دانشکده علوم زیستی

رساله دوره دکتری تخصصی رشته بیوشیمی

عنوان:

استفاده از فناوری Antisense RNA در بهینه‌سازی بیان اینترفرونβ نوترکیب در باکتری*E. coli*

نگارش:

ناهید بختیاری

اساتید راهنما:

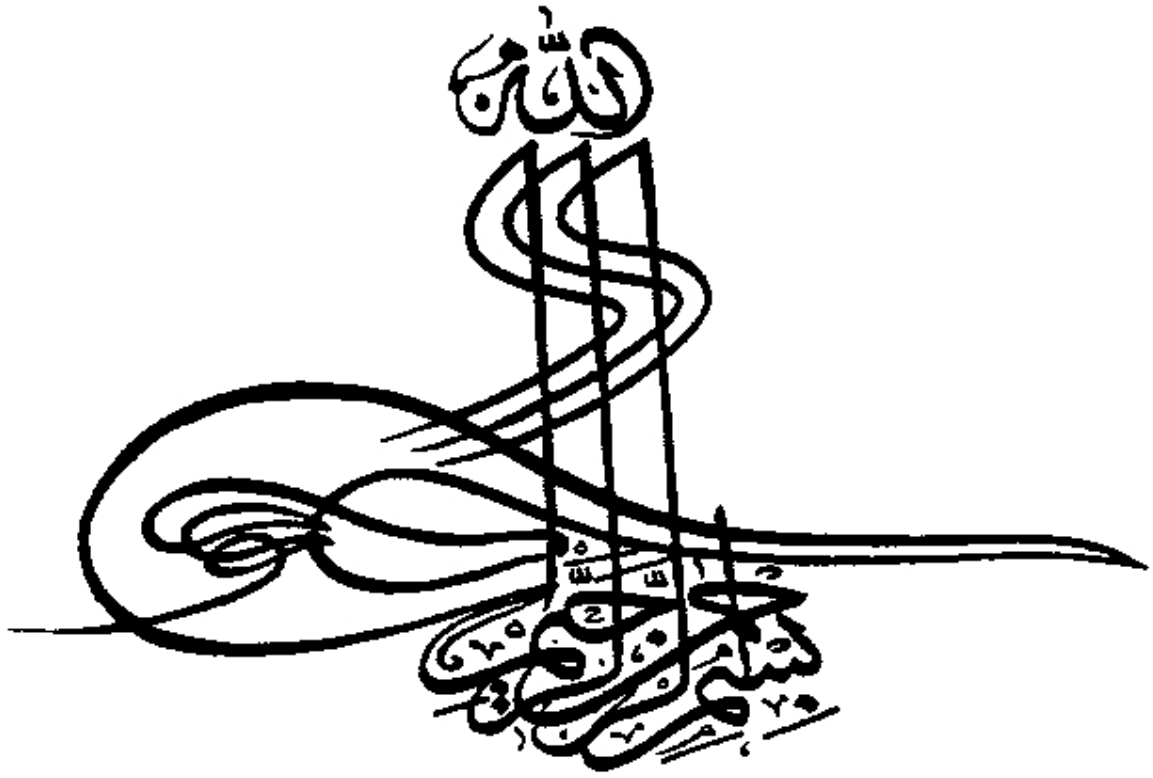
دکتر منوچهر میرشاهی

دکتر نادر مقصودی

استاد مشاور:

دکتر ولی‌الله بابایی‌پور

تیر ماه ۱۳۸۹


بسم الله الرحمن الرحيم

چکیده

یکی از مشکلات استفاده از باکتری *اشرشیاکلی* برای تولید انبوه پروتئین نوترکیب، ترشح استات در محیط کشت است که سبب کاهش طول عمر باکتری و به دنبال آن کاهش بیان پروتئین نوترکیب می‌شود. در این رساله ما از فناوری RNAی آنتی‌سنس به عنوان ابزاری سودمند در مهندسی متابولیک برای مهار جزئی بیان ژن‌های مربوط به دو آنزیم اصلی مسیر استات، یعنی فسفوترانس-استیلاز (PTA) و استات‌کیناز (ACK)، استفاده کردیم. یک پلاسمید نوترکیب که حاوی ژن‌های آنتی‌سنسی است که هر دو ژن *ackA* و *pta* را مورد هدف قرار می‌دهد، ساخته شد و اثرات آن بر مسیر استات و تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* Bl21 (DE3) دارای کاست آنتی-سنس و فاقد آن مورد مطالعه و مقایسه قرار گرفت. اینترفرون بتای نوترکیب به عنوان پروتئین مرجع انتخاب شده و بیان ژن‌های آنتی سنس با استفاده از پروموتر قوی T7 و پروموتر طبیعی ژن *ackA* که پروموتری ضعیف می‌باشد، کنترل شد. در طی این پژوهش ما دریافتیم که کاست آنتی-سنس، تحت بیان پروموتر طبیعی ژن *ackA*، سطح mRNAی ژن‌های مورد هدف را به طور جزئی کاهش داده و باعث کاهش ترشح استات در محیط کشت می‌شود. آنچه مورد توجه می‌باشد این است که در این حالت، با این که میزان کاهش استات چشمگیر نبود، میزان بیان اینترفرون بتا در باکتری دارای کاست نسبت به گونه‌ی کنترل ۴/۲-۳/۶ برابر افزایش نشان می‌داد. در صورتی که وقتی میزان استات تحت تاثیر پروموتر قوی T7 کاهش قابل توجه از خود نشان می‌داد، باکتری‌ها سریعتر دچار مرگ می‌شدند. این موضوع نشان می‌دهد که نسبت به آنچه در گزارش‌های قبلی وجود دارد، مسیر استات دارای اثرات حیاتی‌تری در فیزیولوژی سلولی می‌باشد. وقتی آزمایش‌ها تحت تنظیم پروموتر طبیعی ژن *ackA* در محیط کشت با مقیاس بالاتر انجام شد، افزایش رشد و طول عمر باکتری هم بیشتر شده و این نتایج بیانگر این است که، این فناوری می‌تواند با موفقیت در مقیاس صنعتی تولید پروتئین نوترکیب در باکتری *اشرشیاکلی* هم به کار گرفته و ارزیابی شود.

کلمات کلیدی: فناوری آنتی‌سنس، استات، پروتئین نوترکیب، اینترفرون بتا، *اشرشیاکلی*

فهرست صفحه

فصل اول: مقدمه

۱-۱. تاریخچه‌ی داروهای نوترکیب..... ۱

۱-۲. اینترفرون‌ها: گزینه‌ای برای تولید پروتئین نوترکیب جهت مصارف درمانی..... ۴

۱-۲-۱. اینترفرونβ..... ۶

۱-۳. باکتری *اشرشیاکلی*: میزبانی برای تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب..... ۱۰

۱-۳-۱. استات به عنوان یک مساله مشکل آفرین در تولید انبوه پروتئین نوترکیب توسط *اشرشیاکلی* ۱۰

۱-۳-۲. چرا سلول‌های باکتری استات ترشح می کنند؟..... ۱۱

۱-۳-۲-۱. چرا چرخه‌ی تری‌کربوکسیلیک‌اسید به طور کامل انجام نمی‌شود؟ ۱۲

۱-۳-۲-۲. لزوم تولید استات برای چرخش دوباره‌ی کوآنزیم A..... ۱۵

۱-۳-۲-۳. لزوم تولید استات برای تولید دوباره‌ی NAD^+ ۱۶

۱-۳-۳. مسیر های ترشح استات ۱۸

۱-۳-۴. فعال‌سازی استات توسط مسیر استات‌کیناز- فسفوترانس‌استیلاز..... ۲۱

۱-۳-۴-۱. فنوتیپ‌های دارای جهش در ژن‌های *ackA* و *pta*..... ۲۲

۱-۳-۴-۲. پروفایل بیان باکتری‌های دارای جهش در ژن‌های *ackA* و *pta*..... ۲۴

۱-۳-۵. بیان و فعالیت مسیر *pta-ackA* ۳۰

۱-۴. روش‌های مورد استفاده برای جلوگیری از اثر منفی تجمع استات در فرمانتور ۳۱

۱-۵. فناوری RNAی آنتی‌سنس..... ۳۳

فصل دوم: مواد و روش‌ها

۲-۱. مواد مورد استفاده ۳۷

۲-۱-۱. مواد شیمیایی و بیولوژیک..... ۳۷

۲-۱-۲. گونه‌های باکتریایی ۳۸
۲-۲. روش‌های مورد استفاده..... ۳۹
۲-۲-۱. واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز (PCR)..... ۳۹
۲-۲-۱-۱. واکنش PCR جهت جداسازی ژن‌ها ۳۹
۲-۲-۱-۲. واکنش PCR جهت جداسازی قطعات آنتی‌سنس..... ۴۱
۲-۲-۲. استخراج DNA از ژل..... ۴۲
۲-۲-۳. هضم آنزیمی دوگانه..... ۴۲
۲-۲-۴. تعیین غلظت DNA..... ۴۳
۲-۲-۵. واکنش الحاق..... ۴۶
۲-۲-۶. تهیه میزبان باکتریایی مستعد و انتقال محصول الحاق به آن..... ۴۷
۲-۲-۷. استخراج پلاسمید از باکتری به روش لیز قلیایی با SDS ۴۸
۲-۲-۸. تعیین توالی قطعه الحاق شده در پلاسمید ۵۰
۲-۲-۹. واکنش زنجیره‌ی پلی‌مراز با استفاده از ترانس‌کریپتاز معکوس (RT-PCR)..... ۵۱
۲-۲-۹-۱. استخراج RNA از باکتری گرم منفی..... ۵۱
۲-۲-۹-۲. حذف آلودگی DNA از RNAی جداسازی شده از باکتری..... ۵۲
۲-۲-۹-۳. سنجش غلظت RNAی جداسازی شده..... ۵۲
۲-۲-۹-۴. تهیه cDNA از RNAی جداسازی شده..... ۵۲
۲-۲-۹-۵. انجام واکنش PCR بر روی cDNA تهیه شده..... ۵۳
۲-۲-۹-۶. سنجش غلظت باندهای مشاهده شده در ژل آگارز..... ۵۴
۲-۲-۱۰. اندازه‌گیری فعالیت ویژه‌ی آنزیم استات‌کیناز (ACK) و فسفوترانس‌استیلاز (PTA) ۵۴
۲-۲-۱۱. اندازه‌گیری تراکم نوری باکتری در بازه‌ی زمانی مورد نظر در فلاسک..... ۵۷

۲-۲-۱۲. اندازه‌گیری غلظت گلوکز در محیط کشت فلاسک ۵۸
۲-۲-۱۳. اندازه‌گیری غلظت استات در محیط کشت فلاسک ۵۸
۲-۲-۱۴. اندازه‌گیری تراکم نوری باکتری، غلظت گلوکز و غلظت استات در بازه‌ی زمانی مورد نظر در محیط کشت فلاسک و حضور IPTG ۵۸
۲-۲-۱۵. اندازه‌گیری تراکم نوری باکتری، غلظت گلوکز و غلظت استات در بازه‌ی زمانی مورد نظر در فرمانتور (با کشت غیرمداوم) ۵۸
۲-۲-۱۶. ایجاد یک جهش منفرد در پروموتر T7 در پلاسمید دارای کاست آنتی‌سنس ۵۹
۲-۲-۱۷. انتقال دو پلاسمید مختلف به یک باکتری ۵۹
۲-۲-۱۸. اندازه‌گیری تراکم نوری باکتری دارای اینترفرون بتا، غلظت گلوکز و غلظت استات در بازه‌ی زمانی مورد نظر در محیط کشت فلاسک ۶۰
۲-۲-۱۹. بررسی نحوه‌ی بیان اینترفرون بتا در باکتری دارای کاست آنتی‌سنس و فاقد آن در ژل SDS-PAGE ۶۲
۲-۲-۲۰. تایید باندهای مربوط به اینترفرون بتا با وسترن‌بلاتینگ ۶۲
۲-۲-۲۱. دانسیتومتری باندهای ظاهر شده در وسترن بلاتینگ ۶۴

فصل سوم: نتایج

۳-۱. تصویر ژل الکتروفورز پلاسمید pBluscript/ sk^+ ۶۵
۳-۲. تصویر ژل الکتروفورز ژن‌های *ackA* و *pta* حاصل از واکنش PCR ۶۶
۳-۳. تصویر ژل الکتروفورز *PackA* حاصل از واکنش PCR ۶۶
۳-۴. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *PackA* استخراج شده از ژل ۶۷
۳-۵. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *as-ackA* حاصل از واکنش PCR ۶۸
۳-۶. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *as-ackA* استخراج شده از ژل ۶۸
۳-۷. تصویر ژل الکتروفورز قطعه term حاصل از واکنش PCR ۶۹

۳-۸. تصویر ژل الکتروفورز قطعه term استخراج شده از ژل ۶۹
۳-۹. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *Ppta* حاصل از واکنش PCR ۷۰
۳-۱۰. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *Ppta* استخراج شده از ژل ۷۰
۳-۱۱. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *as-pta* حاصل از واکنش PCR ۷۱
۳-۱۲. تصویر ژل الکتروفورز قطعه *as-pta* استخراج شده از ژل ۷۱
۳-۱۳. تصویر ژل الکتروفورز قطعه term حاصل از واکنش PCR ۷۲
۳-۱۴. تصویر ژل الکتروفور قطعه term استخراج شده از ژل..... ۷۲
۳-۱۵. تصویر ژل الکتروفورز قطعات هضم‌شده *PackA* و *Ppta* به همراه پلاسمید pBluescript/ sk^+..... ۷۳
۳-۱۶. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای کلون شده با *PackA* و *Ppta* ۷۴
۳-۱۷. تصویر ژل الکتروفورز قطعات هضم‌شده *as-ackA* و *as-pta* به همراه پلاسمید pRAN101 و pRAN104..... ۷۵
۳-۱۸. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای کلون شده با *as-ackA* و *as-pta* ۷۶
۳-۱۹. تصویر ژل الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های انتخابی..... ۷۷
۳-۲۰. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای کلون شده با term ۷۸
۳-۲۱. تصویر ژل الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از کلون‌های انتخابی..... ۷۸
۳-۲۲. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای pRAN103 کلون شده با *Ppta+as-pta+term* ... ۷۹
۳-۲۳. تصویر ژل الکتروفورز پلاسمیدهای استخراج شده از باکتری‌های کلون شده با کاست کامل آنتی-سنس..... ۸۰
۳-۲۴. تصویر ژل الکتروفورز هضم دوگانه پلاسمیدهای pLT10T3 کلون شده با کاست کامل آنتی‌سنس.... ۸۱
۳-۲۵. آنالیزRT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی‌سنس در کاهش رونوشت ژن *ackA* ۸۳
۳-۲۶. آنالیزRT-PCR کمی برای مشاهده اثر کاست آنتی‌سنس در کاهش رونوشت ژن *pta* ۸۴
۳-۲۷. فعالیت ویژه آنزیم ACK در باکتری دارای کاست آنتی‌سنس و باکتری فاقد آن ۸۴

۳-۲۸. فعالیت ویژه آنزیم PTA در باکتری دارای کاست آنتی‌سنس و باکتری فاقد آن ۸۵
۳-۲۹. تغییرات منحنی رشد باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک)..... ۸۶
۳-۳۰. تغییرات غلظت گلوکز در محیط کشت باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک) ۸۶
۳-۳۱. تغییرات غلظت استات در محیط کشت باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک) ۸۷
۳-۳۲. تغییرات منحنی رشد باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس و IPTG (در فلاسک)... ۸۹
۳-۳۳. تغییرات غلظت گلوکز در محیط کشت باکتری(*E. co*li Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس و IPTG (در فلاسک)..... ۹۰
۳-۳۴. تغییرات غلظت استات در محیط کشت باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در اثر کاست آنتی‌سنس و IPTG (در فلاسک)..... ۹۱
۳-۳۵. تغییرات منحنی رشد باکتری(*E. coli* Bl21 (DE3 در کشت غیرمداوم در فرمانتور در اثر کاست آنتی‌سنس ۹۲
۳-۳۶.تغییرات غلظت گلوکز در محیط کشت غیرمداوم باکتری (*E. coli* Bl21 (DE3 در فرمانتور تحت تاثیر کاست آنتی سنس..... ۹۳
۳-۳۷. تغییرات غلظت استات در محیط کشت غیرمداوم باکتری (*E. coli* Bl21 (DE3 در فرمانتور تحت تاثیر کاست آنتی‌سنس..... ۹۴
۳-۳۸. تغییرات منحنی رشد باکتری (*E. coli* Bl21 (DE3 کلون شده با اینترفرون بتا در اثر کاست آنتی-سنس(در فلاسک)..... ۹۵
۳-۳۹. تغییرات غلظت گلوکز در محیط کشت باکتری (*E. coli* Bl21 (DE3 کلون شده با اینترفرون بتا در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک)..... ۹۶
۳-۴۰. تغییرات غلظت استات در محیط کشت باکتری (*E. coli* Bl21 (DE3 کلون شده با اینترفرون بتا در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک)..... ۹۷
۳-۴۱. بیان اینترفرون بتا در ژل SDS-PAGE، در حضور و عدم حضور کاست آنتی‌سنس ۹۸
۳-۴۲. تایید باندهای مربوط به اینترفرون بتا به وسیله‌ی وسترن‌بلاتینگ ۹۸

فصل چهارم: بحث

۴-۱. تغییرات منحنی رشد، مصرف گلوکز و تولید استات در باکتری *E.coli* Bl21(DE3) در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک) ۱۰۱

۴-۲. تغییر سطح رونوشت ژن‌های *ackA* و *pta* و میزان فعالیت آنزیم‌های کد شده از روی آنها در اثر کاست آنتی‌سنس ۱۰۲

۴-۳. تغییرات منحنی رشد، مصرف گلوکز و تولید استات در باکتری *E. coli* Bl21 (DE3) در اثر کاست آنتی‌سنس و IPTG (در فلاسک) ۱۰۳

۴-۴. تغییرات منحنی رشد، مصرف گلوکز و تولید استات در کشت غیرمداوم باکتری *E. coli* Bl21 (DE3) در اثر کاست آنتی‌سنس (در فرمانتور) ۱۰۳

۴-۵. تغییرات منحنی رشد، مصرف گلوکز و تولید استات باکتری *E. coli* Bl21 (DE3) کلون شده با اینترفرون بتا در اثر کاست آنتی‌سنس (در فلاسک) ۱۰۴

۴-۶. نوآوری‌های تحقیق ۱۰۵

۴-۷. پیشنهادات ۱۰۵

فهرست منابع ۱۰۷

فصل اول

مقدمه

۱-۱. تاریخچه‌ی داروهای نوترکیب

آنچه که امروز، به عنوان فن‌آوری زیستی یا بیوتکنولوژی در عرصه علوم کاربردی سربر-آورده است حاصل کارهای انجام گرفته در مورد تولید پروتئین از DNAی نوترکیب[۱] بوده و پیش-بینی می‌شود که در آینده به یکی از بخش‌های مهم در توسعه و تحقیقات تبدیل‌شود. در اوایل دهه ۱۹۷۰ شواهد موجود در زیست‌شناسی مولکولی و مهندسی ژنتیک منجر به پیشرفت قابل توجهی در توانایی تشخیص و فهم ریشه‌های مولکولی بیماری‌های انسانی شد. شخصی به نام پاول برگ[۲] که برنده جایزه نوبل شیمی درسال ۱۹۸۰می‌باشد، در سال۱۹۷۲ برای اولین بار موفق به تهیه DNAی نوترکیب در دانشگاه استنفورد شد. کار برگ به وسیله تیمی با رهبری هربرت بویر[۳] ازدانشگاه کالیفرنیا که توانست در سال ۱۹۷۳ سلول‌های *اشرشیاکلی*[۴] را با پلاسمید نوترکیب

---

[۱] rDNA

[۲] Paul Berg

[۳] Herbert Boyer

[۴] *E.coli*

ترانسفرم کند، ادامه پیدا کرده و بعداز آن فناوری مهندسی ژنتیک توسط کمپانی ژنن‌تک[1] در آمریکا بنیان‌گذاری شد. گروه بویر روش‌هایشان را تکمیل کرده، بهینه سازی نموده و با کمک شریک صاحب پروانه خود، شرکت الی‌لی‌لی[2]، اولین پروتئین نوترکیب انسانی به نام هومولین[3] را در سال ۱۹۸۲ تولید نمودند. حال پس از گذشت بیش از دو دهه تحقیقات و کارهای پیوسته و جهانی و شکل‌گیری بازار تجاری و تنوع فناوری، امروزه داروهای نوترکیب هسته‌ی صنعت بیوتکنولوژی دارویی را شامل بیش از ۳۲ میلیون دلار در سال ۲۰۰۳ تشکیل می‌دهند . حوزه‌ی مربوط به داروهای نوترکیب، شامل بیش از ۱۱۰ شرکت است که در کشف، تولید و بازاریابی این محصولات فعالیت می‌کنند. این شرکت‌ها بیش از ۸۰ دارو در مراحل مختلف تولید نموده و دارای سهام ترکیبی شامل ۷۳ داروی موجود در بازار می‌باشند (۵۴).

در دهه‌ی ۱۹۸۰، روش‌های جدیدی برای دست‌ورزی DNA به وجود آمد که سبب ایجاد فرصت‌های جدید برای تولید پروتئین‌های نوترکیب شد . پروتئین‌هایی که در دهه ۱۹۸۰ در کلینیک مورد مطالعه قرار گرفتند، آنهایی بودند که با فنون تولید موجود در آن زمان(مانند آنزیم-های محدودگر و دودمان‌های سلولی) قابل دستیابی بودند.

تا اواسط سال ۲۰۰۲ ، حدود ۱۲۰ فرآورده‌ی دارویی زیستی در آمریکا و اروپا وارد بازار شدند. اینها مجموعا دربرگیرنده‌ی یک بازار ۱۵بیلیون دلاری در سطح جهان می‌باشند. این داروها شامل تعدادی از هورمون‌ها ، فاکتورهای خونی و عوامل ترومبولیتیک مانند واکسن‌ها و آنتی‌بادی-

[1] Genentech

[2] Eli Iily

[3] Humulin

های منوکلونال هستند. تمام اینها به جز یکی، پایه‌ی پروتئینی دارند. مورد غیرپروتئینی وایتراون[۱] نام دارد، که ماهیت آن یک اولیگونوکلئوتید آنتی‌سنس می‌باشد که در سال ۱۹۹۸ در آمریکا مورد تایید قرارگرفت. البته در حال حاضر، فرآورده‌های زیاد دیگری که پایه‌ی اسیدنوکلئیکی دارند جهت استفاده در ژن‌درمانی یا فناوری آنتی‌سنس، در مرحله آزمایش‌های کلینیکی می‌باشند .

بسیاری از داروهای زیستی اولیه، جایگزین‌های ساده‌ی پروتئین‌ها (مانند فاکتورهای خونی و انسولین انسانی) هستند. توانایی تغییر هدف‌دار توالی آمینواسیدی یک پروتئین، همراه با شناخت بیشتر ارتباط بین ساختار و عملکرد آن، ساخت و تولید پروتئین‌های مهندسی‌شده‌ی دارویی را بسیار تسهیل کرده است. به طوریکه بسیاری از پروتئین‌های نوترکیب تایید شده در باکتری *اشرشیاکلی*، مخمر *ساکارومیس سرویزیه* و دودمان‌های سلولی حیوانی (اغلب سلول‌های تخمدان خوکچهٔ هندی[۲] یا کلیه نوزاد موش صحرایی[۳]) تولید شده است. هرچند اغلب داروهای زیستی برای استفاده‌ی انسانی تهیه شده‌اند، بین آنها تعدادی فرآورده‌ی دارویی دامی هم وجود دارد که وارد بازار شده‌اند. مثلا هورمون رشد گاوی نوترکیب (سوماتوتروفین[۴]) در اوایل دهه‌ی ۱۹۹۰ در آمریکا وارد بازار شده که برای افزایش محصول شیری گاودارها به‌کارگرفته می‌شود. سایر داروهای زیستی مربوط به دامپزشکی، شامل تعدادی واکسن نوترکیب و یک محصول دیگر است که اساس اینترفرونی دارد.

---

[۱] Vitraven

[۲] Chinese *hamster* ovary: CHO

[۳] Baby *hamster* kidney: BHK

[۴] Somatotrophin

بیش از ۵۰۰ داروی زیستی در حال حاضر در حال گذراندن مرحلهٔ آزمایش‌های کلینیکی می‌باشند. دو دستهٔ بزرگ این فرآورده‌ها آنتی بادی‌های مونوکلونال و واکسن‌ها می‌باشند. فاکتورهای تنظیمی (مانند هورمون‌ها و سیتوکین‌ها) همگام با ژن درمانی و فرآورده‌های آنتی-سنس نیز، اهمیت ویژه خود را دارند.

طبق بررسی‌های انجام‌شده، ارزش فروش داروهای نوترکیب از ۳۴۸۰۷ میلیون دلار در سال ۲۰۰۴ به ۴۱۷۴۴ میلیون در سال ۲۰۰۶ رسیده و پیش‌بینی می‌شود که این مبلغ به ۵۲۱۵۰ میلیون دلار در سال ۲۰۱۰ برسد. انتظار می‌رود، همزمان با رشد ۵۰ درصدی تعداد فرآورده‌های نوترکیب به تایید رسیده، بازار این داروها هم با تقسیم بازار فروش(که کمتر از ۵۸٪ نخواهد بود) به بیش از ۱۲ برند اصلی برسد (۵۴).

۱-۲. اینترفرون‌ها: گزینه‌ای برای تولید پروتئین نوترکیب جهت مصارف درمانی

در بین فرآورده‌های پروتئینی نوترکیب، اینترفرون و اینترلوکین باعث ارتباط و راهیابی DNAی نوترکیب به درمان شدند. در بین پروتئین‌های نوترکیب، این پروتئین‌ها، دردهه‌ی ۱۹۸۰، سهمی بیش از ۳۰٪ مطالعات کلینیکی را به خود اختصاص دادند. از دو سیتوکین مذکور اینترفرون‌ها موفق‌تر عمل کردند و بالاخره ۶ نوع از اینترفرون‌های α، β و γ برای درمان عفونت مزمن هپاتیتC، لوسمی، سرطان مزمن گلبول‌های سفید و بیماری مولتیپل‌اسکلروزیس[۱] در ایالات متحده‌ی آمریکا به تایید رسیدند.

نامگذاری اینترفرون‌ها توسط اسحاق[۲] و لیندنمن[۱] در سال ۱۹۵۷ انجام‌گرفت. در واقع این نام از نوع فعالیت این دسته از ماکرو مولکول‌ها سرچشمه می‌گیرد(۷۰).

---

[۱] Multiple Sclerosis: Ms

[۲] Isaacs

هم اکنون اینترفرون‌های α و β به صورت طبیعی و نوترکیب در درمان موثر شماری از بیماری‌های خونی و غیرخونی، هپاتیت، عفونت‌های ویروسی، پاپیلوما و مولتیپل اسکلروزیس به کار می روند.

طبقه‌بندی اولیه اینترفرون‌ها بر اساس منبع سلولی این پروتئین‌ها یعنی اینترفرون‌های لوکوسیتی، فیبروپلاستی و ایمنی انجام گرفته است. سپس دو دسته‌ی لوکوسیتی و فیبروپلاستی تحت عنوان اینترفرون‌های نوع I و اینترفرون‌های دسته‌ی آخر به نام اینترفرون‌های نوع Π شناخته شدند. اما نام‌گذاری که در حال حاضر استفاده می‌شود؛ در درجه اول بر اساس توالی نوکلئوتیدی ویژه‌ی ژن‌های اینترفرون‌ها و گروه ژنی آنها می‌باشد. اینترفرون‌های لوکوسیتی در نامگذاری اخیر با عناوین IFNα و IFNω (قبلا به ترتیب IFNα-I و IFNα-Π) و اینترفرون فیبروپلاستی با عنوان IFNβ و در نهایت اینترفرون ایمنی به نام IFNγ شناخته می‌شوند.

در انسان حداقل ۱۸ ژن غیرآللی برای IFNα وجود دارد که ۵تای آنها ژن‌های کاذب[۲] هستند و حداقل ۶ ژن برای IFNω، که ۵تای آنها ژن‌های کاذب هستند. ژن‌های IFNα و ω به همراه تک ژن IFNβ ابرخانواده‌ی[۳] IFNα/β را تشکیل می‌دهند.

ژن‌های IFN نوع I در یک خوشه‌ی ژنومی بر روی بازوی کوتاه کروموزوم ۹ انسانی واقع شده‌اند. از ویژگی‌های جالب توجه این پروتئین‌ها، فاقد اینترون بودن تمام آنها می‌باشد که منشا بسیار قدیمی این خانواده‌ی ژنی را آشکار می‌سازد. اما علی رغم این موضوع، اینترفرون‌ها دارای توالی نشانه‌ی ترشح پپتیدی می‌باشند که قبل از ترشح جدا شده و اینترفرون‌های بالغ α وβ وω را

---

[۱] Lindenmann

[۲] pseudogenes

[۳] superfamily

با طول ۱۶۵ تا ۱۷۲ اسید آمینه به وجود می‌آورند. به نظر می‌رسد ژن‌های اینترفرون‌های α و ω و β از منشا ژنی منفردی باشند؛ هرچند هموlوژی IFNα و ω بیشتر از هموlوژی آنها نسبت به اینترفرونβ می‌باشد (۷۱). این هموlوژی در حدود ۳۰٪ توالی اسیدآمینه‌ای است. به علاوه اینترفرون‌های β و α دارای گیرنده‌های یکسان بوده و فعالیت زیستی بسیار مشابهی دارند. هر دوی این اینترفرون‌ها در سلول هدف نسبت به عفونت‌های ویروسی مقاومت ایجاد کرده، از تکثیر سلولی جلوگیری نموده و بیان دسته‌ی MHC-I[۱] را تنظیم می‌نمایند.

عوامل زیستی مختلفی می‌توانند سبب تولید اینترفرون‌های نوعI گردند. ازجمله :

۱) آلودگی میکروبی (شامل ویروس‌ها، باکتری‌ها، مایکوپلاسما و پروتوزوآ).
۲) مواجهه با برخی سیتوکین‌ها و فاکتورهای رشد (CSF-1، IL-1، IL-2 و TNF-α).
۳) اسیدهای نوکلئیک دو رشته‌ای مثل dsRNA که در یکی از مراحل همانندسازی ویروسی تشکیل می‌گردد (۲۵).

۱-۲-۱. اینترفرونβ

اینترفرونβ دارای ۵ بخش مارپیچ است که ۳تای آن با هم موازی بوده و ۲تای بعدی با این ۳تا ناموازی می‌باشند. این ساختار، گونه‌ای از ساختار مارپیچ آلفا[۲] است؛ اما با یک توپولوژی فولدینگ جدید که در تمام اینترفرون‌های نوع I مشترک است. وزن مولکولی تخمینی آن ۲۰ کیلودالتون است ولی در ژل پلی‌آکریل‌آمید ظاهرا در نزدیکی وزن ۲۵ کیلودالتون می‌ایستد و این به علت گلیکوزیلاسیون این مولکول می‌باشد.

---

[۱] Major Histocompatibility Complex

[۲] α- helix bundle

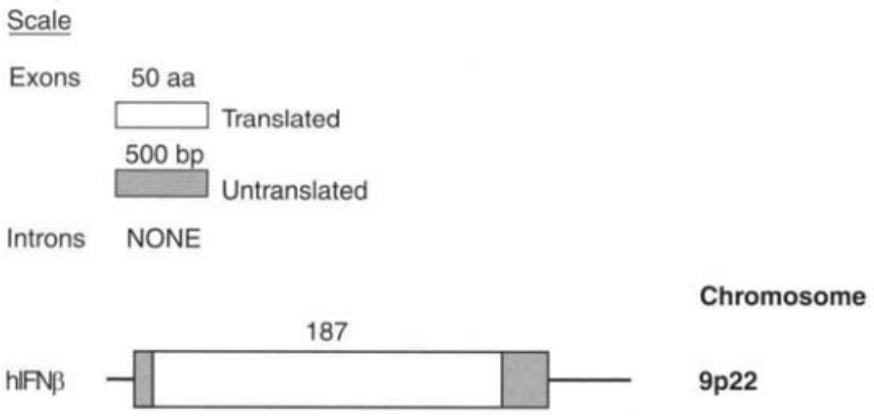
جدول ۱-۱. ویژگی‌های فیزیولوژیکی اینترفرونβ (۲۵).

Property	Human	Mouse
pI	7.8–8.9	8–10
Amino acids – precursor	187	182
– mature[a]	166	161
M_r (K) – predicted	20	19.7
– expressed	20	26/35[b]
Potential *N*-linked glycosylation sites[b]	1	3
Disulfide bonds	1	0

a پس از حذف پپتید نشانه

b دو نوع از اینترفرون‌های بتای موش با وزن‌های ۲۶ و ۳۵ کیلودالتون که از گلیکوزیلاسیون متفاوت یک پروتئین واحد حاصل می‌شود.

ساختار کریستالی اینترفرونβ به صورت دو زیرواحدی می‌باشد، که این دی مریزاسیون با واسطه‌ی عنصر روی انجام می شود. البته این مولکول در شرایط طبیعی، به صورت دو زیرواحدی دیده نمی‌شود.



شکل ۱-۱. ساختار ژنی اینترفرون بتای انسان و موش (۲۵).

ژن اینترفرونβ در انسان، شامل یک اگزون منفرد بوده و پروتئین آن ۱۸۷ اسیدآمینه دارد. این ژن در موقعیت p22 بر روی کروموزوم ۹ قرار دارد.

Accession code: SwissProt P01574

```
-21  MTNKCLLQIA LLLCFSTTAL S
  1  MSYNLLGFLQ RSSNFQCQKL LWQLNGRLEY CLKDRMNFDI PEEIKQLQQF
 51  QKEDAALTIY EMLQNIFAIF RQDSSSTGWN ETIVENLLAN VYHQINHLKT
101  VLEEKLEKED FTRGKLMSSL HLKRYYGRIL HYLKAKEYSH CAWTIVRVEI
151  LRNFYFINRL TGYLRN
```

شکل ۱-۲. توالی آمینواسیدی اینترفرونβی انسانی (۲۵).

بین سیستئین‌های ۳۱ و ۱۴۱ پیوند دی‌سولفید وجود دارد. جهش سیستئین به لیزین در موقعیت ۱۴۱ سبب از بین رفتن این پیوند دی‌سولفید و فعالیت ضدویروسی پروتئین می‌شود (۲۵).

مکانسیم عمل اینترفرونβ، احتمالا شامل القای IL-10، تنظیم منفی IFNγ و در نتیجه کاهش بیان MHCی کلاس II حاصل از القای آن، مهار مولکول‌های سطحی دارای تحریک‌پذیری همزمان، یعنی β7-2/β7-1 و ممانعت از مهاجرت لنفوسیت‌های T و تکثیر آنها می‌باشد. به علاوه، مشخص شده که درمان ترکیبی به وسیله‌ی اینترفرونβ و ایمونوگلوبولین داخل رگی در رفع نشانگان گایلاین-بار[۱] مؤثر می‌باشد (۷۰).

بیشتر تحقیقات کلینیکی در مورد اینترفرونβ، روی اثر آن در درمان بیماری MS صورت گرفته است. MS، یک بیماری خودایمنی است که در آن سلول‌هایT علیه آنتی‌ژن‌های میلین خودی در سلول‌های گلیال سیستم عصبی مرکزی، پاسخ ایمنی می‌دهند. در سال ۱۹۹۳، سازمان غذا و داروی آمریکا، تزریق زیرجلدی IFN-β1b را برای درمان MS مؤثر دانست. IFN-β1b یک شکل غیرگلیکوزیله‌ی اینترفرونβ است که به وسیله‌ی باکتری *اشرشیاکلی* تولید می‌شود. این ماده،

[۱] Gaillain- Barre

در داروخانه به نام بتاسرون[۱] عرضه می‌شود. در حال حاضر، IFN-β1a (نوع یوکاریوتی به فرم گلیکوزیله که از هامستر به دست می‌آید)، تحت عنوان آونکس[۲] در بازار موجود می‌باشد. احتمالا، اینترفرونβ حملات خودایمنی را با تشدید کردن عمل سدکنندگی سلول‌هایT بهبود می‌بخشد؛ درمان همزمان با رتینوئیک‌اسید کاملا ترانس هم، این کار را به دلیل نامعلوم افزایش می‌دهد. اینترفرونβ ممکن است القای نیتریک‌اسیدسنتاز القاشونده (iNOS) با IL-1 و اینترفرونγ را نیز مهار کند. تولید اسیدنیتریک به وسیله‌ی نیتریک‌اسیدسنتاز القاشونده در آستروسیت‌ها[۳]، به عنوان فاکتوری در پیشرفت MS عمل می‌کند.

اگرچه درمان MS از کاربردهای موفقیت‌آمیز اینترفرونβ است، محققان شروع به کشف راه‌هایی جهت استفاده از اینترفرون‌های نوع I در درمان هپاتیت کرده‌اند.

به خصوص، آزمایش‌های کلینیکی برای استفاده از اینترفرونβ1 در درمان بیماران مبتلا به هپاتیتC انجام شده است.

برخی از پژوهش‌های انجام‌شده نشان می‌دهد که، احتمالا اینترفرونβ در بیماری‌های مزمن التهابی مانند آرتریت‌روماتوئید و اگزمای غیرسمی نقش داشته باشد. همانطور که قبلا گفته شد، سلول‌های استرومایی لنفوسیت‌هایT را به وسیله‌ی ترشح اینترفرونβ از خودکشی سلولی نجات می‌دهند. بنابراین، امکان دارد تولید نامناسب اینترفرونβ، مسؤول تداوم القای موضعی سلول‌هایT و التهاب مزمن حاصل از آن باشد (۷۰).

---

[۱] Betaseron

[۲] Avonex

[۳] Astrocyte

۱-۳. باکتری *اشرشیاکلی*: میزبانی برای تولید انبوه پروتئین‌های نوترکیب

اگر چه امروزه ارگانیسم‌ها و سامانه‌های بیانی بسیار متنوعی برای تولید پروتئین نوترکیب وجود دارد، باکتری *اشرشیاکلی* اولین میزبانی بود که برای تولید داروی نوترکیب مورد استفاده قرارگرفت و به نظر می‌آید پیشرفت‌های قابل توجهی با استفاده از آن، در این حوزه از فناوری زیستی صورت گیرد. رشد سریع و سرعت بالای تولید پروتئین و دانش زیادی که در مورد فیزیولوژی *اشرشیاکلی* وجود دارد؛ به همراه ابزار کارآمد ژنتیکی، آن را به یکی از بهترین سیستم-های بیانی مبدل ساخته است. به ویژه، توانایی *اشرشیاکلی* در کنترل فولدینگ اکسیداتیو پروتئین در سیتوپلاسم و نتایج جدید حاصل از آزمایش‌های بدون سلول[۱]، دریچه‌های جدیدی جهت به کارگیری این ارگانیسم ساده اما بسیار مفید، در صنایع تولید پروتئین نوترکیب گشوده است (۶۹). با وجود مزایای قابل توجه در مورد استفاده از این میزبان ارزان‌قیمت برای تولید پروتئین نوترکیب، مشکلاتی نیز بر سر راه وجود دارد. از جمله مسایلی که محققان مختلفی را به مطالعه و تحقیق جهت رفع آن واداشته است، تولید بالای استات توسط باکتری در طی رشد سریع در فرمانتور می-باشد که سبب مرگ زودرس آن شده و به این ترتیب فرآیند تولید پروتئین نوترکیب را کاهش می‌دهد.

۱-۳-۱. استات به عنوان یک مساله مشکل آفرین در تولید انبوه پروتئین نوترکیب توسط *اشرشیاکلی*

استاتی که توسط سلول‌ها به محیط ترشح می‌شود، آنها را با یک مساله مواجه می‌سازد. استات، مانند سایر اسیدهای ضعیف، سمی است. این اسید ضعیف لیپوفیل، در این فرم تجزیه نشده یا اسیدی، به آسانی از منافذ غشا عبورکرده و سبب به هم خوردن شیب pH عبورکننده از

[۱] cell- free