بسم الله الرحمن الرحيم

١١٨٢١٠

دانشگاه رازی
دانشکده علوم

گروه زیست شناسی

پایان نامه جهت اخذ درجه کارشناسی ارشد رشته ی

زیست شناسی سلولی و ملکولی

کلونینگ ژن اینترفرون گامای انسانی درون انگل لیشمانیای غیر بیماریزا جهت بررسی میزان بیان این سیتوکین در سلول یوکاریوتی

استادان راهنما:

دکتر محمد حسین میر مومنی

دکتر نوشین داودی

استادان مشاور :

دکتر فریدون مهبودی

دکتر علیرضا معین رضا خانلو

۱۳۸۸/۷/۶

مرکز اطلاعات و مدارک علمی ایران
شعبه مدارک

نگارش:

اعظم همتی

بهمن ماه ۱۳۸۴

۱۱۸۲۱۰

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات، ابتکارات و
نوآوری هـای ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه
متعلق به دانشگاه رازی است.

دانشگاه رازی

کلونینگ ژن ۴ اینترفرون گامای انسانی درون انگل لیشمانیای غیر بیماریزا جهت بررسی میزان بیان این سیتوکین در سلول یوکاریوتی

پایانامه جهت دریافت درجه کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی

توسط:

اعظم همتی

تصویب وارزشیابی شده توسط کمیته پایان نامه با درجه.....

خانم دکتر نوشین داودی (استاد راهنما).....استادیار

آقای دکتر محمد حسین میر مومنی (استاد راهنما) ..... استاد یار

آقای دکتر رضا حق پرست (استاد مدعو) ..... استاد یار

آقای دکتر علی بید مشکی پور (ممتحن داخلی) ..... استاد یار

دانشکده علوم – دانشگاه رازی کرمانشاه – ایران

بهمن ماه ۱۳۸۴

سپاسگذاری از:

اساتید ارجمند؛ جناب آقای دکتر محمدحسین میر مومنی وسرکار خانم دکتر نوشین داوودی که راهنمایی این پایان نامه را تقبل کرده اند و در تمامی مراحل نظارت کامل داشتند.

اساتید مشاور گرامی؛ دکتر علیرضا معین رضا خانلو و دکتر فریدون مهبودی که در انجام این پایان نامه مرا یاری کردند.

همچنین از استاد بزرگوارجناب دکتر علی میدمشکی پور ریاست محترم بخش زیست شناسی دانشگاه رازی کرمانشاه و از کلیه اساتید وکارکنان آموزش و تحصیلات تکمیلی دانشگاه رازی کرمانشاه و دانشجویان بخش بیوتکنولوژی انستیتو پاستورایران.

تقدیم به:

پدرو مادر عزیزم که با حمایتهای خود سختیهای زندگی را برایم هموارکرده ا ند. همسرم که همیشه مشوق وهمدل من بوده است ودر طی این مدت مشکلات مرا نه تنها تحمل نمود بلکه در حل آنها مرا یاری کرد.

و تمام معلمان واساتید گرامی ازشروع آغاز تحصیل تا امروز که هدایتگر من بوده اند

وتقدیم ویژه به تمامی انسانهای آزاده دنیا که در جهت آسایش ملتها تلاش می نمایند.

چکیده

با توجه به نیاز روز افزون در زمینهٔ تولید پروتئینهای نوترکیب برای مقاصد درمانی و تشخیصی لازم است که از روشهای مقرون به صرفه ای که بازده تولید بیشتری دارند استفاده گردد. سیستمهای متنوعی جهت بیان پروتئین نوترکیب در حال حاضر وجود دارد که علی رغم تنوع آنها هیچیک از آنها بطور گسترده مورد استفاده قرار نمی گیرد.

از آنجایی که پروتئین اینترفرون گاما، نیز دارای کاربردهای پزشکی زیادی از جمله درمان بیماریهای نقص ایمنی مادرزادی و همچنین مبارزه با عفونتهای درون سلولی مانند لیشمانیا میباشد، تولید بیوتکنولوژیک آن از اهمیت خاصی برخوردار است. از آنجایی که یکی از روشهای جدید در تولید پروتئین های نوترکیب استفاده از ارگانیسمهای یوکاریوتی میباشد، در این مطالعه انگل لیشمانیا تارنتولو یی *(Leishmania tarentolae)* که از مارمولک بدست آمده وغیر بیماریزا می باشد و همچنین توانایی تغییرات پس از ترجمه پروتئین را دارد، به عنوان سیستمی برای تولید پروتئین اینترفرون گامای نوترکیب استفاده شده است. در این تحقیق cDNA ژن اینترفرون گاما وارد جایگاه ژن ۱۸s rRNA ژنوم لیشمانیا گردید و تایید محل قرار گرفتن ژن اینترفرون توسط روش PCR انجام شد. همچنین بیان پروتئین اینترفرون گاما در سلولهای لیشمانیا توسط روشهای SDS PAGE و وسترن بلاتینگ مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج این آزمایشها، بیان پروتئین اینترفرون گاما در این ارگانیسم یوکاریوتی را تایید کرد.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول : مقدمه

۱-۱- کلیات ۲

۱-۱-۱- اینترفرون آلفا (لکوسیتی)..... ۲

۱-۱-۲- اینترفرون بتا (فیبروبلاستی)..... ۳

۱-۱-۳- اینترفرون امگا (IFN-ω)..... ۳

۱-۱-۴- اینترفرون گاما (IFN-γ)..... ۳

۱-۲-کلونینگ و بیان ژن اینترفرون گاما ۸

۱-۲-۱- ژن اینترفرون گاما..... ۸

۱-۲-۲- بیان در *E. coli*..... ۸

۱-۳- خصوصیات بیولوژی سلولی لیشمانیا..... ۱۰

۱-۴- ساختار ژنومی لیشمانیا(Genomic Organization)..... ۱۱

۱-۵- بیان ژن در لیشمانیا..... ۱۱

۱-۶- دستکاری ژنتیکی کینتوپلاستیدا..... ۱۵

۱-۶-۱- انتقال ژن به صورت ناپایدار (Transient transfection)..... ۱۵

۱-۶-۲- انتقال ژن به صورت پایدار (Permanent transfection)..... ۱۷

۱-۶-۳- ترانسفورماسیون دائمی ناشی از ادغام ژنتیکی..... ۱۹

فصل دوم : مواد و روشها

۲-۱- سلولها..... ۲۲

۲-۲- محیطهای کشت..... ۲۲

۲-۳- آنتی بیوتیکها..... ۲۳

۲-۴- آنزیمها..... ۲۳

۲-۵- مواد لازم برای ژل الکتروفورز قطعات مولکولهای DNA..... ۲۳

۲-۶- ناقلین (vectors)..... ۲۵

۲-۷- مواد لازم جهت استخراج پلاسمید از سلول *E-coli*..... ۲۵

۲-۸- ترکیبات PCR mix..... ۲۵

۲-۹- برای انجام PCR از دستگاه Thermocycler..... ۲۶

۲-۱۰- جهت تکثیر قطعات بزرگ DNA از کیت..... ۲۶

۲-۱۱- اندازه گیری مقدار DNA..... ۲۶

۲-۱۲- وسایل و مواد لازم جهت الکتروپوریشن لیشمانیا..... ۲۷

۲-۱۳- ترکیب بافر لیزکننده جهت استخراج DNA از انگل لیشمانیا..... ۲۷

۲-۱۴ – مواد لازم جهت تهیه محلول براد فورد..... ۲۸
۲-۱۵ – مواد مورد نیاز جهت انجام تست ELISA..... ۲۸
۲-۱۶ – بافرهای مورد نیاز جهت انجام Western blotting..... ۲۹
۲-۱۷ – سمپلرها، تیپ‌ها، تیوب‌ها و وسایل پلاستیکی..... ۳۴
۲-۱۸ – کلون نمودن cDNA ژن اینترفرون گاما دروکتوربیانی لیشمانیا pF4X1.4sat..... ۳۵
۲-۱۸-۱- تکثیر پلاسمید pET-32a حاوی ژن IFN-γ و
خالص سازی cDNA اینترفرون گامای انسان..... ۳۵
۲-۱۸-۲-کلون نمودن cDNA اینترفرون گاما درسایت آنزیمی *Bgl II*
در وکتور بیانی لیشمانیا pF4X1.4sat بدون stuffer..... ۴۶
۲-۱۹— کلون نمودن cDNA ژن اینترفرون گاما دروکتوربیانی لیشمانیا pF4X1.4hyg..... ۵۱
۲-۲۰— آماده سازی وکتور بیانی pF4X1.4sat حاوی ژن اینترفرون گاما
به منظور ترانسفورماسیون به داخل سلولهای لیشمانیا *tarentolae*..... ۵۱
۲-۲۱— ترانسفورماسیون سویه میزبان لیشمانیا *tarentolae* از طریق الکتروپوریشن..... ۵۲
۲-۲۱-۱- روش انجام الکتروپوریشن..... ۵۲
۲-۲۱-۲- انتخاب سویه‌های ترانسژنیک..... ۵۳
۲-۲۱-۳- تهیه پلیت نیمه جامد جهت کشت سلولهای ترانسفورم شده ۵۴
۲-۲۲— روش استخراج DNA از انگل لیشمانیا..... ۵۵
۲-۲۳— تأیید ورود قطعهٔ insert حاوی ژن اینترفرون گاما در مکان ژنی مورد نظر
در ژنوم لیشمالیا *tarentolae* ترانسژنیک با استفاده از PCR..... ۵۶
۲-۲۴— انتقال وکتوربیانی pF4X1.4hyg حاوی ژن اینترفرون گاما به داخل
سلولهای لیشمانیا *tarentolae* از طریق الکتروپوریشن ۵۹
۲-۲۵— بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما ۶۰
۲-۲۵-۱- روش استخراج پروتئین از لیشمانیا..... ۶۱
۲-۲۵-۲- تعیین غلظت پروتئین با روش برادفورد..... ۶۱
۲-۲۵-۳- تعیین غلظت پروتئینها..... ۶۲
۲-۲۵-۴- تست ELISA..... ۶۲
۲-۲۵-۵- بررسی بیان پروتئین با روش SDS-PAGE..... ۶۴
۲-۲۶— وسترن بلاتینگ(Western blotting)..... ۶۵

فصل سوم : نتایج و بحث

۳-۱- صراحل ساخته شدن پلاسمیدهای نهایی (construct)..... ۶۸
۳-۱-۱- تکثیر پلاسمید pET-32a حاوی cDNA ژن اینترفرون گاما..... ۶۸
۳-۱-۲- کلون نمودن cDNA ژن اینترفرون گاما در وکتور pF4X1.4sat ۷۰
۳-۱-۳- کلون نمودن cDNA ژن اینترفرون گاما در وکتور pF4X1.4hyg..... ۷۴
۳-۲- آماده سازی وکتورهای بیانی pF4X1.4sat-IFN و pF4X1.4hyg-IFN ۷۷
۳-۳- انتخاب سویه های مقاوم به آنتی بیوتیک نورزئوترایسین..... ۷۹
۳-۳-۱- تائید نوترکیبی همولوگ در کلونهای (Ns^R) با استفاده از PCR..... ۷۹

۳-۳-۲- بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما در سلولهای ترانسژنیک (Ns^R)..... ۸۲
۳-۴- انتقال قطعه حاصل از برش آنزیمی پلاسمید pF4X1.4hyg-IFN ، به داخل
سلول های لیشمانیا *tarentolae*..... ۸۳
۳-۴-۱- انجام PCR جهت تایید قرار گرفتن ژن اینترفرون گاما
و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک هیگرومایسین ۸۴
۳-۴-۲- انجام PCR جهت تایید قرار داشتن ژن اینترفرون گاما
و ژن مقاومت به آنتی بیوتیک نورزئو ترایسین در مکان مورد نظر..... ۸۵
۳-۴-۳- تایید ورود ژن اینترفرون گاما به داخل ژنوم لیشمانیا به کمک PCR..... ۸۶
۳-۵- بررسی بیان پروتئین اینترفرون گاما در سلولهای (NS^R / hyg^R)..... ۸۷
۳-۶- Western blot جهت نشان دادن وجود پروتئین اینترفرون گاما
در سلولهای (D)transfected در مقایسه با سلولهای untransfected (wild)..... ۸۸
۳-۷- بحث کلی..... ۹۰
منابع و ماخذ..... ۹۲

فهرست شکلها

عنوان — صفحه

۱-۱ - ساختمان پروتئین اینترفرون گاما ۵
۱-۲ - ساختمان گیرنده اینترفرون گاما ۵
۱-۳ - انتقال پیام از طریق اتصال اینترفرون گاما به گیرنده خود ۶
۱-۴ - تصویر شماتیک از روند *trans*- splicing در mRNA لیشمانیا ۱۲
۱-۵ - نمونه‌هایی از وکتورهای مورد استفاده در ترانسفکشن سلولهای لیشمانیا ۱۶
۳-۱ - تصویر شماتیک از پلاسمید (pET-32a-IFN) ۶۸
۳-۲ - تایید نهایی پلاسمید pET-32a-IFN ازطریق برش آنزیمی
توسط آنزیم *BamHI* و به کمک PCR ۶۹
۳-۳ تصویر شماتیک از تهیه وکتور pF4X1.4sat فاقد stuffer ۷۰
۳-۴ کنترل آنزیمی پلاسمید pF4X1.4sat فاقد stuffer ۷۱
۳-۵ تصویر شماتیک از پلاسمید pF4X1.4sat-IFN ۷۲
۳-۶ تایید پلاسمید pF4X1.4sat-IFN ۷۳
۳-۷ تصویر شماتیک از تهیه وکتور pF4X1.4hyg فاقد stuffer ۷۴
۳-۸ بررسی اثرات آنزیمهابر روی پلاسمید pF4X1.4hyg فاقد stuffer ۷۵
۳-۹ تصویر شماتیک از پلاسمید pF4X1.4hyg –IFN ۷۶
۳-۱۰ کنترل آنزیمی پلاسمید pF4X1.4-hyg –IFN ۷۶
۳-۱۱ تصویر از پلاسمید pF4X1.4sat-IFN همراه با سایتهای آنزیمی *SwaI* ۷۸
۳-۱۲ جداسازی و خالص سازی قطعهٔinsert ۷۸
۳-۱۳ تصویر شماتیک از homologous recombination ۷۹
۳-۱۴ نتیجه PCR توسط پرایمرهای F3002 و F2999 ..... ۸۰
۳-۱۵ نتیجه PCR توسط پرایمرهای مخصوص ژن اینترفرون گاما ۸۱
۳-۱۶ SDS-PAGE جهت نشان دادن وجود پروتئین IFN در سلول انگل ۸۲
۳-۱۷ تصویر شماتیک از نوترکیبی همولوگ قطعه insert حاصل
از برش آنزیمی وکتور بیانی pF4X1.4hyg-IFN ۸۳
۳-۱۸ نتیجه حاصل از PCR توسط پرایمرهای F-hyg و F3002 ..... ۸۴
۳-۱۹ نتیجه حاصل از PCR بر روی DNA کلونهای A , D توسط
پرایمرهای F3002 و F2999 ..... ۸۵
۳-۲۰ نتیجه حاصل از PCR توسط پرایمر های F-IFN و R-IFN
بر روی DNA ژنومیک کلون های A و D ۸۶
۳-۲۱ آنالیز SDS-PAGE مربوط به کلونهای سلولی D و wild ۸۷
۳-۲۲ آزمایش western blot جهت نشان دادن وجود پروتئین اینترفرون ۸۸

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

۱-۱- مارکرهای مورد استفاده در انتخاب اشکال ترانسفورم تریپانوزوم و لیشمانیا.....۱۸

مخفف ها

APS	Ammonium per sulfate
BHI	Brain Heart infusion
bp	Base pairs
BSA	Bovine Serum Albumin
diH_2O	De-ionized water
dNTPs	2' - Deoxy nucleoside-5' triphosphates
EDTA	Ethylene diamine tetraacetic acid
EtBr	Ethidium bromide
HEB	Hepes Electroporation Buffer
hyg	Hygromycin phosphotransferase
Hyg^R	Hygromycin Resistant
IFN	Interferon gamma
Kb	Kilobase pairs
kD	Kilodaltons
LB	Luria- Bertani
Ns^R	Nourseothricin Resistant
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
rpm	Round per minute
sat	Streptothricin acetyltransferase
SDS	Sodium dodecyl sulphate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate poly acryl amid gel electrophoresis
Sol	Solution
ssu	Small subunit
Taq.	Taq. DNA polymerase
TBE buffer	Tris-Boric acid-EDTA buffer
Tm	Melting temperature
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl ethylene diamine
Tris	Tris(hydroxymethyl) amino methane
UV	Ultra violet

فصل اول

مقدمه

۱-۱- کلیات

اینترفرونها[1] اولین بار در سال ۱۹۵۷ توسط Issacs و Lindemann گزارش شدند. این دانشمندان دریافتند که چنانچه سلولها در معرض حمله ویروسها قرار گیرند از خود موادی ترشح می‌کنند که در حمله ویروس به سایر سلولها تداخل (Interference) ایجاد نموده و در نتیجه سلولهای پیرامونی را محافظت می‌نمایند [Issacs and Lindemann., 1957].

پژوهشهای بعدی نشان داد که این پروتئینها به چند گروه تقسیم می‌شوند و بر اساس نوع سلول ترشحی، رفتار بیولوژیکی، فعالیت و همچنین خصوصیات ژنی خود به چهار نوع تقسیم می‌شوند که عبارتند از اینترفرون آلفا، بتا، گاما و امگا. به اینترفرونهای آلفا، بتا و امگا تیپ I و به اینترفرون گاما تیپ II یا ایمیون اینترفرون (Immune interferon) می گویند. [Colonna et al., 2002]

۱-۱-۱- اینترفرون آلفا (لکوسیتی)

پروتئینی با ۱۷۲ — ۱۶۵ اسیدآمینه و وزن مولکولی بین ۲۱ — ۱۵ کیلودالتون میباشد که در شرایط اسیدی (pH = 2) پایدار است. دارای تنوع زیادی است در حدود ۱۴ نوع پروتئین اینترفرون آلفای فعال، شناسایی شده است. این پروتئین از سلولهای لکوسیتی، تولید می‌گردد [Rubinstein et al., 1981] و روی اغلب سلولها اثر ضد تکثیری دارد. همچنین اینترفرون آلفا باعث فعالیت ماکروفاژها به صورت افزایش گیرنده FC[2] آنتی بادیها، افزایش مولکولهای MHCI[3] و افزایش عمل بیان آنتی ژن توسط ماکروفاژها می‌گردد [Taniguchi and Takaoka. 2002]. حداقل ۱۸ ژن مجزا (با ۴ ژن کاذب) برای این پروتئین شناخته شده که همگی روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ تجمع یافته‌اند. این ژنها بدون اینترون بوده و انتهای '3 آنها متغیر است[Revel, 1986 , Weissmann and Weber, 1986].

---

[1] - Interferons (IFN)

[2] - گیرنده هایی که به ناحیه FC (fragment crystallization) آنتی بادی های متصل میشوند.

[3] - Major Histocompatibility Complex

۱-۱-۲ - اینترفرون بتا (فیبروبلاستی)

گلیکوپروتئینی با وزن مولکولی ۲۰ کیلو دالتون می‌باشد که دارای ۲۰٪ کربوهیدرات بوده و دارای ۱۶۶ اسیدآمینه است. همچنین از نظر توالی ۳۴ درصد، به توالی اینترفرون گاما شباهت دارد. دارای دو باند سیستئین بین اسیدآمینه‌های شماره ۱ و ۹۸ و همچنین ۲۹ و ۱۳۸ می باشد. وجود باند بین اسیدآمینه های ۲۹ و ۱۳۸ جهت فعالیت بیولوژیکی آن ضروری است. این پروتئین اغلب از سلولهای فیبروبلاستی و گاهی از سایر سلولها ترشح می‌گردد. دارای یک ژن است و از جمله فعالیتهای آن قدرت ضد ویروسی آن می‌باشد[Pestka. ۱۹۸۳ , Frideman. ۱۹۸۸].

۱-۱-۳ - اینترفرون امگا (IFN-ω)

دارای یک ژن روی بازوی کوتاه کروموزوم شماره ۹ بوده و ژن آن همانند آلفا و بتا بدون اینترون است. همچنین دارای ۱۷۲ اسید آمینه می‌باشد. میزان همولوژی این اینترفرون با اینترفرون آلفا حدود ۶۰ درصد و با اینترفرون بتا در حدود ۳۰ درصد است [Diaz et al., ۱۹۹۴].

همچنین دو نوع دیگر اینترفرون به نامهای دلتا (IFN-δ) و تتا (IFN-ζ) در حیوانات شناسایی شده است که خصوصیات آنها شبیه به اینترفرون تیپ یک است. IFN-δ در خوک شناسایی شده است [Leferre , and Boulay., ۱۹۹۳] و IFN-ζ در گوسفند وجود دارد که برای ایجاد شرایط مناسب جهت لانه گزینی سلول تخم مورد نیاز است.

۱-۱-٤ - اینترفرون گاما (IFN-γ)

گلیکو پروتئینی است که در سال ۱۹۶۵ توسط [Wheelackef. ۱۹۶۵] کشف شد. در سال ۱۹۸۲ به صورت شیمیایی خالص گردید [Yip YK et al., ۱۹۸۲] و در همان سال پروتئین نوترکیب آن در باکتری تولید شد [Gray P.W et al., ۱۹۸۲].

اینترفرون گاما توسط لنفوسیتهای T فعال یا نشانه CD۴ و CD۸ ، سلولهای دلتا[۱] δ ، سلولهای NK[۲] و سلولهای ارائه دهنده آنتی ژن همانند ماکروفاژها و ... تولید می‌گردد [Fruncht et al., ۲۰۰۱]. اینترفرون گاما

---

[۱] -Cells of Pancreas
[۲] -Natural killer Cells

گلیکو پروتئینی است که در محیط‌های آبی با غلظت پایین نمک و pH خنثی به صورت دایمر می‌باشد ولی در عدم حضور نمک در pH = ۳,۵ منومر می‌باشد. همچنین این پروتئین در pH = ۳,۵ دارای بار مثبت است چرا که دارای تعداد زیادی گروههای بازی در ترکیب اسیدآمینه‌ای خود می‌باشد [Arakawa and Hsu., ۱۹۸۷]. اینترفرون گاما انسانی یک گلیکوپروتئین همودایمر ترشحی است. هر منومر این پروتئین از ۱۴۳ اسیدآمینه تشکیل شده و دارای دو محل برای N-linked glycosylation در موقعیت‌های اسیدآمینه آسپارژین ۲۵ وآسپارژین ۹۷ می‌باشد. فرم فعال این اینترفرون به شکل دایمر است [Sareneva.et al. ۱۹۹۴].

گزارش Sareneva و همکاران در سال ۱۹۹۴، نشان داد که N-glycosylation به خصوص در موقعیت آسپارژین ۲۵ باعث افزایش تولید فرم دایمر این پروتئین شده و تا حدودی فعالیت بیولوژیکی اینترفرون گاما را افزایش میدهد. اما تولید این پروتئین در باکتری با فعالیت بیولوژیکی مناسب، نشان دهندهٔ این واقعیت است که تغییرات بعد از ترجمه در این پروتئین تأثیر زیادی در دایمر شدن و فعالیت بیولوژیکی آن ندارد [Lee et al., ۱۹۸۸].

از نظر شکل فضایی پروتئین اینترفرون گاما فشرده، به شکل ۷ و دایمر بوده که در هر منومر آن ۶ ساختمان α-helix وجود دارد. آلفا هلیکسهای A-E در انتهای N قرار دارند و F در ناحیه انتهای C هر منومر قرار دارد. اتصال به گیرنده بر روی سلولهای گوناگون، از طریق ناحیه ای شامل یک حلقه بین هلیکس‌های A و B است و با مشارکت قسمتهایی از هلیکس F صورت میگیرد . وجود هیستیدین شماره ۱۱۱ در هلیکس F و همچنین اسیدآمینه‌های شماره ۱۷ تا ۲۷ در حلقه AB جهت اتصال به گیرنده بسیار ضروری هستند. (شکل ۱-۱) [Waschutza. et al., ۱۹۹۸].

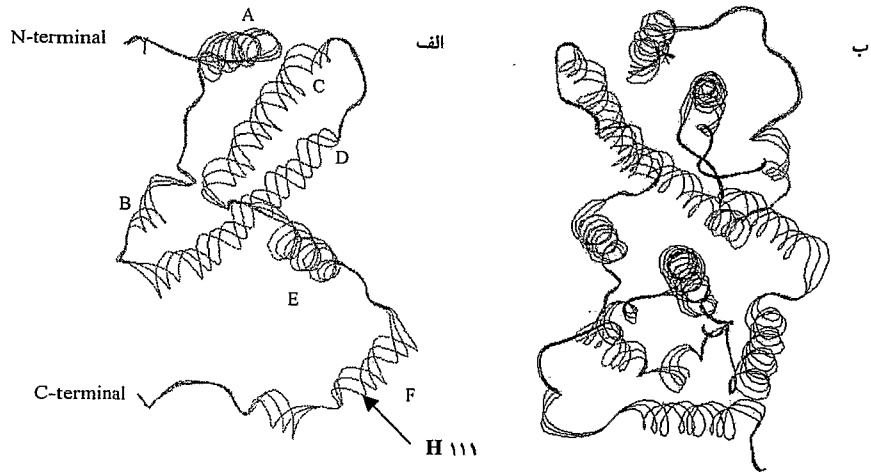
در مقالات گوناگون و همچنین پژوهشهای مختلف وزن مولکولی اینترفرون گاما بسیار متغیر ذکر شده است به طوریکه وزن مولکولی این پروتئین بین ۵۰-۱۵ kD گزارش گردیده است. این اختلاف وزن پروتئین ناشی از عواملی از جمله موارد زیر میباشد: [Devos et al., ۱۹۸۴; Kung et al., ۱۹۸۶; Slodowski et al., ۱۹۹۱; Lauren ۱۹۹۳].

۱- منومر یا دایمر بودن

۲- glycosylation به صورت کامل یا ناقص

۳- حذف شدن چند اسیدآمینه از انتهای C مولکول

۴- سیستمی که پروتئین در آن تولید شده است.

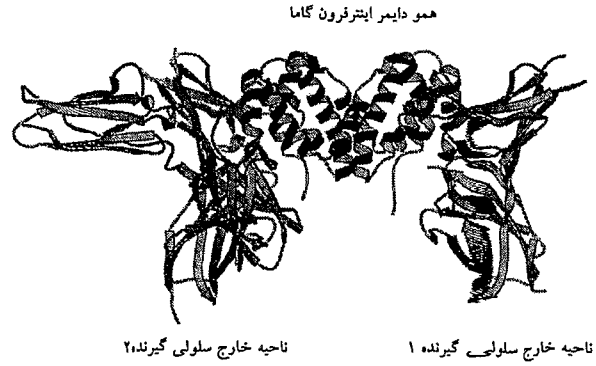


شکل ۱ -۹ : الف) ساختمان پروتئین مونومر اینترفرون گاما ، هلیکس های A-F و هیستیدین ۱۱۱ نشان داده شده

ب)همودایمر اینترفرون گاما

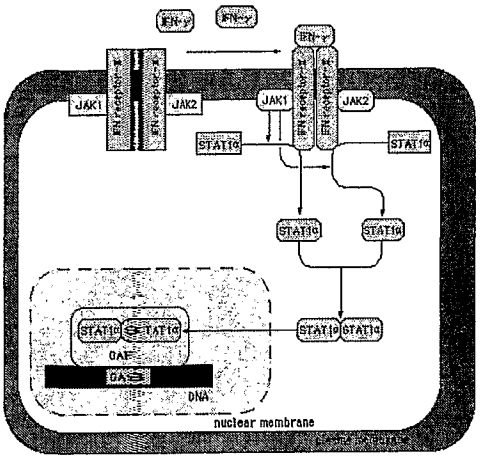
گیرندهٔ اینترفرون گاما روی اغلب سلولهای هسته‌دار وجود دارد هر چند پراکندگی آن کاملاً متفاوت است به طوریکه بین ۰ ۲۵۰۰ – ۲۰۰ عدد از این مولکولها روی سلولهای گوناگون وجود دارد. بیشترین میزان بیان گیرنده روی سلولهای رده لنفوئیدی است. گیرنده اینترفروت گاما از دو قسمت آلفا با وزن مولکولی ۹۰ کیلودالتون و بتا با ۶۰ -۶۵ کیلو دالتون تشکیل شده است. بخش آلفا در گیرنده دارای میل ترکیبی زیادی به اینترفرون گاما است [Boehm .et al., ۱۹۹۷].

گیرنده اینترفرون گاما دارای سه بخش خارج از سلولی، داخل غشاء سلولی و درون سیتوپلاسمی است که بخش خارج سلولی آلفا اختصاصی گونه می‌باشد. اتصال اینترفرون گاما به این گیرنده‌ها باعث اثرگذاری روی فعالیت سلولها می‌گردد [Green M.M et al., ۱۹۹۸] (شکل ۱-۲).



شکل ۱-۲ : ساختمان گیرنده اینترفرون گاما ناحیه خارج سلولی و محل اختصاصی اتصال به اینترفرون گاما

اتصال اینترفرون گاما به گیرنده خود باعث تشکیل مجموعه گیرنده فعال شده و متعاقب آن فسفریله شدن آنزیم های Janus (Jak) , Jake۱ , Jake۲ وtyrosine kinase اتفاق می افتد. فعال شدن این کینازها باعث فسفریله شدن ناحیه سیتوپلاسمی گیرنده می‌شود. سپس STAT I به این تشکیلات ملحق شده فسفریله می‌شود. سپس STAT دایمر شده و به هسته سلول منتقل می‌شود و در هسته به محل IFN-γ Activated Site (GAS) متصل می‌شود که این محل در ناحیه پروموتور اغلب ژنهای القاء شونده توسط اینترفرون گاما وجود دارد [Delgado M & Genea D. ۲۰۰۰] (شکل ۱-۳).



شکل۱-۳ : انتقال پیام از طریق اتصال اینترفرون گاما به گیرنده خود

اینترفرون گاما با اثر روی سلولهای گوناگون، فعالیت های زیادی را انجام می‌دهد. از مهمترین خواص اینترفرون گاما، می‌توان خواص ضد ارگانیسمهای درون سلولی، ضد ویروسی، افزایش بیان مولکولهای MHC روی سلولهای گوناگون ، القاء بلوغ سلولهای B، فعالیت سلولهای سیتوتوکسیک والقاء رهاسازی حد واسط های التهاب[1] را نام برد.

یکی از علل قدرت ضد ویروسی اینترفرون گاما القای تولید آنزیم Indoleamine ۲/۳-Dioxygenase میباشد. این آنزیم باعث از بین رفتن اسیدآمینه ضروری تریپتوفان شده و در نتیجه سلولها و ارگانیسم‌های مستقر در آنها از بین می‌روند [Bodaghi .et al., ۱۹۹۹ ; Dia.. Damd Gupta.۱۹۹۰]. همچنین اینترفرون گاما باعث القاء سنتز آنزیم (۲-۵A synthetase) Oligoadenylate synthetase(۵'-۲') می‌گردد که این آنزیم یکی از مهمترین ابزار ضد ویروسی است [Justesen J& Berg K. ۱۹۸۶]. اثر ضد ویروسی اینترفرون گاما توسط

[1] - از جمله هیستامین ها

محققان متعددی نشان داده شده است. از جمله پژوهشی که .parra و همکاران در سال ۱۹۹۹ انجام داده است نشان داد که پاکسازی دستگاه اعصاب مرکزی موش از ویروس به کمک اینترفرون گاما ممکن می‌باشد.

اینترفرون گاما دارای کاربردهای پزشکی زیادی است. از این پروتئین برای درمان بیماران با نقص ایمنی مادرزادی و همچنین عوامل عفونی درون سلولی زیر استفاده میشود:

۱- Salmonella typhimurium [Nauciel C. ۱۹۹۲]

۲- Mycobacterium tuberculosis [Stewart T.A.& Bloom B.R ۱۹۹۳]

۳- listeria monocytogenes & Toxoplasma [Huang S. et al., ۱۹۹۳]

۴- Leishmania [Assreury.Y.۱۹۹۴]

۵- Staphylococus aureus [Zhao Y-X ۱۹۹۸]

اینترفرون گاما این بیماریها را از طریق فعال کردن ماکروفاژها از بین می برد. نقش اینترفرون گاما در از بین بردن لیشمانیا ماژور در موشها مشخص شده است. دیده شده است که پس از فعال شدن Th۱ و تولید اینترفرون گاما، این ماده روی ماکروفاژها اثر کرده و با القاء تولید Nitric oxide synthase (iNos) باعث تولید رادیکال آزاد NO می‌گردد که این ماده روی لیشمانیا ماژور سمی است [Assreury, Y. ۱۹۹۴]. یکی دیگر از کاربردهای اینترفرون گاما استفاده از آن در درمان برخی از انواع سرطانها است. ازاینترفرون گاما یا از ژن آن در درمان سرطانهای گوناگون از جمله نروبلاستوما [Seeger R.C ۱۹۹۸]، ملانوما [Abdel-wahab Z. et al., ۱۹۹۷] و همچنین به عنوان یاور در واکسیناسیون با سلولهای توموری [Slooten M.L et al., ۲۰۰۰] استفاده شده است.

قابل ذکر است که اینترفرون گاما برخی از بیماریهای خود ایمنی را تشدید می‌نماید از جمله آنها می توان به Multiple Sclerosis (MS),Rheumatoid Arthritis (RA) , Juvenile Rheumatoid Arthritis , Psoriatic Arthritis (PA), Ankylosing spondylitis اشاره کرد. امروزه یکی از راه های درمان این بیماریها، استفاده از آنتی بادی ضد اینترفرون گاما است [U.S. Patent No ۶/۳۳۳ , ۰۳۲].