲
۲-۱۱-۳. تهیه DNA پلاسمیدی به روش لیز قلیائی درمقیاس بالا ۶۳
۲-۱۲. اندازه گیری غلظت DNA ۶٤
۲-۱۳. دست ورزی DNA ۶۵
۲-۱۳-۱. برش یا هضم آنزیمی DNA پلاسمیدی ۶۶
۲-۱۳-۲. واکنش اتصال ۶۶
۲-۱۳-۳. آدنیله کردن محصولات تکثیر شده با آنزیم *Pfu* در واکنش PCR ۶۷
۲-۱٤. ترانسفورم کردن باکتری ها ۶۸
۲-۱۵. تعیین توالی نوکلئوتیدی ۶۹
۲-۱۶. روشهای سلولی ۶۹

۲-۱۶-۱. طرز تهیه محیط کشت سلولی RPMI-1640 ۶۹
۲-۱۶-۲. شمارش سلولی ۷۰
۲-۱۶-۲-۱. محاسبه درصد سلولهای زنده در سوسپانسیون سلولی ۷۰
۲-۱۷. کشت سلولهای Hek-293T و HepG2 ۷۱
۲-۱۸. انجماد سلولها و کشت مجدد سلولهای منجمد شده ۷۱
۲-۱۹. پاساژ دادن سلول های تک لایه ای ۷۲
۲-۲۰. تعیین دوز کشنده دارو به روش MTT assay ۷۲
۲-۲۱. تهیه پلیت حاوی سلولهای تک لایه ای جهت ترانسفکشن با فیوجین-۶ ۷۳
۲-۲۱-۱. انتخاب سلولهای HepG2 ترانسفکت شده پس از تیمار با جنتیسین ۷۴
۲-۲۲. روشهای بررسی بیان فاکتور۹ در سلولهای ترانسفکت شده Hek-293T و HepG2 ۷۵
۲-۲۲-۱. اندازه گیری فعالیت انعقادی با روش APTT ۷۶
۲-۲۲-۲. اندازه گیری میزان کمی فاکتور ۹ در محیط کشت و درون سلولها با روش ساندویچ الایزا ۷۷
۲-۲۲-۳. استخراج RNA تام از سلول ها با هدف بررسی بیان در سطح mRNA ۷۹
۲-۲۲-۳-۱. واکنش RT-PCR نیمه کمی یک مرحله ای ۸۱
۲-۲۲-۳-۲. واکنش RT-PCR نیمه کمی دو مرحله ای ۸۲
۲-۲۳. محاسبات آماری ۸۴
۲-۲۴. نرم افزارهای بکار رفته در این مطالعه ۸۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱. نتایج بخش مولکولی ۸۵

۳-۱-۱. عوامل تنظیمی سیس بکار رفته در این پژوهش ۸۵

۳-۱-۲. مراحل ساخت سازه های ژنی ۸۶

۳-۱-۲-۱. افزودن توالی ۶ نوکلئوتیدی کوزاک قبل از شروع کدون ترجمه (ATG) ۸۷

۳-۱-۲-۲. ایجاد برش آنزیمی مورد نظر در دو انتهای توالی تکثیر شده دارای کوزاک ۸۸

۳-۱-۳. هضم آنزیمی وکتور pET26-hFIX به منظور کلون کردن قطعه تکثیر شده دارای توالی کوزاک در آن ۸۹

۳-۱-۴. کلون کردن توالی Kozak/hFIX در وکتورpcDNA3 و تایید آن با آنزیمهای محدود کننده ۹۱

۳-۱-۵. استخراج DNA از گلبول های سفید انسان با هدف تکثیر پروموتر AAT ۹۳

۳-۱-۵-۱. ایجاد برش آنزیمی مورد نظر در دو انتهای پروموتر تکثیر شده AAT ۹٤

۳-۱-۵-۲. کلون کردن توالی پروموتری تکثیر شده AAT در وکتور pCMV.FIX ۹۵

۳-۱-۶. استخراج DNA از گلبول های سفید رتوس نوروژیکوس با هدف تکثیر افزاینده rABE ۹۶

۳-۱-۶-۱. ایجاد برش آنزیمی مورد نظر در دو انتهای تکثیر شده افزاینده rABE ۹۷

۳-۱-۶-۲. کلون کردن توالی تکثیر شده rABE در وکتور pCMV.FIX ۹۸

۳-۱-۷. کلون کردن توالی پروموتری تکثیر شده AAT در وکتور prABE/CMV.FIX ۹۹

۳-۱-۸ . تعیین توالی پروموتر AAT وکوزاک در پلاسمید pAAT.FIX ۱۰۰

۳-۱-۹. تعیین توالی افزاینده rABE در پلاسمید prABE/CMV.FIX ۱۰۱

۳-۱-۱۰. تعیین توالی افزاینده rABE در پلاسمید prABE/AAT FIX ۱۰۳
۳-۱-۱۱. کلون کردن توالی پروموتری تکثیر شده AAT در وکتور pCMV.FIX-I ۱۰۴
۳-۱-۱۲. کلون کردن قطعه rABE/CMV در وکتور pCMV.FIX-I ۱۰۵
۳-۱-۱۳. کلون کردن قطعه rABE/AAT در وکتور pCMV.FIX-I ۱۰۶
۳-۱-۱۴. کلون کردن توالی پروموتری تکثیر شده AAT در وکتور pCMV.FIX-II ۱۰۷
۳-۱-۱۵. کلون کردن قطعه rABE/CMV در وکتور pCMV.FIX-II ۱۰۸
۳-۱-۱۶. کلون کردن قطعه rABE/AAT در وکتور pCMV.FIX-II ۱۰۹
۳-۱-۱۷. کلون کردن توالی پروموتری AAT در وکتور pCMV.FIX-I, II ۱۱۱
۳-۱-۱۸. کلون کردن قطعه rABE/CMV در وکتور pCMV.FIX-I, II ۱۱۲
۳-۱-۱۹. کلون کردن قطعه rABE/AAT در وکتور pCMV.FIX-I, II ۱۱۳
۳-۱-۲۰. تایید ساخت سازه های ژنی با استفاده از آنزیم های محدودکننده ۱۱۴
۳-۱-۲۱. خطی کردن سازه های ژنی ساخته شده جهت ترانسفکشن سلولهای HepG2 ۱۱۵
۳-۲. نتایج بخش سلولی ۱۱۶
۳-۲-۱. تعیین غلظت مناسب آنتی بیوتیک جنتیسین با روش MTT assay ۱۱۶
۳-۲-۲. بررسی بیان فاکتور۹ از سازه های ژنی ساخته شده در سلولهای HepG2 مقاوم به جنتیسین ۱۱۷
۳-۲-۲-۱. بررسی بیان فاکتور۹ از سازه های ژنی گروه A (بدون اینترون) درمحیط کشت ۱۱۹

۳-۲-۲-۲. بررسی بیان فاکتور۹ از سازه های ژنی گروه B (دارای اینترون ۱ ژن بتا گلوبین انسانی) در محیط کشت ۱۲۱

۳-۲-۲-۳. بررسی بیان فاکتور۹ از سازه های ژنی گروه C (دارای اینترون ۲ ژن بتا گلوبین انسانی) در محیط کشت ۱۲۳

۳-۲-۲-۳-۱. جداسازی تک کلون‌های مقاوم به جنتیسین در سلولهای ترانسفکت شده با سازه های ژنی گروه C و بررسی بیان فاکتور۹ در محیط کشت آنها ۱۲۵

۳-۲-۲-۴. بررسی بیان فاکتور۹ از سازه های ژنی گروه D (دارای اینترون ۱ و ۲ ژن بتا گلوبین انسانی) در محیط کشت ۱۲٦

۳-۲-۳. مقایسه بیان پروتئین فاکتور ۹ در محیط کشت بین گروه های A-D ۱۲۸

۳-۲-۴. بررسی بیان فاکتور ۹ درون سلولهای نوترکیب گروه های A-D. ۱۳۰

۳-۲-۵. بررسی فعالیت انعقادی فاکتور۹ با استفاده از آزمون APTT در گروه های A-D ۱۳٤

۳-۲-۶. ترانسفکشن موقت سلولهای Hek-293T و بررسی بیان فاکتور ۹ با استفاده از آزمون الایزا ۱۳۵

۳-۲-۷.آزمون نیمه کمی RT-PCR ۱۳۷

۳-۲-۷-۱. استخراج RNA از سلولهای ترانسفکت شده HepG2 و رونوشت برداری معکوس۱۳۷

۳-۲-۷-۲. استخراج RNA از سلولهای ترانسفکت شده Hek-293T و رونوشت برداری معکوس ۱۳۹

فصل چهارم: بحث

۴-۱. بحث ۱٤۱

۴-۲. نتیجه گیری ۱٥٤

۴-۳. پیشنهادات ۱٥٤

منابع و ماخذ ۱٥٦

پیوست ۱۷۱

چکیده به زبان انگلیسی

فصل اول

مقدمه

۱-۱. بیماری هموفیلی B یا کریسمس

۱-۱-۱. تاریخچه بیماری هموفیلی

بیماری هموفیلی از قدیمی ترین بیماری های خونریزی دهنده ارثی می باشد که در تاریخ ثبت شده است. در قرن دوم میلادی در کتاب مذهبی یهودیان (تلمود) آورده شده است که اگر دو فرزند پسر در یک خانواده بر اثر خونریزی که در هنگام ختنه کردن ایجاد شده است، فوت نمودند از ختنه کردن پسرهای بعدی آن خانواده باید جلوگیری گردد. تحقیقات در مورد این بیماری که یک بیماری سلطنتی نیز نامیده می شود از قرن هجدهم آغاز گردید. ملکه ویکتوریا دارای یک فرزند پسر بنام لئوپولد (مبتلا به هموفیلی) و دو دختر بنام های آلیس و بئاتریس (ناقل بیماری هموفیلی) بود. بئاتریس با فردی از خانواده سلطنتی اسپانیا ازدواج نمود و بیماری را به آن خانواده منتقل کرد. یکی از دختران آلیس که آلکساندرا نام داشت با فردی از خانواده سلطنتی روسیه ازدواج نمود و بیماری را به آن خانواده منتقل نمود (Mannucci *et al,* 200).

۱-۱-۲. علائم بیماری هموفیلی

فقدان و یا نقص در عملکرد پروتئین فاکتور۹ منجر به بیماری ژنتیکی هموفیلی B می‌گردد. این بیماری بصورت مغلوب وابسته به جنس به ارث می رسد و فراوانی آن در جمعیت مردان ۱/۳۰۰۰۰ می‌باشد (Mannucci *et al,* 200).

زندگی این بیماران در اثرخونریزی‌های مکرر دائماً تهدید می‌شود. متوسط سن تشخیص هموفیلی در موارد شدید حدود ۹ ماهگی و در موارد متوسط حدود ۲۲ ماهگی است. شایعترین علایم در آغاز بیماری، خونریزی از بافت های نرم، خونریزی از محل تزریق، زخم یا جراحی و خونریزی از حفره

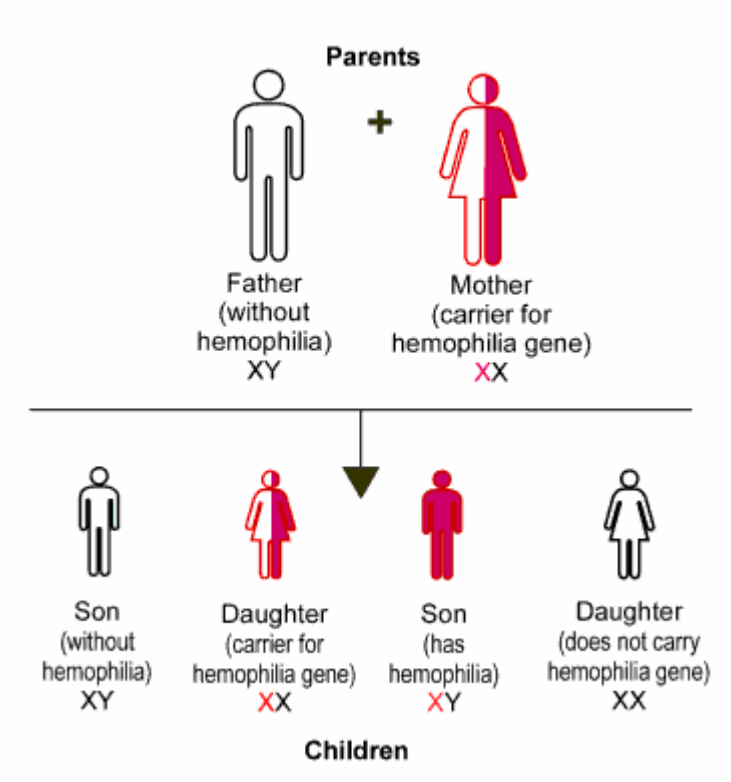
دهانی می باشد. خونریزی درون ماهیچه ها و مفاصل که از ویژگی های دیگر این بیماری است، الزاماً در ابتدا دیده نمی شود. اختصاصی ترین نشانه بیماری هموفیلی، خونریزی های مفصلی است که معمولاً هنگامی که کودک راه رفتن را می آموزد بروز می کند. بروز خونریزی های داخل مفصلی[1] بطور مکرر در این بیماران به تدریج موجب تغییر شکل مفصل می گردد. اگرچه درد شدید در مفصل گرفتار بطور موقت روی می دهد، اما صدمه ای که به مفصل وارد می شود دائمی بوده و به آن اصطلاحا آرتروپاتی هموفیلی گفته می شود. از لحاظ بالینی تغییر شکل مفصل باعث محدودیت در حرکت بیمار می گردد. شایان ذکر است که شایعترین علت مرگ در بیماران هموفیلی، خونریزی های مغزی است. حتی ضربه های خفیف نیز می توانند خونریزی های مغزی شدیدی را ایجاد کنند (Carmen *et al,* 2000).

۱-۱-۳. ارتباط فامیلی در بیماری هموفیلی B:

در بیماری هموفیلی معمولا یک سابقه بیماری در فامیل وجود دارد. هموفیلی B یا کریسمس یک بیماری ارثی خونریزی دهنده وابسته به کروموزوم X است که بندرت در زنان مشاهده می گردد. زیرا احتمال بسیار کمی وجود دارد که هر دو کروموزوم X یک زن دارای ژن بیماری هموفیلی باشند. لذا زنان ناقل بیماری محسوب می شوند. چنانچه مادری دارای یک کروموزوم X واجد جهش در ژن فاکتور ۹ باشد، ناقل بیماری هموفیلی محسوب می گردد و ۵۰ درصد احتمال دارد که فرزندان پسر این مادر ژن ناقص را به ارث برده و به بیماری مبتلا گردند. همچنین ۵۰ درصد احتمال دارد که

[1] Hemarthrosis

فرزندان دختر این مادر ژن معیوب را به ارث برده و ناقل این بیماری شوند و آن را به فرزندان خـود منتقل کنند(تصویر۱-۱) (Chan *et al,* 1998 Orstavik *et al,* 1999).



تصویر۱-۱. نحوه توارث در بیماري هموفيلي B را نشان مي دهد.

۱-۱-٤. طبقه بندی بیماران هموفیلیB

بیماران هموفیلی B را در چهار گروه طبقه بنـدی مـی کننـد(Tuddenham and Cooper, 1994) کـه عبارتند از:

گروهCRM^{+}[2] : میزان آنتی ژن فاکتور ۹ در خون این بیماران در حد طبیعی بوده اما فعالیت بیولوژیکی آن کاهش یافته است.

[2] Cross reactive material

گروه CRM^{r}: میزان آنتی ژن فاکتور ۹ در خون این بیماران کاهش یافته که نتیجهٔ آن کاهش فعالیت بیولوژیکی فاکتور ۹ و تاخیر در انعقاد خون است.

گروه CRM^{-}: افراد مبتلا معمولاً فاقد فاکتور ۹ در خون هستند و یا میزان بسیار اندکی از آن را دارا می باشند.

گروه چهارم: شامل بیمارانی می شوند که پس از تزریق فاکتور ۹، آنتی بادی های مهارکننده[3] در خون آنها ایجاد می گردد که از عملکرد آن جلوگیری می کند. بر طبق مطالعات انجام شده ٤- ۱٪ بیماران هموفیلی B از این مسئله رنج می برند (Giangrande 2003؛ Mingdong *et al,* 2004).

۱-۱-۵. روش های درمانی بیماران هموفیلی B:

پس از تشخیص نوع هموفیلی، درمان با هدف از بین بردن علایم و مشکلات بیماری آغاز می گردد. در طول ۳ دهه گذشته، پلاسمای تازه منجمد شده[4] و کنسانتره های فاکتور ۹ جهت درمان و جلوگیری از عود خونریزیهای مکرر در این بیماران مورد استفاده قرار گرفته است و هنوز در بسیاری از کشورهای جهان، از این فرآورده ها جهت جلوگیری از عود خونریزی در این بیماران استفاده می‌گردد. این روش درمانی شامل تزریق های دوره ای و منظم فاکتور ۹ مشتق شده از پلاسمای افراد نرمال و یا استفاده از فاکتور ۹ نوترکیب می باشد. در این روش که به آن اصطلاحاً پروفیلاکسی گفته می شود برای برقراری هموستاز، غلظت فاکتور ۹ را باید ۳۰-۱۵ ٪ طبیعی افزایش داد(Joost and Koen, 2000). اگرچه استفاده از فرآورده‌های مشتق از پلاسما کارایی بالایی را نشان می‌دهند، ولی احتمال انتقال عوامل بیماری زا از قبیل ویروس های هپاتیت A، B و C، ویروس ایدز

[3] Inhibitor antibodies

[4] Fresh frozen plasma

و ویروس B19 علی‌رغم وجود روش‌های غربالگری همواره وجود دارند (Roth *et al.,* 2001). علاوه بر این، باید انتقال بالقوه عوامل عفونی نوظهور از قبیل vCJD [5] و انسفالوپاتی اسفنجی شکل گاوی [6] را نیز باید در نظر داشت (Ludlam,1997).

با پیشرفت بیوتکنولوژی، استفاده از فاکتور ۹ نوترکیب به عنوان جایگزین مناسب و سالم فاکتور ۹ پلاسمایی مطرح گردید و دو گروه تحقیقاتی در آکسفورد و سیاتل آمریکا با موفقیت ژن آن را در سلول‌های پستانداران کلون و بیان نمودند(Kurachi *et al.,* 1982 Kaufman *et al.,* 1986). در حال حاضر تنها یک فرآورده نوترکیب فاکتور ۹ که به صورت تجاری با نام(Bene FIX ™) در سلول های CHO [9] بیان می شود در دسترس می‌باشد که توسط انستیتو ژنتیک Wyeth تولید گردیده است. از این دارو در درمان بیماران هموفیل فاقد آنتی بادی های مهارکننده استفاده می گردد. در بیماران واجد آنتی بادی های مهارکننده از پروتئین فعال شده نوترکیب فاکتور۷ (rVIIa) استفاده می گردد که کاملاً خاصیت درمانی موثری دارد (Abshire and Kenet,2004).

روش های درمانی فوق پرهزینه بوده و خطر ابتلا به بیماری‌های عفونی را افزایش می دهند. لذا برنامه ریزی در جهت درمان قطعی این بیماری با روش های ژن درمانی و سلول درمانی در دستور کار آزمایشگاه های تحقیقاتی در سراسر دنیا قرار گرفته است.

۱-۲. مکانیسم های انعقاد طبیعی:

سیستم انعقادی مسئول تامین گردش و حرکت طبیعی خون در داخل سیستم بسته عروقی بوده و در صورت آسیب عروقی از خونریزی جلوگیری می کند. توقف خونریزی به تشکیل تجمع اولیه

[5] variant Creutzfeldt-jakob disease
[6] Bovine spongiform encephalopathy
[9] Chinese hamster ovary

پلاکتی و ایجاد لخته فیبرینی پایدار بستگی دارد. تشکیل این لختـه وابـسته بـه فاکتورهـای پروتئینـی انعقادی است که در غلظت های مختلف در یک مسیر آبشاری در خون عمل مـی کننـد. حـداقل ۱۳ پروتئین با نظمی پیچیده در این فرآیند شرکت می کنند. کمبود و یا نقص در هر یک از این فاکتورهـا می تواند منجر به عدم توقف خونریزی گردد. آبشار انعقادی از دو مسیر داخلی و یا خارجی فعال می شود. این دو مسیر عملا به هم مرتبط بوده و به مسیر سومی به نام مسیر مشترک و تشکیل رشته های فیبرین منتهی می گردند. هر دو مسیر هنگامی فعال می شوند که فاکتورهای موثر در آنهـا بـا سـطوح زیر آندوتلیال برخورد کنند (Lenting *et al*,1998).

۱-۲-۱. مسیر داخلی انعقاد

در مسیر داخلی ابتدا فاکتور XII (فاکتور هاگمن)[8] به جدارعروق آسیب دیـده (رشـته هـای کـلاژن) برخورد کرده و فعال می شود. فاکتور XII فعال (XIIa) چندین واکنش انجام می دهد. اولین واکـنش آن اثر بر روی پری کالیکرئین[9] در مجاورت HMWK[10] است که طی آن پـری کـالیکرئین تبـدیل بـه حالت فعال موسوم به کالیکرئین می شود. کالیکرئین نیز در مجاورت HMWK بـر روی فـاکتور XII اثر گذاشته مقدار بیشتری از این فاکتور را فعال می کند. فاکتور XIIa می تواند بر روی فاکتور XI اثر گذاشته و آن را فعال کند. فاکتور XI فعال(XIa) در مجاورت یون کلسیم فاکتور IX را فعال می کند. فاکتورIX فعال شده (IXa) آنزیمی است که احتیاج به فاکتور VIII فعال(VIIIa) به عنـوان کوفـاکتور دارد. ترومبین آزاد شده از گرانولهای α پلاکتها فاکتور VIII را فعال مـی کنـد. پـس از فعـال شـدن، فاکتور VIII قادر است به عنوان کوفاکتور در کنار فاکتور IXa عمل کند. مجموعه فـاکتور IX و VIII

[8] Hageman factor
[9] Prekallikrein
[10] High Molecular Weight Kininogen