وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

دانشگاه شهید مدنی آذربایجان

دانشکده ی کشاورزی

گروه بیوتکنولوژی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد

رشته مهندسی کشاورزی- بیوتکنولوژی در کشاورزی

جداسازی و کلونینگ cDNAی ژن تولید کننده انسولین انسانی *IGF-1*

استا راهنما:

دکتر محمد احمدآبادی

استاد مشاور:

دکتر مقصود پژوهنده

پژوهشگر:

ساناز نوجوان

اسفند/۱۳۹۰

تبریز/ایران

Ministry of Sciences, Researches, and Technology

Azarbayjan University of Shahid Madani

Faculty of Agriculture

A Thesis Presented to the Department of Biotechology in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Agricultural Biotechnology

Isolation and cloning of human *IGF-1* cDNA

Supervisor

Mohammad Ahmadabadi (Ph.D)

Consultant

Maghsoud Pazhouhandeh (Ph.D)

By

Sanaz Nojavan

Mar/2012

Tabriz/Iran

فهرست

چکیده.....viii

۱ مقدمه ۲

۱-۱ تولید داروهای زیستی در گیاهان ۲

۱-۲ داروهای زیستی تولید شده در گیاهان ٤

۱-۳ فاکتورهای رشد شبه انسولین در انسان ٥

۱-٤ خصوصیات انسولین و فاکتورهای رشد شبه انسولین انسانی.....۷

۱-٤-۱ ساختار ژنی ۷

۱-٤-۲ ساختار پروتئینی.....۹

۱-٤-۳ فیزیولوژی هورمونی ۱۳

۱-٤-٤ اثرات فیزیولوژیکیIGF-1.....۱۹

۱-٤-IGF-1٥ به عنوان یک عامل درمانی ۲۱

۱-٤-٦ پروتئین های اتصالی فاکتور رشد شبه انسولین ۱ .....۲۷

۱-٤-۷ گیرنده های فاکتور رشد شبه انسولین.....۲۸

۱-٤-۸ مسیر انتقال پیام IGF-1 .....۳۱

۱-٤-۹ مسیر تنظیم گلوکز خون..... ۳۲

۱-٤-۱۰ تولید IGF-1 در سیستم های مختلف بیان پروتئین های نوترکیب..... ۳۵

۱-۵ هدف پژوهش ۳٦

۲ مواد و روشها ۳۹

۲-۱ مواد ۳۹

۲-۱-۱ مواد شیمیایی..... ۳۹

۲-۱-۲ آنزیم ها و کیت ها ٤۰

۲-۱-۳ مارکرهای استفاده شده برای تعیین وزن مولکولی نمونه های DNA..... ٤۱

۲-۱-٤ آغازگرها یا الیگو دئوکسی نوکلئوتیدها (پرایمرها)..... ٤۲

۲-۱-۵ نژاد باکتریایی و محیط ها ٤۲

۲-۱-٦ سلولهای انسانی ٤٤

۲-۱-۷ لیست وکتورها..... ٤٤

۲-۲ روش ها ٤٦

۲-۲-۱ آماده سازی سلولهای شایسته ی باکتریایی ٤٦

۲-۲-۲ ترانسفورماسیون سلول های باکتریایی ٤۸

۲-۲-۳ استخراج اسیدهای نوکلئیک ٤٨
۲-۲-٤ تعیین غلظت اسیدهای نوکلئیک ها ٥٠
۲-۲-٥ رسوب و خالص سازی اسیدهای نوکلئیک ٥١
۲-۲-٦ خالص سازی اسیدهای نوکلئیک با فنل:کلروفرم:ایزوآمیل الکل ٥١
۲-۲-۷ واکنش زنجیره ای پلیمراز ٥٢
۲-۲-۸ سنتز cDNA ٥٢
۲-۲-۹ برش DNA توسط آنزیم های برشی ٥٢
۲-۲-۱۰ لیگاسیون قطعات DNA ٥٣
۲-۲-۱۱ الکتروفورز اسیدهای نوکلئیک ٥٣
۲-۲-۱۲ خالص سازی DNA از ژل آگارز LMP ٥٤
۳ نتایج ٥٦
۳-۱ استخراج RNA ٥٦
۳-۲ تکثیر cDNAی ژن IGF-1 ..... ٥٧
۳-۳ کلونینگ cDNAی تکثیر شده در وکتور pGBKT7 ..... ٥٧
۳-۳-۱ مراحل تایید کلونیها برای حضور ژن *IGF-1* پس از ترانسفورماسیون *E. coli* با وکتور pSN1 . ٥٩

٣-٤ نتایج توالی یابی cDNAی کلون شده ٦٠
٣-٥ کلونینگ cDNAی تایید شده ی ژن *IGF-1* در وکتور پایه ی pMCS5 ..... ٦٠
٣-٥-١ مراحل تایید وکتور pSN2 ..... ٦٢
٣-٦ کلونینگ ژن تایید شده ی *IGF-1* در وکتور pHK20 ..... ٦٣
٣-٦-١ مراحل تایید وکتور pSN3 ..... ٦٥
٣-٧ کلونینگ ژن تایید شده ی *IGF-1* در وکتور اختصاصی کلروپلاست pRB94 ..... ٦٦
٣-٧-١ مراحل تایید وکتور pSN4 ..... ٦٧
٤ بحث ٧١
٥ منابع و مآخذ ٧٦
٦ چکیده انگلیسی ٨١
٧ ضمایم ٨٢

فهرست اشکال

شکل (۱-۱) نقشه ی ژن ***IGF-1*** انسانی و mRNA های مربوط به آن.....۹

شکل (۱-۲) ساختار اولیه و پیوند های دی س‌ولفیدی IGF-1.....۱۱

شکل (۱-۳) ساختار نوع سوم انسولین و IGF-1.....۱۲

شکل (۱-٤) غلظت سرمی IGF-1 و IGF-2.....۱۵

شکل (۱-۵) میانگین غلظت سرمی IGF-1 در افراد نرمال از تولد تا بزرگسالی.....۱٦

شکل (۱-٦) نحوه گردش محور GH-IGF-1 در شرایط سلامتی و بیماری.....۱۷

شکل (۱-۷) ساختار گیرنده های انسولین، IGF-1 و IGF-2.....۲۹

شکل (۱-۸) فعال سازی گیرنده ی IGF-1 و مسیر انتقال پیام پایین دست.....۳۲

شکل (۱-۹) مسیر انتقال پیام انسولین و IGF-1.....۳٤

شکل (۲-۱) تصویر الکتروفورز مارکرهای Kb ۱و Kb.....٤۲

شکل (۳-۱) نتیجه ی سنجش کیفیت RNA ی استخراج شده.....۵٦

شکل (۳-۲) تصویر الکتروفورز محصول PCR حاصل از تکثیر cDNAی ژن *IGF1*.....۵۷

شکل (۳-۳) شکل شماتیک وکتور حاصل از کلون کردن cDNAی ژن *IGF-1* در وکتور بیان

pGBKT7.....۵۸

شکل (۳-٤) تصویر باکتری های رشد کرده روی محیط حاوی کانامایسین، پس از ترانسفورماسیون آنها با وکتور pSN1 .....۵۸

شکل (۳-۵) تصویر الکترفورز محصول PCR حاصل از بررسی تعدادی از کلونیهای رشد کرده روی محیط انتخابی پس از ترانسفورماسیون با وکتور pSN1 با استفاده از جفت پرایمر اختصاصی ژن *IGF-1*.....۵۹

شکل (۳-٦) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی تعدادی از پلاسمیدهایی که نتیجه آزمون PCR برای حضور ژن *IGF-1* در آنها مثبت بود.....٦۰

شکل (۳-۷) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی وکتور pMCS5 و pSN1 روی ژل LMP.....٦۱

شکل (۳-۸) شکل شماتیک وکتور pSN2 که حاصل کلونینگ cDNAی ژن *IGF-1* در وکتور پایه ی pMCS5.....٦۲

شکل (۳-۹) تصویر الکتروفورز محصول PCR باکتری های رشد کرده روی محیط گزینشی حاوی آمپی سیلین در مرحله ی کلونینگ *IGF-1* در وکتور پایه ی pMCS5.....٦۲

شکل (۳-۱۰) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی پلاسمیدهای تایید شده به روش PCR وکتور pSN2.....٦۳

شکل (۳-۱۱) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی وکتورهای pHK20 و pSN2.....٦٤

شکل (۳-۱۲) شکل شماتیک کلون ژن *IGF-1* در وکتور pHK20.....٦٤

شکل (۳-۱۳) تصویر الکتروفورز محصول PCR تعدادی از کلونی های رشد کرده در محیط گزینشی.....٦٥

شکل (۳-۱٤) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی تعدادی از وکتورهای تایید شده بوسیله ی PCR.....٦٦

شکل (۳-۱٥) تصویر محصول برش آنزیمی وکتورهای pSN3 و pRB94.....٦٧

شکل (۳-۱٦) شکل شماتیک کلون ژن *IGF-1* در وکتور اختصاصی کلروپلاست pRB94.....٦٧

شکل (۳-۱۷) تصویر الکتروفورز محصول PCR تعدادی از باکتری های رشد کرده روی محیط گزینشی.....٦٨

شکل (۳-۱۸) تصویر الکتروفورز محصول برش آنزیمی دو نمونه از پلاسمیدهای تایید شده.....٦٩

چکیده:

با توجه به مزایای زیاد گیاهان برای تولید پروتئین های نوترکیب، توسعه ی روش های مناسب برای تولید پروتئین های مهم در سلامت و درمان بیماری های انسانی بسیار مورد توجه قرار گرفته است. در ایران نیز با توجه به اینکه تعداد زیادی از این پروتئین های نوترکیب از خارج تامین می شود، ایجاد سیستم های مناسب برای تهیه ی این نوع پروتئین ها در داخل کشور ضروری به نظر می رسد. یکی از پروتئین های مهم انسانی، IGF-1 می باشد که نقش اساسی در درمان بیماری هایی از قبیل دیابت، پوکی استخوان، چاقی، اختلالات عصبی و عضلانی و ...، ایفا می کند. بنابراین، در این پژوهش تلاش گردید تا زمینه لازم برای تولید این پروتئین در گیاهان و به ویژه در ارگانل های کلروپلاست فراهم گردد. برای این منظور، ابتدا RNAهای کل از سلول های کشت شده ی انسانی استخراج شده و از روی آن cDNA تهیه گردید. سپس قطعه cDNAی مربوط به ژن *IGF-1* با استفاده از یک جفت پرایمر اختصاصی تکثیر و در وکتور pGBKT7 کلون گردید. پس از تعیین توالی قطعات کلون شده و تطبیق آنها با توالی ثبت شده، یکی از توالی های کاملا منطبق برای ادامه ی کار در وکتور پایه ی pMCS5 کلون گردید. با توجه به مزایای بسیار زیادی که انتقال ژن به کلروپلاست نسبت به انتقال ژن به هسته دارد، ژن کلون شده در دو مرحله در وکتورهای اختصاصی انتقال ژن به کلروپلاست توتون کلون گردید. برای این منظور ابتدا ژن *IGF-1* با استفاده از سایت های برشی *Nde*I و *Xba*I در وکتور pHK20 و در بین یک پروموتر و ترمیناتور کلروپلاستی که از قبل در وکتور جاسازی شده بودند، کلون گردید. در نهایت ژن کلون شده به همراه پروموتر و ترمیناتور و با استفاده از سایت های برشی *Sac*I و *Hin*dIII در وکتور کلروپلاستی pRB94 که حامل ژن انتخابگر aadA برای گزینش گیاهان تراریخته می باشد، کلون گردید. با توجه به تشابه بسیار زیاد توالی ژنوم کلروپلاستی توتون و کاهو، و با توجه به نتایج حاصل از مطالعه ی قبلی، می توان پیش بینی کرد که این وکتور برای انتقال و تولید این پروتئین در کلروپلاست گیاه خوراکی کاهو (جهت تولید پروتئین خوراکی بدون نیاز به مراحل استخراج و خالص سازی و تجویز مستقیم بافت گیاهی به عنوان دارو)، امکان پذیر خواهد بود.

کلمات کلیدی: پروتئین های نوترکیب، کلروپلاست، IGF-1، cDNA.

فصل اول

مقدمه

۱ مقدمه

۱-۱ تولید داروهای زیستی در گیاهان

تعدادی از اختلالات انسانی می توانند ریشه در فقدان یا صحیح عمل نکردن یک پروتئین که به طور طبیعی در بدن ساخته می شود داشته باشند. اغلب این اختلالات را می توان از طریق تجویز پروتئین عملکردی به بیمار معالجه نمود. این عمل زمانی امکانپذیر است که پروتئین مورد نظر به مقدار نسبتا زیادی در دسترس باشد. اگر کمبود فقط با استفاده از پروتئین انسانی برطرف شود، در این صورت تامین مقادیر کافی، یک مشکل اساسی خواهد بود، مگر اینکه بتوان از خونهای اهدایی استفاده کرد. در مواردی که پروتئین حیوانی موثر باشد، تولید مقادیر مورد نیاز ساده تر خواهد بود. با این حال تنها تعداد کمی از اختلالات را می توان با تجویز پروتئین های حیوانی تیمار کرد، و از طرفی همیشه امکان بروز اثرات جانبی از قبیل آلرژی وجود دارد.

استفاده از گیاهان به منظور درمان بیماریهای انسان به هزاران سال پیش بر می گردد. اما اخیراً تولید گیاهان تراریخته، باعث شده از گیاهان برای درمان بیماریهایی استفاده شود که تا پیش از این به وسیله داروهای شیمیایی یا مواد زیستی بدست آمده از حیوانات یا میکروارگانیسم ها درمان می شدند. از آنجائیکه هزینه ی بالای داروهای زیستی بدست آمده از سیستم های کشت سلول های حیوانی یا میکروارگانیسم ها فراوانی آنها را محدود می کند، بنابراین توسعه سیستمی که بتواند این داروها را با قیمت و فراوانی مناسب در اختیار مصرف

کنندگان قرار دهد، امری ضروری می باشد [۱].

اولین تغییر ژنتیکی محصولات گیاهی در سال ۱۹۹۶ در آمریکا روی ذرت و سویا صورت گرفت. از آن زمان، تعداد زیادی گیاهان تراریخت در بسیاری از کشورهای مختلف بصورت تجاری درآمده اند. گیاهان به عنوان ایمن ترین و کارآمدترین سیستم برای تولید پروتئین هایی که در زمینه صنعتی، دارویی، دامپزشکی و کشاورزی استفاده می شوند، شناخته شده اند. پروتئین های حاصل از گیاه باید از لحاظ بیولوژیکی مشابه نسخه های طبیعی بوده و به مقدار کافی تولید شوند تا خالص سازی آنها با روش های ساده امکانپذیر باشد. این واقعیت که تولید واکسن ها و سایر داروهای زیستی در گیاهان با سرعت بالا و هزینه کم، بدون وجود نگرانی های ناشی از آلودگی های بیولوژیکی که در سیستم کشت سلولهای حیوانی وجود دارد، صورت می گیرد، باعث افزایش کاربردهای آن در داروسازی شده است [۱, ۲].

امکان تولید پروتئین های دارویی در گیاهان، در کشورهای در حال توسعه که مشکل هزینه و کمبود تجهیزات ساخت و نگهداری واکسن را دارند، یک فرصت بسیار مناسب است. از جمله مزایایی که تولید پروتئینها در گیاهان نسبت به سایر سیستم های تولید پروتئین دارند عبارتند از:

- تغییرات پس از ترجمه که سلولهای پروکایوتی فاقد امکانات لازم برای این تغییرات هستند
- کاهش هزینه تولید نسبت به سیستم های صنعتی
- تولید به میزان زیاد با استفاده از سیستم های کشاورزی
- حذف تجهیزات مربوط به خالص سازی پروتئین ها وقتی پروتئین نوترکیب در بافت های خوراکی گیاه تولید و به عنوان غذا استفاده شود
- امکان انتقال پروتئین ها به اندامک های درون سلولی جهت افزایش پایداری و حتی بیان مستقیم در برخی اندامک ها از قبیل کلروپلاست
- کاهش هزینه های انبارداری و حمل و نقل پروتئین های نوترکیب
- امکان استفاده از روش های به نژادی و تلاقی های جنسی جهت تولید پروتئین های چند زنجیره ای فعال

- به حداقل رسیدن خطر سلامت انسان در اثر آلودگی به پاتوژن های انسانی [۳, ٤].

از آنجا که پروتئین های خارجی که در گیاهان بیان می شوند ساختار اصلی خود را حفظ می کنند، می تـوان از گیاهان تراریخت برای تولید پروتئین هـا و پپتیـدهایی بـا ارزش دارویـی از قبیـل آنتـی بادیهـا، واکسـن هـا و هورمونهای پستانداران استفاده کرد [٤, ٥]. استفاده از پروتئینهای انسانی نوترکیب تحول بزرگـی در اسـتفاده از پروتئین های دارویی در پزشکی بالینی ایجاد کرده است. فروش جهانی پروتئین های داروئی نوترکیب در سـال ۲۰۰۵ در حدود ١٦ میلیارد دلار تخمین زده می شود. تعداد زیادی از پروتئین های انسانی از قبیل پروتئین های سرم خون، سیتوکین ها، آنزیمهای لیزوزومی، آنتی بادیها، واکسن ها و سایر پروتئین های دارای خواص دارویی را می توان در گیاهان ترانس ژنیک تولید کرد. آزمایشهای پزشکی نشان می دهند که پروتئین های تولیـد شـده در گیاهان از نظر فعالیت های زیست شناختی و ساختمانی با پروتئین های مشـابه کـه از سیسـتم هـای کشـت سلولهای انسانی و حیوانی بدست آمده اند، قابل مقایسه می باشند [٥].

۱-۲ داروهای زیستی تولید شده در گیاهان

گیاهان قابلیت تولیدآنتی ژن های نوترکیب باکتریایی و ویروسی را دارند که در آنها توانایی تشکیل ساختارهای نوع چهارم همانند آنچه در سیستم پستانداران دیده می شود، حفظ شده و تغییرات پس از ترجمه نیز در جهت حفظ فعالیت بیولوژیکی پروتئین انجام می شود. در این میان، تولید واکسن ها در بافتهای خوراکی گیاهان تراریخت از اهمیت بیشتری برخوردار است که می تواند روشی بسیار ایمن و موثر در واکسیناسیون باشد. داروهای زیستی تولید شده در گیاهان را می توان به سه گروه عمده زیر تقسیم بندی کرد:

۱. آنتی ژن برای تولید واکسن های خوراکی: پروتئین های آنتی ژنی از پاتوژن هـای مختلـف در گیاهـان بیان شده اند و برای ایجاد پاسخ ایمنی استفاده می شوند که نتیجه آن مصونیت در برابر بیماری هـا در انسان می باشد. از واکسن های گیاهی که تا کنون تولید شده اند، می توان واکسنهای ویـروس هـاری، هپاتیت B، روتاویروس، ایدز و تعدادی دیگر از پاتوژن ها را نام برد. واکسن های خوراکی معمـولا بـه واکسن های تولید شده در گیاه اطلاق می شوند، که در آن یک محصول دارویی از بافت هـای گیـاهی پرورش یافته در شرایط کنترل شده بدست می آید. در این سیستم، گیاهان علاوه بر دارا بـودن قابلیـت

تولید آنتی ژن های نوترکیب باکتریایی و ویروسی، تغییرات پس از ترجمه را نیز برای حفظ فعالیت بیولوژیکی و تشکیل ساختار چهارم پروتئین، همانند آنچه در سیستم پستانداران دیده می شود، بطور صحیح انجام می دهد [٦, ٧].

۲. آنتی بادیهای مونوکلونال: کاربرد وسیع آنتی بادیها در درمان بیماریها، منجر به مطالعه روشهای جدید در جهت افزایش کارآیی و کاهش هزینه تولید آنتی بادیها گردید. در میان روشهای مطالعه شده، استفاده از گیاهان تراریخته بعنوان رآکتورهای زیستی، مناسب ترین روش برای تولید آنتی بادیها شناخته شده است. از آنتی بادیهای تولید شده در گیاهان می توان به مولکول های کامل IgG و IgA، مولکولهای شیمرIgA و IgG، مولکول های ترشحیIgG و IgA، قطعات زنجیره منفرد Fv (scFv)، و قطعات Fab اشاره کرد [٦, ٧].

۳. پروتئین های دارویی: از نمونه داروهای زیستی که اخیرا در گیاهان بیان شده اند، می توان به انسولین، فاکتور رشد شبه انسولین، اریتروپویتین، اینترفرون، هیرودین، آپروتینین، لئوانکفالین و سوماتوتروپین اشاره کرد [٨, ٩]. از این میان، فاکتور رشد شبه انسولین انسانی نقش حیاتی در تمایز سلولی، تکثیر، رشد و آپوپتوزیس دارد. همچنین این پروتئین به عنوان یک عامل درمانی برای دیابت شیرین می باشد و بویژه برای درمان بیمارانی که در گیرنده های انسولین نقص دارند، استفاده می شود [١٢, ١٣].

۱-۳ فاکتورهای رشد شبه انسولین در انسان

خانواده ی مولکول های انسولین که عملکرد های متنوعی دارند، شامل خود انسولین[۱]، فاکتورهای رشد شبه انسولین[۲] (IGFs)، ریلاکسین[۳]، بومبیکسین[٤] بی مهرگان و پپتیدهای شبه انسولین نرم تنان می باشد [١٤]. ریلاکسین توسط تخمدان سنتز می شود و باعث تغییر وضع مجرای تناسلی جنس مونث در زمان قبل از تولد

[۱] Insulin

[۲] Insulin-like Growth Factors

[۳] Relaxin

[٤] Bombyxin

می شود. فاکتورهای رشد شبه انسولین امروزه فقط در پستانداران مشاهده می شوند، انسولین احتمالا تنها در مهره داران وجود دارد و ریلاکسین از ماهی ها و پستانداران استخراج شده است [۱۵].

مقایسه ی شباهت توالی آمینواسیدی بین اعضای خانواده ی انسولین نشان می دهد، که خطی شامل انسولین اولیه هست، که انسولین و ریلاکسین از آن انشعاب می یابد و سپس *IGF*ها از لاین انسولین منشعب می شوند. ژن انسولین دارای ۳ اگزون می باشد، اما ژنهای *IGF* ۳ اگزون دیگر نیز دارند که ترمینال COOH و قطعه ی پیشرو (هدایت کننده) را کد می کنند، که بعدا از لاین انسولین منشعب شده اند. به علاوه، چون شباهت زیادی بین برخی از اگزونهای IGFها، از قبیل اگزون ٤ و ٥ ژنهای *IGF-1* و *IGF-2*، وجود ندارد، بنابراین ممکن است این اگزون ها به صورت مستقل به وجود آمده باشند. به علت شباهت ٤٧ درصدی *IGF-1* و *IGF-2* با انسولین، ممکن است این ژنها در یک زمان ایجاد شده باشند. با این حال، ژن *IGF-1* روی کروموزوم مجزایی قرار گرفته است، در حالیکه ژن *IGF-2* روی همان کروموزوم و در نزدیکی ژن انسولین قرار دارد [۱۵].

داستان کشف انسولین که سالانه جان بسیاری از بیماران را از مرگ نجات می‌دهد کاملا اتفاقی آغاز شد. در اوایل قرن بیستم میلادی، نظریه بنیادین علت ابتلا به بیماری دیابت مطرح شد. محققان در نتیجه بررسی‌های خود متوجه شدند که بیماران دیابتی دچار کمبود ماده‌ای هستند که توسط یک لوزالمعده سالم ساخته می‌شود. در سال ۱۹۰۸ میلادی Georg Zolzer از دانشمندان و محققان آلمانی برای نخستین بار نشان داد که با تزریق عصاره لوزالمعده می‌توان شدت گلوکز وارد شده در ادرار افراد مبتلا به بیماری دیابت را کاهش داد. سرانجام در سال ۱۹۲۱ دانشمندان موفق شدند پروتئین انسولین را از عصاره ی جداسازی شده از جزایر لانگرهانس استخراج کنند که با تزریق این پروتئین به یک کودک ١٤ ساله، نام این کودک به عنوان نخستین بیمار مبتلا به دیابت که از طریق تزریق انسولین مداوا شده بود به ثبت رسید. Benting و همکارانش به خاطر این کشف بزرگ که نویدبخش دستیابی به روشی برای درمان دیابت بود جایزه نوبل پزشکی سال ۱۹۲۳ میلادی را از آن خود کردند. انسولین نخستین پروتئینی بود که (i) خواص هورمونی آن شناخته شد، (ii) به صورت کاملا خالص و متبلور تهیه شد، (iii) نوع و ردیف اسیدهای آمینه آن تعیین گردید و (iv) از راه مصنوعی سنتز شد. همچنین، با توجه به اهمیت فوق العاده ی آن، انسولین اولین پروتئینی بود که به کمک تکنولوژی DNAی

نوترکیب در سطوح تجاری تولید شد [۱۶].

فاکتورهای رشد شبه انسولین ۱ و ۲ در سال ۱۹۵۷ توسط Salmon و Daughoday شناسایی شدند و به علت توانایی در تحریک الحاق سولفات به غضروف موش صحرایی به عنوان فاکتور سولفاسیون شناخته شدند. پس از آن، Foresch و همکاران فعالیت شبه انسولینی غیر قابل مهار (NSILA[1]) این دو ترکیب را در محلول سرم کشف، و بنابراین آنها را NSILA ۱ و ۲ نامگذاری کردند. در سال ۱۹۷۲ واژه ی سوماتومدین جایگزین اصطلاح فاکتور سولفاسیون و NSILA شد، که تحت کنترل مواد غذایی و اثرات غیر مستقیم فاکتورهای رشد نیز بودند. در سال ۱۹۷۶ Rinderknecht و Humbel این دو ماده ی فعال را از سرم انسانی جدا کردند، که به علت شباهت ساختاری به پروانسولین، فاکتور رشد شبه انسولین ۱ و ۲ نامگذاری شدند [۱۷].

فاکتور رشد شبه انسولین توسط اکثر بافت ها سنتز می شود و در رشد، تمایز و تغییر سلولها نقش اساسی دارد. به علت اثرات بیولوژیکی گسترده ی ناشی از اختلال در این فاکتور و پتانسیل متنوع در درمان کلینیکی این اختلالات، تعداد زیادی از محققان، تحقیقات خود را در زمینه ی IGF ها متمرکز کرده اند [۱۴, ۱۸].

۱-٤ خصوصیات انسولین و فاکتورهای رشد شبه انسولین انسانی

۱-٤-۱ ساختار ژنی

DNA های کد کننده ی ژن انسولین (INS) و فاکتورهای رشد شبه انسولین انسانی، شامل IGF-1 و IGF-2، جداسازی و توالی یابی شده اند، که هر کدام توسط یک ژن کد می شوند. ژن *IGF-1* روی کروموزوم ۱۲ و ژنهای *INS* و *IGF-2* روی کروموزوم شماره ۱۱ قرار دارند. ژن های *INS* و *IGF-2* همجوار هستند وانتهای ´۵ ژن *IGF-2* در حدود Kbp ۱۲ از انتهای ´۳ ژن انسولین فاصله دارد [۱۵, ۱۹].

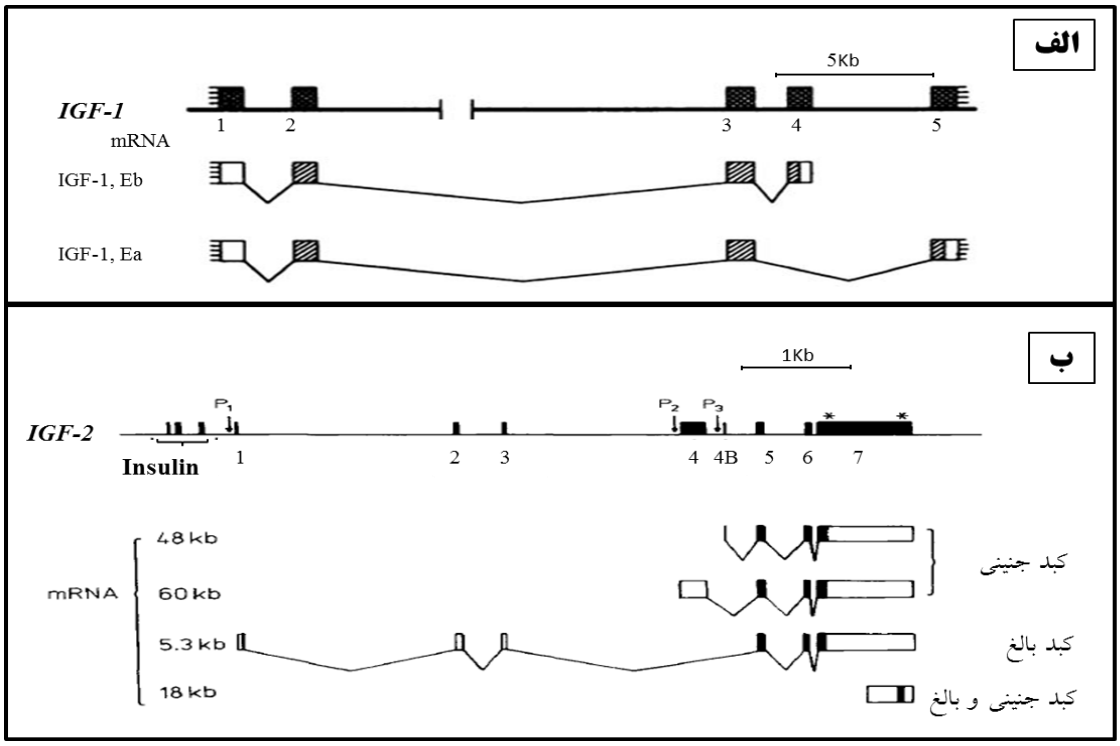
ژن *IGF-1* انسانی شامل ٦ اگزون می باشد، و حداقل Kbp ۹۰ طول دارد. محققی بنام Rotwein نشان داد که از

[1] Non Suppressible Insulin Like Activity

این ژن دو نوع mRNA متفاوت رونویسی می شوند (واریانت های Ea و Eb، شکل ۱-۱-الف). اگزون ٤ برای رونویسی C-ترمینال واریانت Eb استفاده می شود، در حالیکه ناحیه C-ترمینال واریانت Ea از روی اگزون ٥ رونویسی می شود. ترجمه این رونوشتها حداقل از دو جایگاه شروع می شود، که روی اگزون ۱ و ۲ قرار دارند. محصول ترجمه، IGF پیش ساخته می باشد که شامل سیگنال پپتید، ٤ ناحیه ی ایجاد کننده ی فاکتور رشد ۷۰ آمینواسیدی شامل A، B، C وD، و ناحیه ی C-ترمینال (پپتید E، شامل ۳۵ آمینواسید در واریانت Ea و ۷۷ آمینواسید در واریانت Eb) می باشد. اگزون ۱ و رونوشت های شامل Ea در همه جا بیان می شوند، در حالیکه اگزون ۲ و رونوشت های Eb بیشتر و به صورت تخصصی در کبد بیان می شوند [۱۹].

در انسان استفاده از اگزون های ٤ و ٥ در کنار هم غیر ممکن است، در حالیکه در موش و موش صحرایی، هر دو اگزون ٤ و ٥ در یک mRNA وجود دارند. بیان دو mRNA ی Ea و Eb در موش و موش صحرایی به علت درج یک مینی اگزون bp ۵۲ در Eb، باعث کنار هم قرار گرفتن این دو اگزون می شود. بنابراین توالی C-ترمینال Eb موش و موش صحرایی کاملا متفاوت با پپتید Eb انسانی است [۱۸, ۱۹].

ژن *IGF-2* انسانی حدود Kbp ۳۰ است که شامل سه پروموتر، ٥ اگزون کد نشونده (اگزونهای ٤-۱و 4B) و سه اگزون کد کننده ی پروتئین می باشد (شکل ۱-۱-ب). آخرین اگزون نیز شامل یک ناحیه ی ترجمه نشونده در انتهای ′۳ به طول Kbp ۳/۸ می باشد. *IGF-2* پیش ساخته شامل یک سیگنال پپتید ۲٤ آمینواسیدی، ٦۷ آمینواسید فاکتور رشد و یک پپتید بزرگ ۸۹ آمینواسیدی بنام E می باشد. Gray و همکاران و همچنین Iminger و همکاران کشف کردند که انتهای ′٥ cDNAهای *IGF-2* جداسازی شده از کبد بالغ کاملا متفاوت از بافت های دیگر می باشند. باید به این موضوع توجه کرد که رونوشت های متنوع فقط در نواحی پپتید E یا نواحی غیر قابل ترجمه ی خود متفاوت هستند، و بنابراین همه ی کد های ناحیه های A، B، C و D مشابه بوده و در نهایت یک نوع پپتید تولید می شود [۱۷, ۱۹].



شکل ۱-۱: الف) نقشه ی ژن ***IGF-1*** انسانی و mRNA های مربوط به آن. در mRNA ها نواحی کدکننده به صورت جعبه های هاشور دار مشخص شده اند. **ب)** نقشه ی ژن ***IGF-2*** انسانی و mRNA های آن. در mRNA ها نواحی مشکی، توالیهای کد کننده را نشان می دهند.

ژن انسولین (*INS*) نیز دارای ۳ اگزون است: اگزون ۱ ناحیه ی غیر ترجمه شونده ی ´۵ را کد می کند، اگـزون ۲ پپتید نشانه، رشته ی B و قسمتی از رشته ی C را کد می کند،و اگزون ۳ باقی مانده ی رشته ی C و رشته ی A و ناحیه ی غیر ترجمه شونده ی ´۳ را کد می کند [۲۰].

۱-٤-۲ ساختار پروتئینی

۱-٤-۲-۱ توالی اسید آمینه ای

انسولین انسانی با وزن مولکولی ۵/۸ KDa در پانکراس به عنوان پروهورمون پلی پپتیدی تک رشـته ای تحـت عنوان پروانسولین سنتز می شود، که شامل ۸۲ اسید آمینه و ۳ پل دی سولفیدی می باشد. پروانسولین دارای سه ناحیه B (انتهای آمین)، C (ناحیه مرکزی) و A (انتهای کربوکسیلی) می باشد. پس از انتقـال ایـن مولکـول بـه

داخل دستگاه گلژی، پروانسولین تحت تاثیر آنزیم های پروتئاز تجزیه شده، پپتید C آزاد، و هورمون فعال انسولین تشکیل می شود. بنابراین پس از خارج شدن پپتید C، انسولین شامل دو رشته ی A و B می باشد، که به ترتیب شامل ۲۱ و ۳۰ اسید آمینه هستند، که در انسولین جدا شده از اغلب گونه های حیوانی ثابت می باشند. این دو زنجیره به کمک دو پل دی سولفیدی، یکی بین اسید آمینه های شماره ی ۷ از دو زنجیره و دیگری میان اسید آمینه های شماره ی ۲۰ از زنجیره ی A و شماره ی ۱۹ از زنجیره ی B با یکدیگر اتصال دارند. علاوه بر این، اسید آمینه های ردیف ٦ و ۱۱ در داخل زنجیره ی A نیز به وسیله ی پیوند دی سولفیدی به یکدیگر متصل می شوند. لازم به ذکر است که جایگاه این پیوندها در گونه های مختلف ثابت می باشد [١٤].

فاکتور رشد شبه انسولین ۱ و ۲، پلی پپتیدهای تک رشته ای با اندازه ی ۷/۵ KDa هستند، که شامل ٤ ناحیه می باشند (شکل ۲-۱):

- نواحی A و B که از لحاظ ساختاری با رشته های A و B انسولین همولوگ هستند و به ترتیب ۲۱ و ۲۹ اسید آمینه دارند.
- ناحیه ی C که آنالوگ پپتید اتصالی C در پروانسولین است و دارای ۱۲ اسید آمینه می باشد. این توالی اگرچه به صورت قابل ملاحظه ای کوتاهتر از ناحیه ی C پروانسولین است، اما برخلاف انسولین گسستگی پروتئولیتیکی پپتید C اتفاق نمی افتد.
- ناحیه ی D. در فاکتورهای رشد شبه انسولین، رشته ی A توسط ۸ اسید آمینه توسعه می یابد که این قسمت از مولکول، ناحیه ی D نامیده می شود [١٤, ١٨, ١٩].

اولین بار توالی اسید آمینه ای فاکتورهای رشد شبه انسولین ۱ و ۲ در سال ۱۹۷۸ از پپتید های جداسازی شده از سرم انسانی تعیین شد. امروزه روش های جداسازی بسیار کارآمدتری توسعه یافته اند و توالی اسید آمینه ای IGFهای چندین گونه از جمله گاو، خوک، گوسفند، موش صحرایی، موش و ... تعیین شده اند. در همه ی گونه ها IGF-1 و IGF-2 به ترتیب شامل ۷۰ و ٦٧ اسید آمینه بودند [۱۹].