بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های نوین
گروه زیست فناوری

پایان نامه ی کارشناسی ارشد رشته ی زیست فناوری گرایش میکروبی

تولید پروتئین نوترکیب GM-CSF در باکتری *E. coli*

استادان راهنما:
دکتر حسن محبت کار
دکتر کامران قائدی

استاد مشاور:
دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

پژوهشگر:
شاهین گوانجی

آبان ماه ۱۳۹۱

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

هزینه های مصرفی این پایان نامه

از بودجه تحقیقاتی پژوهشکده رویان تأمین گردیده است.

دانشگاه اصفهان
دانشکده علوم و فناوری های نوین
گروه زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد رشته زیست فناوری گرایش میکروبی

آقای شاهین گوانجی تحت عنوان

تولید پروتئین نوترکیب GM-CSF در باکتری *E. coli*

در تاریخ ۹۱/۸/۲۹ توسط هیأت داوران زیر بررسی و با درجه عالی به تصویب نهایی رسید.

۱- استاد راهنمای اول پایان نامه دکتر حسن محبت کار با مرتبه ی علمی دانشیار امضا

۲- استاد راهنمای دوم پایان نامه دکتر کامران قائدی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۳- استاد مشاور پایان نامه دکتر محمد حسین نصر اصفهانی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۴- استاد داور داخل گروه دکتر مهرناز کیهانفر با مرتبه ی علمی استادیار امضا

۵- استاد داور خارج از گروه دکتر ابوالقاسم اسماعیلی با مرتبه ی علمی استادیار امضا

امضای مدیر گروه

با تقدیر و سپاس فراوان از یاری و زحمات بی دریغ

اساتید راهنمای بزرگوارم
آقای دکتر حسن محبت کار و آقای دکتر کامران قائدی

استاد مشاور گرامی آقای دکتر محمد حسین نصر اصفهانی

همکاران محترم پژوهشکده رویان
آقای دکتر کیانوش درمیانی، آقای دکتر یحیی خزایی،
خانم لاچینانی، خانم فروزانفر، خانم شجاعی

تقدیم به

پدر ومادرم عزیزم که فروغ نگاهشان،گرمی کلامشان، و
روشنی رویشان
سرمایه های جاودانه زندگی من است .

چکیده

فاکتور رشد گرانولوسیتی-مونوسیتی انسانی(GM-CSF)، گلیکوپروتیینی با وزن ملکولی ۱۴/۴۷۷kD می‌باشد. ژن GM-CSF بر روی کروموزوم شماره ۵ انسانی (5q31.1) قرار دارد. این پروتئین باعث تحریک تکثیر و تمایز سلولهای زاینده گرانولوسیت و ماکروفاژ می شود. پروتئین GM-CSF انسانی دارای ۱۴۴ اسید آمینه می‌باشد که ۱۷ اسید آمینه آن نقش سیگنال پپتید را برای پروتئین ایفا می‌نمایند. و تعداد ۱۲۷ اسید آمینه آن به عنوان پروتئین دارویی با نام مولگراموستیم شناخته می‌شود. GM-CSF دارویی است که با تحریک تولید و تکامل سلول‌های خونی تأثیر قابل توجهی در احیاء سلولهای خونی دارد. GM-CSF توسط سلول‌های اندوتلیال، منوسیت، فیبروبلاست و سلول‌های لنفوسیت T تولید می‌شود. در این مطالعه برای بیان GM-CSF از حاملی موسوم به pET-32(b) محصول شرکت Novagen استفاده گردید. این حامل ۵۹۰۰ جفت باز اندازه دارد و برای کلون نمودن و بیان بالای پروتئین های متصل شده به تیوردوکسین مورد استفاده قرار می‌گیرد. همچنین پروموتور این حامل از نوع T7 است و دارای توالی های قابل شکست His tag و S tag است. در این تحقیق از سویه باکتریایی *E.coli* Rosetta-gami (DE3) به عنوان میزبان استفاده شد و به علت وجود توالی پلی هیستیدین متصل به پروتئین مورد نظرمان از کروماتوگرافی تمایلی نیکل جهت خالص سازی استفاده شد. در مرحله اول، CDS ژن GM-CSF به صورت سنتتیک ساخته شد و در وکتور pET-32(b) قرار داده شد. پس از انتقال به باکتری *E.coli* Rosetta-gami (DE3)، در ۴ زمان ۲، ۴، ۶ و ۸ ساعت و سه دمای ۳۰، ۳۴ و۳۷ درجه سانتی گراد بهینه سازی بیان پروتئین انجام گرفت. محلول حاصله به وسیله SDS-PAGE آنالیز شد. همچنین جهت خالص سازی پروتئین مورد نظر از آنزیمی به نام انتروکیناز استفاده شد که این آنزیم کاملا تخصصی برش در جایگاه توالی↓Asp-Asp-Asp-Asp-Lys ایجاد می‌کند و در نتیجه پروتئین مورد نظرمان به صورت جدا از پروتئین تیوردوکسین با استفاده از SDS-PAGE مشاهده شد نتایج این مطالعه نشان داد که بالاترین غلظت پروتئین GM-CSF برابر ۰/۹ µg/µl مربوط به دمای ۳۴ درجه سانتی‌گراد و زمان ۴ ساعت بود. در مطالعات قبلی غلظت پروتئین GM-CSF بین ۰/۳ تا۰/۸ µg/µl اندازه گیری شده است که پس از بهینه سازی در این مطالعه غلظت بالاتری نسبت به تحقیقات گذشته مشاهده شد.

کلمات کلیدی: GM-CSF، کلونینگ، نوترکیبی، پروتئین، خالص سازی

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: مقدمه

۱-۱ مروری بر کلون کردن ژن و فن آوری DNA نو ترکیب ۱
۱-۲ سایتوکاین‌ها ۲
۱-۲-۱ گیرنده‌های سایتوکاین در سطح سلول‌ها ۳
۱-۲-۲ مسیر انتقال پیام در خانواده گیرنده‌های سایتوکاینی رده I و II ۴
۱-۲-۳ نقش سایتوکاین‌ها در رشد و تمایز گلبول‌های قرمز و سفید خون ۵
۱-۳ فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ماکروفاژ(GM-GSF) ۶
۱-۳-۱ تاریخچه ۶
۱-۳-۲ بیولوژی مولکولی ۷
۱-۴ نقش درمانی پروتئین GM-CSF انسانی ۸
۱-۴-۱ نقش GM-CSF در تکثیر و تمایز سلول‌های ایمنی ۸
۱-۴-۲ نقش GM-CSF در تکنولوژی ساخت DNA واکسن‌ها ۹
۱-۴-۳ نقش GM-CSF در محیط‌های کشت جنین به عنوان فاکتور امبریوتروفیک ۱۰
۱-۴-۴ نقش GM-CSF در درمان سرطان ۱۰
۱-۵ بیان پروتئین GM-CSF ۱۱
۱-۶ پلاسمیدها ۱۲
۱-۶-۱ وکتور pET-32b ۱۲
۱-۷ افزایش حلالیت پروتئین‌های نوترکیب ۱۳
۱-۷-۱ نقش تیوردوکسین در حلالیت پروتئین‌های نوترکیب ۱۴
۱-۸ نقش بر چسب‌ها (Tag) در خالص سازی پروتئین‌ها ۱۵
۱-۸-۱ نقش پلی هیستیدین در در وکتور pET-32b در در خالص سازی پروتئین‌ها ۱۵
۱-۹ سلول‌های باکتریائی مستعد جهت بیان ژن GM-CSF ۱۵
۱-۱۰بررسی بیوانفورماتیکی پروتئین GM-CSF ۱۶
۱-۱۰-۱ آنالیز ساختار دوم و سوم پروتئین hGM-CSF ۱۶
۱-۱۱ نرم افزار Molegro Virtual Docker(MVD ۱۸
۱-۱۲ اهداف ۱۹

عنوان **صفحه**

فصل دوم: مواد و روشها

۲-۱ تجهیزات و دستگاه‌ها ۲۱
۲-۲ مواد مصرفی و نحوه ساخت ۲۲
۲-۲-۱ سویه‌های باکتری ۲۲
۲-۲-۲ وکتور ۲۲
۲-۲-۳ آنتی‌بیوتیک ۲۳
۲-۲-۴ الکتروفورز ژل آگارز ۲۴
۲-۲-۴-۱ بافر الکتروفورز 50X TAE ۲۴
۲-۲-۴-۲ اتیدیوم بروماید ۲۴
۲-۲-۴-۳ بافر بارگذاری ۲۵
۲-۲-۴-۴ مارکرهای اندازه DNA ۲۵
۲-۲-۴-۵ روش الکتروفورز ۲۶
۲-۲-۵ تکنیک PCR ۲۷
۲-۲-۵-۱ طراحی پرایمر ۲۷
۲-۲-۵-۲ مواد مورد نیاز برای PCR ۲۸
۲-۲-۵-۳ روش انجام تکنیک PCR ۲۸
۲-۳-۱ استخراج محصول از ژل ۲۹
۲-۳-۱-۱ استخراج محصول PCR یا DNA حاصل از هضم آنزیمی از ژل ۲۹
۲-۳-۱-۲ تعیین غلظت DNA ۳۰
۲-۳-۱-۳ هضم آنزیمی ۳۰
۲-۳-۱-۳-۱ آنزیم BglII (Fermentas) ۳۰
۲-۳-۱-۳-۲ آنزیم SalI (Fermentas) ۳۱
۲-۳-۱-۴ الحاق قطعه کد کننده ژن GM-CSF به داخل وکتورpET-32b ۳۱
۲-۳-۱-۵ ترانسفورماسیون وکتورهای نوترکیب ۳۴
۲-۳-۱-۶ تهیه سلول‌های باکتریایی مستعد برای ترانسفورماسیون ۳۴
۲-۳-۱-۷ مواد مورد استفاده در ترانسفورماسیون باکتری‌ها ۳۵
۲-۳-۱-۸ روش ساخت محیط کشت باکتریایی LBA ۳۵
۲-۳-۱-۹ روش ترانسفورماسیون ۳۶
۲-۳-۱-۱۰ انتخاب کلونی‌های مثبت و کشت انبوه آن ها ۳۶
۲-۳-۱-۱۱استخراج وکتورهای نوترکیب ۳۷
۲-۳-۱-۱۲ هضم آنزیمی وکتور pGEM ۳۸
۲-۳-۱-۱۳ الحاق قطعه‌ی حاوی ژن GM-CSF به داخل وکتورpET-32b ۳۹

عنوان **صفحه**

۲-۳-۱-۱۴ ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب pET-32b -GM-CSF در باکتری E. coli TOP10 ..... ۴۰
۲-۳-۱-۱۵ تعیین توالی وکتور نوترکیب pET-32b –GM-CSF ۴۰
۲-۳-۱-۱۶ ترانسفورماسیون وکتور نوترکیب در باکتری E. coli RosettaBlue(DE3)pLysS ۴۰
۲-۳-۲ بیان پروتئین GM-CSF به واسطه القاع با IPTG ۴۱
۲-۳-۲-۱ کشت سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده ۴۱
۲-۳-۲-۲ القاء بیان پروتئین در سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده ۴۱
۲-۳-۲-۳ القاء بیان پروتئین در سلول‌های باکتریایی ترانسفورم شده توسط pET-32b فاقد ژن GM-CSF ۴۲
۲-۳-۲-۴ استخراج و خالص سازی پروتئین GM-CSF ۴۲
۲-۳-۲-۵ تغلیظ سازی پروتئین تخلیص شده ۴۴
۲-۳-۲-۶ الکتروفورز ژل پلی اکریل امید-سدیم دودسیل سولفات ۴۵
۲-۳-۲-۶-۱ بافر الکتروفورز ۵X Tris-Glycine ۴۵
۲-۳-۲-۶-۲ استوک اکریل امید-بیس اکریل امید۳۰% ۴۵
۲-۳-۲-۶-۳ بافر بارگذاری ۴۶
۲-۳-۲-۶-۴ مارکر اندازه پروتئین ۴۷
۲-۳-۲-۶-۵ محلول ۱۰% آمونیوم پرسولفات ۴۷
۲-۳-۲-۶-۶ تکنیک الکتروفورز SDS-PAGE ۴۸
۲-۳-۲-۶-۶-۱ آماده‌سازی ژل ۴۸
۲-۳-۲-۶-۶-۲ آماده‌سازی نمونه ها ۴۹
۲-۳-۲-۶-۶-۳ رنگ آمیزی کوماسی بلو ۴۹

فصل سوم: نتایج و مشاهدات

۳-۱ نتایج ساخت وکتور بیانی کد کننده ی فاکتور محرک کلونی گرانولوسیت ماکروفاژ(hGM-GSF) ... ۵۱
۳-۱-۱ ترانسفرم وکتور pGEM/GM-CSF در باکتری TOP10 ..... ۵۲
۳-۱-۲ نتایج ساخت وکتور نوترکیب pET-32b- hGM-GSF ۵۲
۳-۱-۲-۱ تکثیر قطعه ی کدکننده ی ژن hGM-GSF ۵۳
۳-۱-۲-۱ تایید هضم آنزیمی در وکتور pGEM و pET-32b ۵۴
۳-۱-۲-۲ هضم آنزیمی وکتور pGEM و استخراج ژن GM-CSF ۵۶
۳-۱-۲-۳ هضم آنزیمی وکتور pET-32b ۵۷
۳-۱-۲-۳ نتیجه الحاق قطعه‌ی کد کننده‌ی ژن GM-CSF در وکتورpET-32 ..... ۵۸

عنوان **صفحه**

۳-۱-۲-۴ نتیجه PCR بر روی کلونی های انتخاب شده حاصل از ترانسفورماسیون وکتور pET-32b/GM-CSF نوترکیب ۵۸
۳-۲-۱ ترانسفرم وکتور pET-32b/ GM-CSF در باکتری بیانی(Rosetta-gami) ۶۰
۳-۲-۱-۱ نتیجه PCR بر روی کلونی های انتخاب شده حاصل از ترانسفورماسیون وکتور pET-32b/GM-CSF نوترکیب در باکتری بیانی(Rosetta-gami) ۶۰
۳-۲-۱-۲ نتیجه تعیین توالی قطعه ی کد کننده ی GM-CSF در وکتور نوترکیبpET-32b/GM-CSF ۶۱
۳-۳ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF تولید شده به وسیله ی IPTG ۶۲
۳-۳-۱ دمای مناسب کشت جهت بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF ۶۲
۳-۳-۲ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF تولید شده به وسیله ی IPTG در دمای ۳۰ درجه ۶۳
۳-۳-۳ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF تولید شده به وسیله ی IPTG در دمای ۳۴ درجه ۶۴
۳-۳-۴ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF تولید شده به وسیله ی IPTG در دمای ۳۷ درجه ۶۵
۳-۳-۴ نتایج بررسی غلظت پروتئین نوترکیب GM-CSF ۶۶
۳-۳-۵ جداسازی پروتئین نوترکیب GM-CSF از پروتئین تیوردوکسین با استفاده از آنزیم انتروکیناز ۶۷

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱ بحث ۶۸
۴-۱-۱ پروتئین‌های نوترکیب و نقش آنها ۶۸
۴-۱-۲ بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF انسانی در باکتری E. coli ۶۹
۴-۱-۳ فیوژن پروتئین‌ها جهت افزایش حلالیت این پروتئین ها ۷۰
۴-۱-۴ سوش‌های اشرشیاکلی دارای کدون‌های نادر ۷۰
۴-۱-۵ بهینه سازی زمان و دما جهت افزایش بیان پروتئین های نوترکیب ۷۱
۴-۱-۶ خالص سازی پروتئین‌های نوترکیب ۷۱
۴-۱-۷ نقش وکتور بیانی pET-32b در بیان پروتئین‌های نوترکیب ۷۲
۴-۱-۸ بررسی غلظت پروتئین نوترکیب GM-CSF انسانی تولید شده ۷۳
۴-۱-۹ روش انتقال وکتور pET-32b دارای ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین ۷۳
۴-۲ نتیجه گیری کلی ۷۴
۴-۳ پیشنهادات ۷۴
منابع و مأخذ ۷۵

فهرست شکلها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ مروری بر روند القا و عملکرد سایتوکاین‌ها ۳
شکل ۱-۲ تعدادی از گیرنده‌های رده I ۴
شکل ۱-۳ مسیر انتقال پیام در خانواده گیرنده‌های سایتوکاین ۵
شکل ۱-۴ توالی نوکلئوتید hGM-CSF ۸
شکل ۱-۵ ساختار ژن hGM-CSF ۸
شکل ۱-۶ مکانیسم عملکرد پروموتورT7 ..... ۱۳
شکل ۱-۷ توالی اسید آمینه پروتئین hGM-CSF ۱۶
شکل ۱-۸ ساختار ثانویه hGM-CSF ۱۶
شکل ۱-۹ ساختار سه بعدی پروتئین hGM-CSF ۱۷
شکل ۲-۱: نقشه ژنتیکی وکتور pET-32b ۲۲
شکل ۲-۲ نقشه ژنتیکی وکتور pGEM ۲۳
شکل ۲-۳ شناساگرهای DNA ۲۶
شکل ۲- ۴نقشه ژنتیکی وکتور pGEM ۳۲
شکل ۲- ۴ نقشه ژنتیکی وکتور pET-32b ۳۳
شکل ۲-۷ الحاق ژن GM-CSF در وکتور pET-32b ۳۹
شکل ۲-۸ مارکر پروتئین ۴۷
شکل ۳-۱ ترانسفرم وکتور pGEM / GM-CSF در باکتری TOP10 ..... ۵۲
شکل ۳-۲ محصول PCR جهت تکثیر قطعه حاوی ژن GM-CSF ۵۳
شکل ۳-۴ وکتور pGEM تحت هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم های محدودالاثر *Bgl*IIو *Sal*I و خروج قطعه حاوی ژن GM-CSF ۵۴
شکل ۳-۵ وکتور pET-32b تحت هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *Bgl*IIو *Sal*I و خروج قطعه حاوی ژن GM-CSF ۵۵
شکل ۳-۶ مراحل استخراج قطعه کد کننده ژن GM-CSF از ژل ۵۶
شکل ۳-۷ هضم آنزیمی با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *Bgl*IIو *Sal*I و مراحل استخراج وکتور-pET 32b به صورت خطی از ژل ۵۷
شکل ۳-۸ محصول PCR جهت تکثیر قطعه حاوی ژن GM-CSF بر روری باکتری‌های TOP10 ترانسفورم شده ۵۹
شکل ۳-۹ هضم آنزیمی برروی کلنی‌های شماره ۱ و ۳ با استفاده از آنزیم‌های محدودالاثر *Bgl*IIو *Sal*I و خروج قطعه مربوط به ژن GM-CSF ۵۹
شکل ۳-۱۰ محصول PCR جهت تکثیر قطعه حاوی ژن GM-CSF بر روری باکتری‌های Rosetta-gami ترانسفورم شده ۶۰

عنوان **صفحه**

شکل۳-۱۱ نتایج تعیین توالی قطعه کد کننده GM-CSF در وکتور pET-32b ۶۱
شکل۳-۱۲ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۰ درجه در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت ۶۳
شکل۳-۱۳ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۰ درجه در زمان‌های ۶ و ۸ ساعت..... ۶۳
شکل۳-۱۴ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۴ درجه در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت ۶۴
شکل۳-۱۵ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۴ درجه در زمان‌های ۶ و ۸ ساعت..... ۶۴
شکل۳-۱۶ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۷ درجه در زمان‌های ۲ و ۴ ساعت..... ۶۵
شکل۳-۱۷ القای بیان پروتئین نوترکیب GM-CSF در دمای ۳۷ درجه در زمان‌های ۶ و ۸ ساعت..... ۶۵
شکل ۳-۱۸ نموار مربوط به غلظت پروتئین نوترکیب GM-CSF در زمان‌ها و دماهای مختلف ۶۶
شکل۳-۱۹ جداسازی پروتئین GM-CSF از تیوردوکسین با استفاده از آنزیم انتروکیناز در زمان‌های ۲۴ و ۳۶ ساعت ۶۷

فهرست جدولها

عنوان **صفحه**

جدول ۲- ۱ دستگاه‌های مورد نیاز ۲۱
جدول ۲-۲ محلول‌های آنتی‌بیوتیک ۲۳
جدول۲- ۳ ترکیبات لازم برای ساخت بافر ۵۰ X TAE ۲۴
جدول۲- ۴ ترکیبات لودینگ بافر ۶X ۲۵
جدول ۲- ۵ مواد لازم برای ران کردن نمونه‌ها در الکتروفورز ۲۵
جدول ۲- ۶ فهرست پرایمرها ۲۷
جدول۲- ۷ مواد بکار رفته در PCR با آنزیم پلیمراز Smar Taq ۲۸
جدول۲- ۸ مواد بکار رفته در PCR با آنزیم پلیمراز Smar Taq ۲۸
جدول۲- ۹ مواد بکار رفته جهت استخراج محصول DNA از ژل ۲۹
جدول۲-۱۰محتویات بکار رفته در الحاق با ژن GM-CSF با وکتور pET-32b ۳۴
جدول ۲-۱۱ ترکیبات ساخت محیط کشت LBA ۳۵
جدول ۲-۱۲ محتویات کیت استخراج وکتور QIAprep Spin Miniprep kit ۳۷
جدول ۲-۱۳ مواد لازم جهت ساخت بافر شستشودهنده ۴۳
جدول ۲-۱۴ مواد لازم جهت ساخت بافر استخراج کننده ۴۳
جدول ۲-۱۵ بافر الکتروفورز ۵X Tris-Glycine ۴۵
جدول ۲-۱۶ مواد لازم جهت ساخت استوک اکریل امید-بیس اکریل امید۳۰% ۴۵
جدول ۲-۱۷فرمول تهیه Sample Buffer ۴۶
جدول ۲-۱۸ فرمول ترکیبات ژل های۱۲ % و۵ % برای تهیه ۲ مینی ژل ۴۹
جدول ۲-۱۹ فرمول تهیه محلول رنگ آمیزی کوماسی ۴۹
جدول ۲-۲۰ فرمول تهیه محلول رنگ بر ۵۰

فصل اول

مقدمه

۱-۱ مروری بر همسانه سازی ژن و فناوری DNA نوترکیب

ایده DNA نوترکیب برای نخستین بارتوسط Peter Lobban دانشجوی گروه بیوشیمی در دانشگاه استانفورد آمریکا مطرح شد و در سالهای ۱۹۷۲ و ۱۹۷۳ اولین پژوهش با تکنولوژی DNA نوترکیب با موفقیت انجام شد(Cohen et al. 1973, Jackson et al. 1972., Lobban and Kaiser 1973).تکنولوژی DNA نوترکیب در سال ۱۹۷٤ توسط ۲ پژوهشگر دانشگاه استانفورد آمریکا به نام های Stanley N. Cohen و Herbert W. Boyer ثبت اختراع شد. و این اختراع بسیار مهم در سال ۱۹۸۰ برنده جایزه ویژه اختراعات شد(Hughes 2001). نخستین دارو با استفاده از تکنولوژی نوترکیب انسولین انسانی بود که بسیار مورد توجه قرار گرفته شد(Johnson 1983). و پس از آن تحقیقات دیگر منجر به تولید دارو های جدید نوترکیب شد. نوترکیبی DNA عبارتست از تولید توالی از DNA به روش مصنوعی و انتقال این توالی به میزبان هایی که به طور طبیعی فاقد این ژن هستند و زمانی که DNA نوترکیب در سلول میزبان شروع به تکثیر نماید و تعداد کپی های آن توالی با استفاده از سیستم همانند سازی سلول میزبان افزایش یابد در اصطلاح کلونینگ ژن نامیده می‌شود. در مرحله اول تولید DNA نوترکیب ژن مورد مطالعه از نظر عملکرد، جایگاه و توالی در سلول میزبان مورد بررسی قرار می‌گیرد و با استفاده از تکنیک های خاص این ژن از سلول طبیعی خود استخراج می‌شود و جهت انتقال به سلول میزبان در حامل خاص قرار

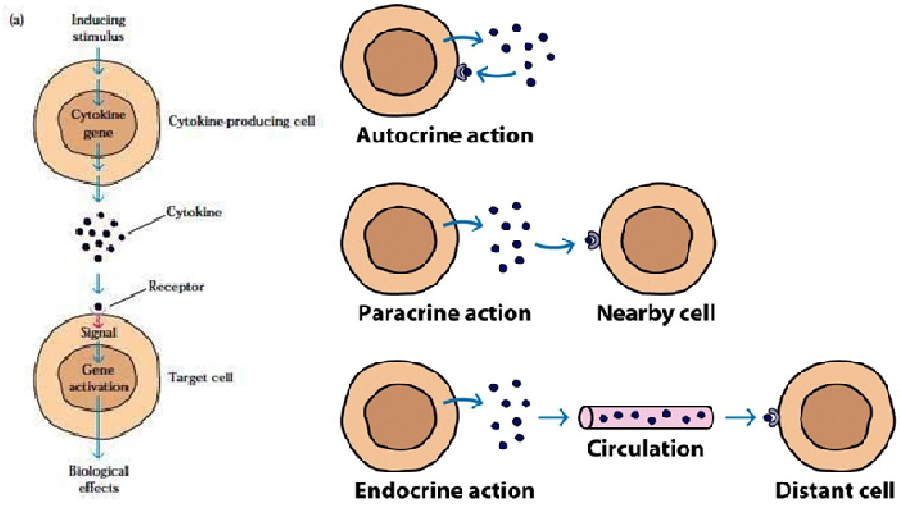
می‌گیرد .این روش در رشته های مختلف بسیار کاربرد دارد و با استفاده از آن می‌توان قطعه ای از ژنوم موجودات مختلف را به صورت هدفمند به موجودی دیگر انتقال داد. در حال حاضر از DNA نوترکیب در رشته های بیوتکنولوژی ، دارو سازی و صنایع غذایی استفاده می‌شود اما مهمترین استفاده از این روش در تولید دارو های خاص می‌باشد(Brown 2006). تولید اکثر دارو های نوترکیب در سلولهای پروکاریوتی به سلول های یوکاریوتی به علت هزینه های کم ترجیح داده می‌شوند و در این میان باکتری ها نقش مهمی را ایفا می‌نمایند-Gualandi) (Signorini and Giorgi 2001 در حال حاضر دارو های متعددی با تکنیک DNA نوترکیب تولید و به بازار عرضه شده است و تحقیق برای کشف داروهای جدید جهت درمان بیماری های خاص کماکان ادامه دارد.

۲-۱ سایتوکاین‌ها

اولین بار فعالیت سایتوکاین ها در اواسط دهه ۱۹۶۰ کشف شد، در آن تحقیق مشخص شد مایع روی کشت لنفوسیت ها در شرایط *in vitro*، حاوی فاکتورهایی است که قادر به تنظیم تکثیر، تمایز و بلوغ سلول های ایمنی میزبان هایی که از نظر ژنتیکی با هم تفاوت دارند، می‌باشند(.Gery and Waksman 1972, Ikram et al 2010, Mier and Gallo 1980). پس از آن، کشف شد که تولید این فاکتورها توسط لنفوسیت های کشت شده، در اثر آنتی ژن‌ها یا میتوژن های غیر اختصاصی القا می‌گردد بدلیل غلظت پایین سایتوکاین ها در مایعات روی کشت و عدم وجود روش های مناسب اندازه گیری وجداسازی بیوشیمیایی، خالص سازی آنها با مشکل مواجه بود. با توسعه تکنیک های کلون کردن ژن در دهه ۱۹۷۰و ۱۹۸۰ ، منجر به تولید سایتوکاین های خالص بوسیله بیان پروتئین از ژن های کلون شده گردیدسایتوکاین ها در ایجاد پاسخ ایمنی در سلول های لنفاوی، سلول های التهابی و سلو ل های خون ساز نقش دارند(Pizarro and Cominelli 2007). سایتوکاین ها، پروتئین ها یا گلیکوپروتئین‌هایی[1] با وزن مولکولی کم بوده که توسط گلبول های سفید یا دیگر سلول ها در پاسخ به تعدادی از محرک ها ترشح می‌شوند. سایتوکاین ها در سطح سلول های هدف، به گیرنده های اختصاصی خود متصل شده ومسیرهای انتقال پیام را آغاز کرده که در نهایت بیان ژن ها را در این سلول ها تغییر می‌دهند. برهم کنش بین سایتوکاین ها و گیرنده آنها بر روی سلول ها به صورت اختصاصی میباشد. سایتوکاین ها به ۳ حالت ممکن است که با گیرنده سطح سلولی اختصاصی خود برهم کنش ایجاد کنند در حالت اول سایتوکاین ممکن است با گیرنده غشایی همان سلول ترشح کننده سایتوکاین اتصال برقرار کرده و به اصطلاح به صورت اتوکراین عمل کند. در حال بعدی برهم‌کنش با گیرنده های اختصاصی بر روی سلول ها در نزدیکی سلول ترشح کننده سایتوکاین می‌باشد که اصطلاحا سایتوکاین عمل خود را به صورت پاراکراین انجام می‌دهد و در موارد کمی، ممکن است سایتوکاین ها به گیرنده‌های سلول های هدف در نقاط دورتری متصل و به صورت اندوکراین عمل کنند اکثر سایتوکاین ها به صورت اتوکراین و پاراکراین در اتصال به گیرنده اختصاصی بر روی

[1] - Glycoprotein

سلول‌ها عمل می کنند و تنها گروه اندکی از سایتوکاین ها به صورت اندوکراین عمل می‌کنند(Dixon and Philips 2011, Joseph et al. 2002, Mitchell and Cotran 2002).



شکل ۱-۱ مروری بر بر روند القا و عملکرد سایتوکاین‌ها (Leonard 2008).

سایتوکاین‌ها به ۳ حالت اتوکراین ، پاراکراین اندوکراین با گیرنده سطح سلولی اختصاصی خود برهم‌کنش ایجاد می‌کنند. اکثر سایتوکاین‌ها عملکرد اتوکراین و پاراکراین را نشان داده و اندکی از آنها عملکرد اندوکراین را نشان می‌دهند

۱-۲-۱ گیرنده های سایتوکاین در سطح سلول‌ها

گیرنده های سایتوکاین از زیرواحدهای مجزایی تشکیل شده اند که یک زنجیره عموماً جهت اتصال و انتقال پیام ضروری بوده و دیگری جهت انتقال پیام ضروری بوده و اغلب نقش ضعیفی در اتصال بازی می‌کند. انواع مختلفی از سلول ها، بیان کننده گیرنده‌های سایتوکاین در سطح خود می‌باشند این گیرنده ها از نظر ساختاری بسیار با یک دیگر تفاوت دارند و به پنج خانواده تقسیم می‌شوند(Becker T. C. et al. 2002)

الف) خانواده گیرنده های ایمونوگلبولین

ب) خانواده گیرنده های سایتوکاینی رده I (خانواده گیرنده هماتوپویتین)

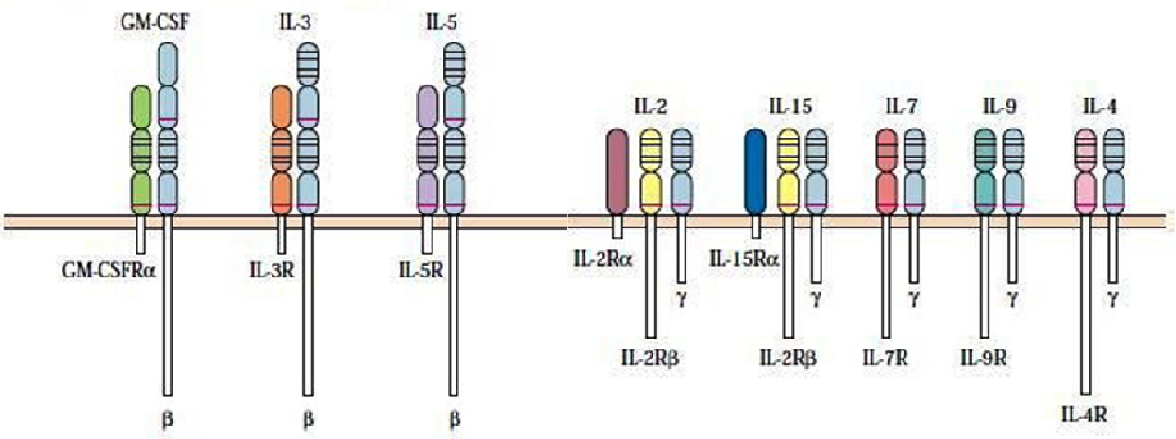
پ) خانواده گیرنده های سایتوکاینی رده II (خانواده گیرنده اینترفرون)

ت) خانواده گیرنده های TNF

ث) خانواده گیرنده های کموکاین

در میان این خانواده‌ها بیشترین گیرنده‌های سایتوکاینی که در سیستم ایمنی و خونسازی نقش دارند مربوط به خانواده گیرنده‌های سایتوکاینی رده I (خانواده گیرنده هماتوپویتین) می‌باشند اعضای این خانواده دارای ردیف های اسیدآمینه‌ای حفاظت شده در دومین‌های خارج سلولی شامل چهار عدد، سیستئین و یک ردیف حفاظت

شده(WSXWS) که شامل اسید آمینه های تریپتوفان و سرین می‌باشد هستند(Haque and Sharma. 2006). گیرنده‌های مختلفی در زیر خانواده رده I وجود دارد دارای مسیر های انتقال پیام مشترک هستند در این گروه IL-3 و GM-CSF[1] روی سلو ل های بنیادی خونساز و سلول های پیش ساز اثر کرده، سبب فعال سازی منوسیت ها شده و تمایز مگاکاریوسیت‌ها را القا می‌کنند. هر سه سایتوکاین سبب القای تکثیر ائوزینوفیل‌ها و گرانولاسیون بازوفیل‌ها و آزاد سازی هیستامین می‌شوند(Leonard 2008).



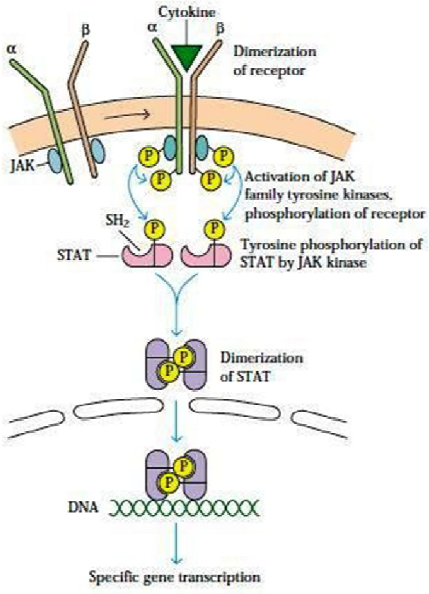
شکل ۱-۲ تعدادی از گیرنده‌های رده I

خانواده گیرنده هماتوپویتین دارای مسیرهای انتقال پیام مشترک هستند و گیرنده بسیاری از پروتئین ها مانند GM-CSF، IL-3، IL-5 در رده I قرار دارند. هر کدام از این سایتوکاین‌ها با میل پیوندی پایینی به پروتئین اختصاصی پذیرنده سایتوکاین متصل می‌شوند. در پی دایمر شدن میل پیوندی افزایش یافته و در صورت اتصال به سایتوکاین‌ها قادر به انتقال پیام از درون غشا می‌باشند(Leonard 2008).

۱-۲-۲ مسیر انتقال پیام در خانواده گیرنده های سایتوکاینی رده I و II

انتقال پیام اکثر گیرنده‌های سایتوکاین در رده I و II با اتصال سایتوکاین به گیرنده سطح سلولی شروع می‌شود وبه دایمریزاسیون زیرواحد های گیرنده می‌انجامد سپس زیرواحد پذیرنده متصل به JAK[2] فعال شده و فسفریلاسیون تیروزین مختلف باعث ایجاد جایگاه‌های اتصال برای STAT[3] می‌شود درنتیجه STATهای فعال شده و از غشای سلول به هسته منتقل شده و در آنجا نسخه برداری از ژن های خاصی را القا می‌کنند .اتصال STATها به زیر واحد ها از دومین SH2 موجود در STAT به واحدهای تیروزین فسفریله شده در زیر واحد گیرنده در اثر JAK صورت می‌گیرد(Becker S. et al. 1998, Chen et al. 1998).

[1] - Human granulocyte macrophge colony stimulating factor
[2] - Janus tyrosine Kinase
[3] - Signal Transducer and Activator of Transcription



شکل ۱-۳ مسیر انتقال پیام در خانواده گیرنده‌های سایتوکاین که با فسفریلاسیون تیروزین و ایجاد جایگاه‌های اتصال برای STAT شروع می‌شود درنتیجه STATهای فعال شده و از غشای سلول به هسته منتقل شده و در آنجا نسخه‌برداری از ژن های خاصی را القا می‌کنند(Dixon and Philips 2011).

۱-۲-۳ نقش سایتوکاین ها در رشد و تمایز گلبول های قرمز و سفید خون

در بدن انسان سلول‌های خونی حدود ۵۵ تا ٤۵% حجم کل خون را تشکیل می‌دهد و شامل سلول‌های قرمز خون یا اریتروسیت‌ها[1] ، سلول‌های سفید خون یا لکوسیت‌ها[2] و پلاکت‌ها یا ترومبوسیت‌ها[3] هستند این سلول‌ها از نظر ساختمان سلولی و عملکرد با یکدیگر دارای تفاوت هستند و هرکدام دارای نقش مهمی در بدن انسان هستند. در بدن انسان روزانه میلیاردها گلبول‌سفید و قرمز و پلاکت جهت جایگزینی با سلول‌های خونی که در روند تبدیلات[4] طبیعی سلول، بیماری یا ضربه از دست می‌روند، تولید می‌شود در زمان عفونت و خونریزی تولید این سلول ها توسط ترشح سایتوکاین از سیستم ایمنی بسیار افزایش می‌یابد(Bonomo and Bonomo 2005). و با از بین رفتن عامل استرس دوباره به حالت طبیعی خود بر می‌گردد .این روند تولید سلول خونی و تعادل آن را هماتوپویزیس[5] گویند(Clayton 2003). تحقیقات مختلف نشان دادند که فاکتورهای مختلفی که در خون به صورت محلول هستند در رشد و تمایز گلبول‌های قرمز و سفید خون نقش دارند. سایتوکاین‌های ترشح شده از

[1] - Erythrocyte
[2] - leukocytes
[3] - thrombocytes
[4] - Turnover
[5] - Hematopoiesis