بسم الله الرحمن الرحیم

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان‌نامه دوره‌ی کارشناسی ارشد زیست شناسی سلولی ملکولی

بررسی عملکرد miRNAی اینترونی مصنوعی (ضد) کالومنین در بالادست cDNAی فاکتور ۹ انعقادی در رده‌ی سلولی پستاندار

جواد پرنیان

اساتید راهنما:

دکتر علیرضا زمردی پور

دکتر زهرا سهیلا سهیلی

زمستان ۱۳۹۱

"حق استفاده از مفاد پایان نامه برای پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری محفوظ است"

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری

پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری

پایان نامه کارشناسی ارشد

رشته ی زیست شناسی سلولی و مولکولی

موضوع پایان نامه

بررسی عملکرد miRNAی اینترونی مصنوعی (ضد) کالومنین در بالادست cDNAی فاکتور ۹ انعقادی در رده‌ی سلولی پستاندار

نگارش:

جواد پرنیان

این پایان نامه توسط کمیته داوری در تاریخ ۱۳۹۱/۱۱/۲۴ مورد تایید قرار گرفت و با درجه عالی ارزیابی شد.

استاد راهنمای اول : دکتر علیرضا زمردی پور

استاد راهنمای دوم : دکتر زهرا سهیلا سهیلی

داوران : دکتر مصطفی مطلبی

دکتر محمد معصومی

سرپرست آموزش : دکتر فرید حیدری

تقدیم به روشن کننده راه

چکیده

نقص در فاکتور۹ انعقادی شایعترین عامل در بیماری هموفیلی B است. در حال حاضر بیماران هموفیلی B با روش جایگزین درمانی با پلاسمای ذخیره شده یا فاکتور ۹ نوترکیب مورد مداوا قرار می گیرند. گاما کربوکسیلاسیون گلوتامیک اسیدهای ناحیه ی Gla فاکتور ۹ که توسط آنزیم گاماکربوکسیلاز انجام میگیرد به عنوان یکی از تغییرات بعد از ترجمه کلیدی برای فعالیت بیولوژیک این پروتئین ضروری است و همواره باید در هنگام تولید فاکتور۹ نوترکیب مورد توجه قرار گیرد. توانایی بالقوه miRNAهای مصنوعی بیان شونده در درمان بیماری ها را باید منتسب به توانایی آنها در برش اختصاصی RNAی هدف آنها دانست. این نوع RNAi (miRNAi)، مزایای اصلی هر دو نوع siRNA و miRNA که به ترتیب هدف گیری اختصاصی و بیان دائم باشند را داراست. با در نظر گرفتن نقش باز دارندگی کالومنین بر روی گاماکربوکسیلاز، در این پژوهش ضمن طراحی دو miRNA مصنوعی اینترونی بر علیه کالومنین، تاثیر آن بر بیان فاکتور ۹ انسانی مورد بررسی قرار گرفته است. توالی رمز کننده ی miRNA های مصنوعی ضد کالومنین در اینترون ۱ کوتاه شده فاکتور ۹، با اثر افزایندگی، در بالادست cDNA ی فاکتور ۹ انسانی قرار داده شد.

پس از بررسی توالی ژن کالومنین انسان و همردیفی ٦ واریانت آن دو siRNA علیه توالی حفظ شده از این ژن طراحی شد و عملکرد هر یک از آنها در چارچوب یک miRNA ی طبیعی، بنام miR-30a در داخل اینترون کوتاه شده ۱ فاکتور ۹ با بهره گیری از روش های نرم افزاری مورد پیش بینی قرار گرفت. توالی های طراحی شده طوری در نظر گرفته شدند تا در پردازش اینترون و تولید و بالغ شدگی miRNA خللی وارد نگردد. پس از سنتز توالی رمز کننده دو miRNA با نام های miR6 و miR5 که در اینترون ۱ کوتاه شده فاکتور ۹ قرار گرفته بودند، قطعه های مزبور با روش های مولکولی در ناحیه بالادست cDNA فاکتور ۹ در یک وکتور بیانی مجهز به پروموتر CMV قرار داده شد. پس از بررسی صحت مراحل همسانه سازی، پلاسمید های نوترکیب به صورت موقت به سلول‌های HEK293T منتقل شدند و در ادامه میزان بیان ژن های کالومنین و فاکتور ۹ انسانی در سلول های ترانسفکت شده در سطح رونویسی با روش Real-Time PCR مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج اولیه بدست آمده از بررسی سلول های ترانسفکت شده با سازه های حاوی miR6 دلالت بر تولید miRNAی بالغ داشت اما کاهش بیان کالومنین مشاهده نشد که علت آن می تواند اشباع شدن exportin 5 بخاطر ازدیاد miRNA های بیان شده باشد. با توجه به نتایج بدست آمده به نظر می رسد که miRNA ی مصنوعی با اسکلت miR-30a بتواند از متن یک اینترون خارج شده و مراحل بلوغ را طی کند. علاوه بر این بیش بیان فاکتور ۹ نیز در این سلول ها در مقایسه با سلول های کنترل مشاهده شد که نشانگر پردازش کامل اینترون معرفی شده بود. به این ترتیب، علاوه بر تایید فراوری صحیح miRNA مصنوعی بیان شده،

کاربرد دوگانه اینترون شامل عملکرد ذاتی آن در بیان ژن مربوطه و نقش آن در حمل و تولید miRNA مصنوعی مورد تایید قرار گرفت.
کلید واژه: microRNA، Real Time PCR ، اینترون، فاکتور ۹ انعقادی، کالومنین

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فهرست جدول‌ها ..... د

فصل ۱- مقدمه ۱

۱-۱ هموفیلی چیست؟ ۲

۱-۱-۱ آیا هموفیلی یک بیماری ارثی است؟ ۲

۱-۱-۲ هموفیلی A وB ۲

۱-۱-۳ بیماران هموفیلیB ۳

۱-۱-۴ روش‌های درمانی هموفیلی B ۴

۱-۲- فاکتورهای انعقادی و انعقاد خون ۵

۱-۲-۱ فاکتورهای انعقادی ۵

۱-۳- فاکتور ۹ انسانی ۶

۱-۳-۱- ساختار ژنتیکی فاکتور ۹ ..... ۶

۱-۳-۲- نواحی کد کننده ژن فاکتور ۹ ..... ۸

۱-۳-۳ ساختمان پیش‌ساز فاکتور ۹ ..... ۸

۱-۳-۴- فعال‌سازی فاکتور ۹ ..... ۹

۱-۳-۵- تغییرات پس از ترجمه ۱۱

۱-۳-۵-۱- برش سیگنال پپتید۱۲

۱-۳-۵-۲- گاما کربوکسیلاسیون ۱۳

۱-۳-۵-۳- پردازش پروپپتید ۱۵

۱-۳-۵-۴- بتا هیدروکسیلاسیون آسپارتات ۱۶

۱-۳-۵-۵- گلیکوزیلاسیون ۱۷

۱-۳-۵-۶- سولفاته شدن تیروزین ۱۸

۱-۳-۵-۷- فسفریله شدن ۱۹

۱-۴- خصوصیات آنزیم گاما کربوکسیلاز انسانی ۱۹

۱-۵- کالومنین، مهارکننده آنزیم گاما کربوکسیلاز ۲۱
۱-۶- فناوری miRNA interference ۲۱
۱-۶-۱- زیست شناسیmiRNA ۲۲
۱-۶-۱-۱- بیوژنزmiRNA ۲۳
۱-۶-۲- siRNA/miRNA، تخریب یا توقف ؟ ۲۶
۱-۶-۳ "miRNAi"، یک مفهوم جدید ۲۷
۱-۶-۳-۱- هدف گیری با miRNA ۲۷
۱-۶-۳-۲- هدف گیری miRNA ۲۷
۱-۶-۴- miRNA ی سنتزی استاندارد(Synthetic Canonical miRNA) ۲۷
۱-۶-۵- مقلدmiRNA (miRNA Mimic) ۲۸
۱-۶-۶- miRNA ی مصنوعی ۲۹
فصل ۲- بررسی منابع ۳۰
۲-۱- هدف ۳۱
فصل ۳- مواد و روشها ۳۳
۳-۱- نرم افزارها و روش‌های نرم افزاری ۳۴
۳-۲- مواد مورد استفاده در بخش ملکولی ۳۵
۳-۲-۱ سویه‌های باکتریایی ۳۵
۳-۲-۲- پلاسمیدها ۳۵
۳-۲-۲-۱ پلاسمید pcDNA3 ۳۵
۳-۲-۲-۲- سازه Int-FIX ۳۵
۳-۲-۲-۳ سازه Int-miR6-FIX ۳۶
۳-۲-۲-۴ سازه Int-sc6-FIX ۳۷
۳-۲-۲-۵ سازه Int-miR5-FIX ۳۸
۳-۲-۲-۶ سازه Int-sc5-FIX ۳۹
۳-۲-۳ پرایمرها ۴۰

۳-۲-۴- مواد شیمیایی مورد نیاز در بخش ملکولی ۴۲
۳-۲-۴-۱ آمپی سیلین (Sigma) ۴۲
۳-۲-۵- محیط کشت باکتری ۴۲
۳-۲-۶- آنزیم‌های مورد استفاده ۴۲
۳-۲-۶-۱- آنزیمهای برش دهنده، لیگاز و پلی مراز ۴۲
۳-۲-۷- نشانگرهای وزن ملکولی DNA ۴۲
۳-۲-۸- محلول‌ها و بافر ۴۲
۳-۲-۸-۱- محلولهای مورد نیاز برای تهیه سلولهای مستعد ۴۲
۳-۲-۸-۲- محلول‌های لازم برای PCR ۴۳
۳-۲-۸-۳- محلول‌ها و بافرها ۴۳
۳-۲-۹- کیت‌های آزمایشگاهی مورد استفاده ۴۳
۳-۳- مواد مورد نیاز برای بخش سلولی ۴۳
۳-۳-۱ محیط کشت اختصاصی برای کشت سلول‌های HEK293T ۴۳
۳-۳-۲- بافرها و محلول‌های لازم برای کشت سلولی ۴۴
۳-۳-۲-۳-۱- بافر PBS ۴۴
۳-۳-۲-۳-۲- Fetal Bovine Serum (FBS) ۴۴
۳-۴ روش‌های استفاده شده ۴۴
۳-۴-۱- روش‌های بخش ملکولی ۴۴
۳-۴-۱-۱- استخراج DNA از ژل آگارز (Recovery) ۴۴
۳-۴-۱-۲- خالص سازی محصولات بدست آمده از هضم‌های آنزیمی و PCR ۴۵
۳-۴-۱-۳- استخراج DNA پلاسمیدی ۴۵
۳-۴-۱-۴ واکنش های هضم آنزیمی DNA ۴۵
۳-۴-۱-۵- واکنش اتصال ۴۶
۳-۴-۱-۶- مشاهده DNA توسط ژل آگارز ۴۶
۳-۴-۱-۷- تعیین توالی نوکلئوتیدی ۴۷
۳-۴-۱-۸ واکنش RT-PCR ۴۷

۳-۴-۱-۹ واکنش RT-PCR برای آشکارسازی miRNA ۴۸
۳-۴-۱-۱۰ واکنش qPCR ۴۸
۳-۴-۲ روش‌های کار با میزبان باکتریایی ۵۱
۳-۴-۲-۱- کشت باکتری در محیط مایع ۵۱
۳-۴-۲-۲- کشت بر روی محیط جامد (پلیت) ۵۲
۳-۴-۲-۳- نگهداری باکتری‌ها ۵۲
۳-۴-۲-۴- مستعد سازی باکتری‌ها ۵۲
۳-۴-۲-۵- ترانسفورم کردن ۵۲
۳-۴-۳ روش‌های بخش کشت سلولی ۵۳
۳-۴-۳-۱- کشت سلول‌های فریز شده ۵۳
۳-۴-۳-۲- پاساژ سلولها(Subculturing) ۵۳
۳-۴-۳-۳- فریز کردن سلولها ۵۴
۳-۴-۳-۴- رشد مجدد سلول‌های فریز شده ۵۵
۳-۴-۳-۵ شمارش سلولی ۵۵
۳-۴-۳-۶- طرز تهیه رنگ مخصوص رنگ آمیزی سلول ها ۵۶
۳-۴-۳-۷ کشت سلول جهت شمارش سلولی ۵۶
۳-۴-۴ ترانسفکشن با استفاده از X-TREME GENE 9 ۵۶
۳-۴-۴-۱- زمان برداشت سلولها و بررسی اثر سرکوب بیان ژن ۵۷
۳-۴-۴-۲ استخراج RNA از سلول های تیمار شده ۵۷
۳-۴-۴-۳ سنجش مقدار و کیفیت RNA استخراج شده ۵۸
فصل ۴- نتایج ۶۰
۴-۱- آنالیزهای رایانه‌ای ۶۱
۴-۱-۱- طراحی miRNA ی مصنوعی ۶۱
۴-۱-۲- تعیین محل ورود miRNA ها در اینترون ۱ کوتاه شده فاکتور ۹ ۶۵
۴-۲- نتایج بخش ملکولی ۶۶
۴-۲-۱- استخراج وتاییدInt-FIX ۶۶

۴-۲-۲- ورود توالی رمزگذار miRNA ها و scrambledها درون پلاسمید Int-FIX ۶۷
۴-۲-۳- تعیین توالی miR6در سازه Int-miR6-FIX ۶۸
۴-۲-۴- تعیین توالی sc6 در سازه Int-sc6-FIX ۶۹
۴-۲-۵ تعیین توالی miR5 در سازه Int-miR5-FIX ۷۰
۴-۲-۶ تعیین توالی sc5 در سازه Int-sc5-FIX ۷۱
۴-۳- نتایج بخش سلولی ۷۲
۴-۳-۱- بررسی رشد سلولی ۷۲
۴-۳-۲- میزان بیان فاکتور ۹ در مرحله نسخه‌برداری با استفاده از Real Time RT-qPCR ۷۲
۴-۳-۳- میزانknockdown کالومنین در مرحله نسخه‌برداری با استفاده از Real Time RT-qPCR .. ۷۳
۴-۳-۴- آشکارسازی miRNA ها ۷۴
فصل ۵- بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات ۷۶
۵-۱- پیشنهادات ۷۹
فصل ۶- ضمیمه ۸۱
فصل ۷- منابع ۹۹

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول ۲-۱پرایمرها و توالی مربوطه ۴۰

جدول ۲-۲کاربرد جفت پرایمرها ۴۱

جدول ۲-۳محلول‌ها و بافرهای مورد نیاز ۴۳

جدول ۲ -۴مواد مورد نیاز برای کشت اختصاصی سلول‌های HEK ۴۳

جدول ۲-۵بافر PBS ۴۴

جدول ۲- ۶ترکیبات و مقادیر بکار برده شده در فرایند هضم آنزیمی ۴۵

جدول ۲-۷ الگوی حجمی ترکیبات در واکنش های اتصالی این تحقیق ۴۶

جدول ۲-۸ مواد مورد نیاز در واکنش RT-PCR ۴۷

جدول ۲- ۹مواد و مقادیر مورد استفاده در واکنش PCR کمی ۴۹

جدول ۲- ۱۰مواد و مقادید مورد استفاده در واکنش PCR کمی ژن فاکتور۹ ..... ۵۰

جدول ۲- ۱۱مواد و مقادید مورد استفاده در واکنش PCR کمی ژنGAPDH ۵۰

فصل ۱– مقدمه

۱-۱- هموفیلی[1] چیست؟

۱-۱-۱- آیا هموفیلی یک بیماری ارثی است؟

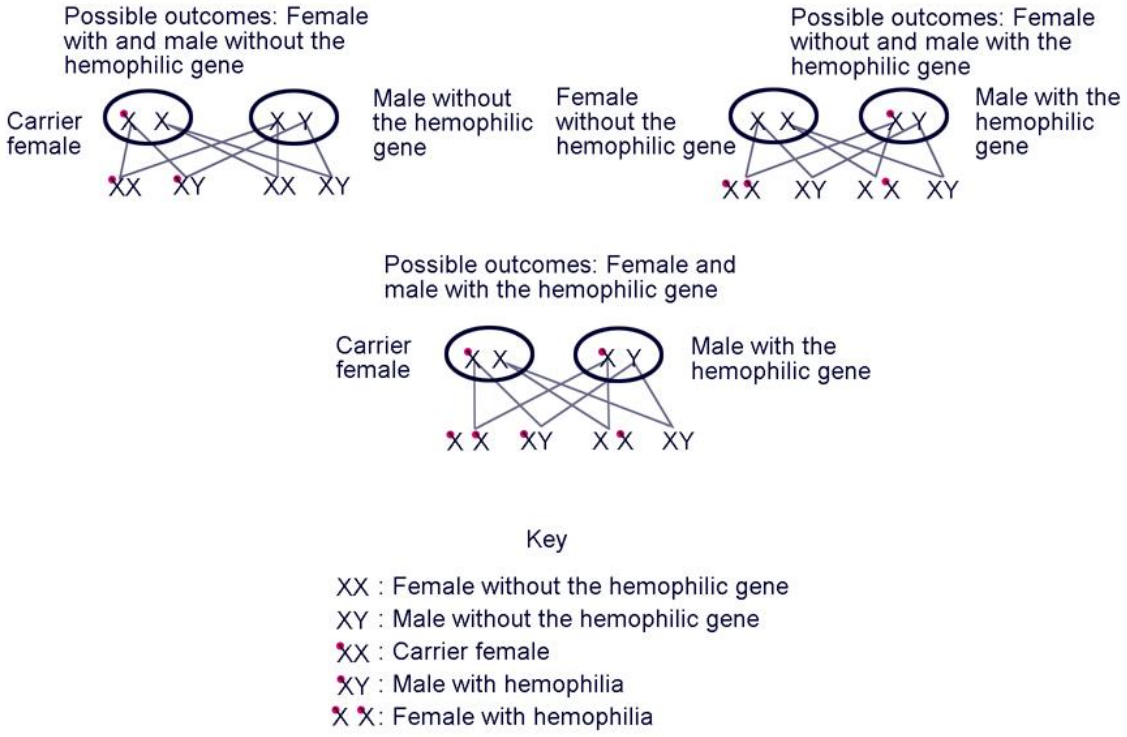
هموفیلی به عنوان یک بیماری ارثی مغلوب وابسته به جنس دارای تظاهراتی از جمله تمایل به خونریزی عمومی،خونریزی مکرر در مفاصل، خونریزی شدید پوستی ، طولانی شدن لخته شدن خون است (Koller, 1954).

۱-۱-۲- هموفیلی A و B

احتمال وقوع هموفیلی در مردان بیشتر از زنان است. هموفیلی نوع A رایج‌تر است به طوری که از هر۱۰۰۰۰-۵۰۰۰ نوزاد مذکر متولد شده در دنیا یک یا دو نفر مبتلا به هموفیلی A هستند(Wynbrandt and Ludman, 2009).بیماری هموفیلی Bیا کریسمس[2]یک بیماری ارثی و از پرهزینه ترین بیماری‌های کشور است که در نتیجه حذف و یا کاهش سطح فاکتور ۹ فعال در خون ایجاد می‌شود. این بیماری به صورت مغلوب وابسته به کروموزوم Xبه ارث می رسد و از هر ۳٤۰۰۰۰-۲۰۰۰۰ مرد یک نفر را مبتلا می کند(Biggs et al., 1952).این بیماری بندرت در زنان دیده شده زیرا وابسته به کروموزوم Xمی باشد، (شکل ۱-۱ احتمالات و نحوه توارث بیماری هموفیلیB -overview#a0104((http://emedicine.medscape.com/article/199088. برای زنان خانواده هموفیلی، دانستن اینکه آنها ناقل بیماری هستند یا خیر، امری حیاتی است. نخست و پیش از هر چیز باید شجره نامه ای رسم شود و چنانچه مادری دارای یک کروموزوم X واجد موتاسیون در ژن فاکتور ۹ باشد ناقل هموفیلی محسوب می گردد. در اینصورت ۵۰ درصد احتمال دارد فرزندان پسر این مادر ژن ناقص را به ارث برده و به بیماری مبتلا گردند. دختران یک فرد مبتلا به هموفیلی، همیشه ناقل هستند و نیازی به بررسی ندارند. موارد تک گیر در خانواده‌هایی که تنها یک فرد مبتلا به هموفیلی است به چشم می خورد که ممکن است در اثر انتقال ژن از زنان بدون نشانه که ژن آنها ناشناخته بوده است، یا در اثر جهش جدید در مادر، که باعث ناقل شدن او می‌شود و یا در اثر جهش جدید در فرد مبتلا به هموفیلی، یعنی یک جهش جدید حقیقی، بوقوع بپیوندد. در حال حاضر حدود ۵۰ درصد از مواردی که به تازگی تشخیص داده شده‌اند، موارد تک گیر است. عملا در موارد تک گیر، احتمال ژنتیکی ناقل بودن مادر حدود ۷۱ درصد است. در بسیاری از موارد، این مادران جهش یافتههای جدید هستند و ژن هموفیلی در دیگر اعضای خانواده دیده نمی‌شود(Koller, 1954).

---

[1] . Hemophilia
[2] . Christmas



شکل ۱-۱ احتمالات و نحوه توارث بیماری هموفیلیB -(http://emedicine.medscape.com/article/199088-overview#a0104)

متوسط سن تشخیص هموفیلی در موارد شدید حدود ۹ ماهگی و در موارد متوسط حدود ۲۲ ماهگی است. شایعترین نشانهها در آغاز بیماری، خونریزی بافتهای نرم، خونریزی در محل تزریق، زخم یا جراحی و خونریزی حفره دهانی می باشد. خونریزی درون ماهیچه و مفصل‌ها که از ویژگیهای بیماری است، الزاما ابتدا دیده نمی‌شود. اختصاصی ترین نشانه هموفیلی، خونریزی مفصلی است که معمولا هنگامی که کودک راه رفتن را می آموزد بروز می کند. موارد خونریزی مفصلی اولیه نسبتا بی ضرر است و هنگامی که خون جذب شود و تورم از بین رود، فعالیت و حرکت طبیعی مفصل باز می گردد اما به مرور زمان پس از خون‌ریزیهای مکرر تغییرات مفصلی (آتروپاتی) پدید آمده و به غضروف و استخوانها و بافتهای نرم آسیب می رسد. شایان ذکر است که شایعترین علت مرگ در بیماران هموفیلی، خونریزی مغزی است و ضربه های خفیف می تواند خونریزی مغزی شدیدی را ایجاد کند(Biggs et al., 1952).

۱-۱-۳- بیماران هموفیلیB

بیماران مبتلا به هموفیلی B را به چهار گروه طبقه بندی می کنند که عبارتند از:گروه CRM^+[۱]، گروه CRM^r،گروه CRM^- و گروهی که بر علیه فاکتور ۹ آنتی بادی تولید می کنند. در بیماران گروه

[۱] . Cross-reactive material

CRM^+مقدار آنتی ژن فاکتور ۹ در خون این بیماران در حد نرمال بوده اما فعالیت آن کاهش یافته است. برخلاف گروه CRM^+میزان آنتی ژن فاکتور ۹ در خون بیماران گروه CRM^r کاهش یافته که نتیجه آن کاهش فعالیت فاکتور ۹ و تاخیر در انعقاد خون است. افراد مبتلا به هموفیلی نوع CRM^-معمولا فاقد فاکتور۹ هستند و یا میزان بسیار اندکی از آنتی ژن فاکتور ۹ را دارا می باشند. گروه چهارم شامل بیمارانی می‌شوند که پس از تزریق فاکتور ۹، بدنشان شروع به تولید آنتی بادی می کند و مانع از عمل فاکتور ۹ به طور صحیح می گردد. بر طبق مطالعات انجام شده ۱ تا ٤ درصد بیماران هموفیلی Bاز این مسئله رنج می برند. به طور کلی بیماری در سه شکل خفیف، ملایم و شدید دیده می‌شود که در مبتلایان میزان فاکتور ۹ عملکردی پلاسمایی به ترتیب ۳۰٪-٦، ۵٪-۲ و کمتر از ۱٪ می‌باشد(Giangrande, 2003).

۱-۱-۴- روش‌های درمانی هموفیلی B

درمان این بیماری مانند بسیاری از بیماری‌های سیستمیک دیگر به روش جایگزین درمانی[۱] انجام می‌گیرد. این روش درمانی شامل تزریقهای دوره ای و منظم فاکتور ۹ مشتق شده از پلاسمای افراد نرمال و یا استفاده از فاکتور ۹ نوترکیب می باشد. برای برقراری هموستاز، غلظت فاکتور ۹ را باید تا ۱۵ الی ۳۰ درصد طبیعی افزایش داد(Brettler and Levine, 1989). جایگزین درمانی منجر به کنترل سریع خونریزی و در نتیجه کاهش یا پیشگیری از صدمات ماهیچه‌های اسکلتی گردید. باید یاد آور شد که این روش درمانی به واسطه فاکتور ۹ مشتق شده از پلاسمای افراد نرمال ضمن اینکه پرهزینه است، خطر ابتلا به بیماری‌های عفونی مثل ایدز و هپاتیت را می تواند برای بیمار به دنبال داشته باشد(Brinkhous et al., 1996).لذا برنامه‌ریزی در جهت تولید فاکتور ۹ نوترکیب و یا درمان قطعی این بیماری با روش ژن درمانی در دستور کار آزمایشگاه‌های تحقیقاتی فراوانی در سرتاسر دنیا قرار گرفته است (شکل ۱-۲).

Severity	Functional FIX Levels, %	Bleeding and Hemarthroses
Severe	≤ 1	Lifelong spontaneous hemorrhages and hemarthroses starting in infancy
Moderate	2-5	Hemorrhage secondary to minor trauma or surgery; occasional spontaneous hemarthrosis
Mild	6-25	Hemorrhage secondary to trauma, surgery, or precipitated by the use of drugs such as nonsteroidal anti-inflammatory drugs

شکل ۱-۲ ارتباط بین شدت خون‌ریزی و سطح پایه فاکتور ۹ فعال(
http://www.blobs.org/science/article.php?article=14)

در حال حاضر از فاکتور ۹ نوترکیب تولید شده توسط سلولهای پستانداران در درمان ۵۰٪ از بیماران استفاده می گردد که کاملا بی خطر بوده و به عنوان روش جایگزین در سال ۱۹۹۳ معرفی گردید.

---

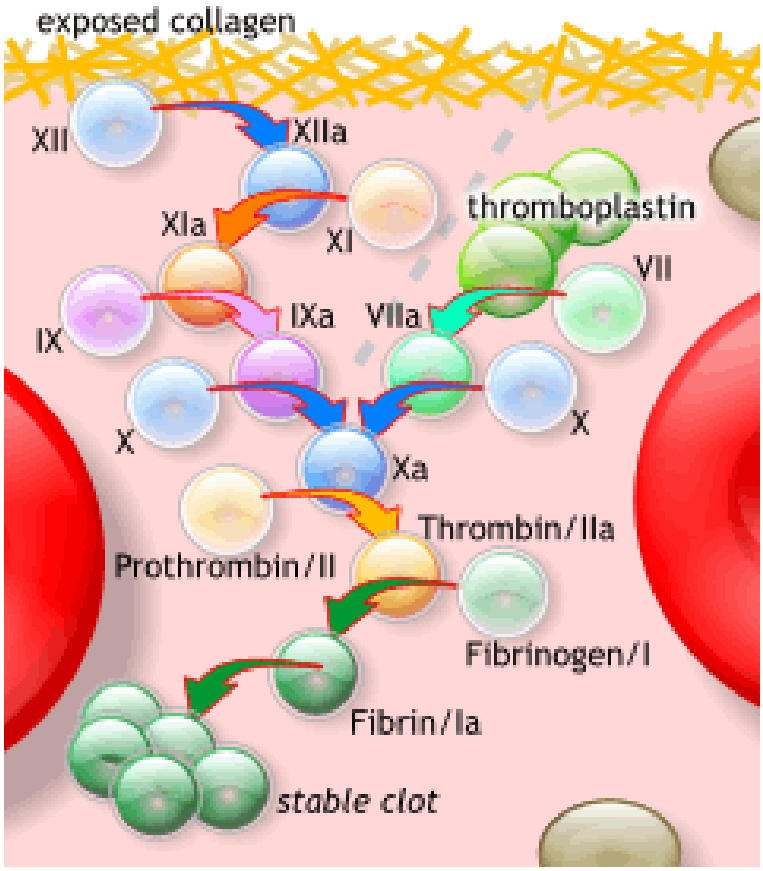
۱. Replacementtherapy
۲. Gene therapy

اگر چه درمان کنونی هموفیلی B از طریق جایگزین درمانی صورت می‌گیرد، حالت ایده ال درمانی تولید فاکتور خونی توسط خود فرد و به صورت پیوسته است تا خطرات ناشی از درمان جایگزین حذف گردد که از طریق ژن درمانی[۲] رسیدن به این هدف میسر است(Kay et al., 1994).

۱-۲- فاکتورهای انعقادی و انعقاد خون

۱-۲-۱- فاکتورهای انعقادی

فاکتورهای انعقادی عموماً با اعداد یونانی مشخص و به صورت زیموژن‌های غیر فعال باجریان خون در گردش هستند. استفاده از اعداد یونانی بجای نام کاشفان آنها و یا اسامی سیستماتیک، در طی کنفرانسهای سالیانه (شروع از۱۹۵۵م) متخصصین هموستاز پذیرفته و در سال ۱۹۶۲ اکثریت آراء برای نامگذاری فاکتورهای I الی XII کسب شد. این کمیته اکنون به کمیته بین المللی ترومبوزیس و هموستازیس(ICTH) تغییر نام یافته است. (شکل ۱-۳) فهرستی از فاکتورهای آبشار انعقادی را ارائه می‌نماید. اشکال فعال شده فاکتور های انعقادی با زیرنویس a نشان داده می‌شود و اغلب آنزیم‌هایی از دسته سرین پروتئازها می‌باشند. اما در این میان استثناهایی نیز وجود دارد، به عنوان مثال فاکتور ۵ و ۸یک گلیکوپروتئین بوده وفاکتور ۱۳ ترانسگلوتامیناز است.سرین پروتئازها با شکستن سایر پروتئین‌ها در جایگاه‌های ویژه نقش خود را ایفاء می‌نمایند. در میان فاکتورهای انعقادی فعال خون،فاکتور ۷ فعال بیشترین غلظت را در خون به خود اختصاص داده است.



شکل ۱-۳ آبشار انعقاد خون(http://www.blobs.org/science/article.php?article=14)

۱-۳- فاکتور ۹ انسانی

۱-۳-۱- ساختار ژنتیکی فاکتور ۹

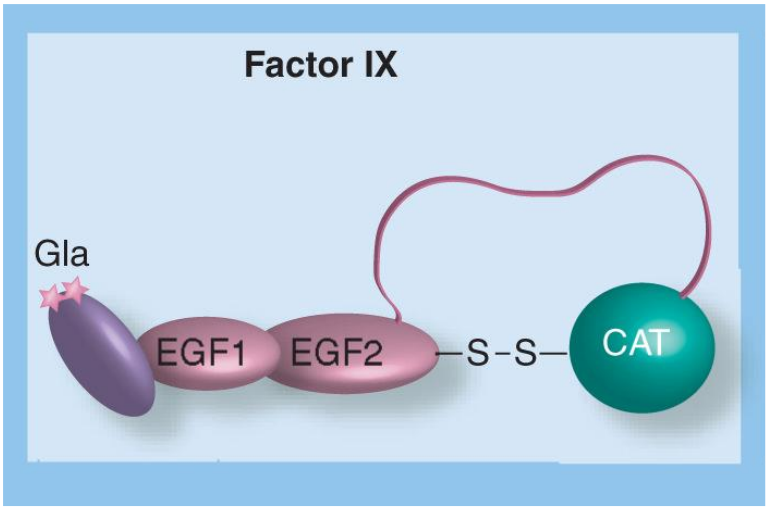
ژن فاکتور ۹ که دارای ۷ اینترون و ۸ اگزون است با طولی حدود ۳٤ کیلو بـاز روی بازوی بلند کروموزوم X(Xq27) قرار دارد (Yoshitake et al., 1985)و فاصله آن با ژن فاکتور ۸ حدود ۳۵ سانتی مورگان است. بیان این ژن مانند سایر ژن‌های پستانداران بوسیله مکانیسم‌های پیچیده‌ای کنترل می‌گردد که نیازمند چندین عنصر عمل کننده سیس[۱] است. این عناصر علاوه بر اینکه در ناحیه بالادست ژن 5'-UTR (5'untranslated rigion) وجود دارند، در نواحی 3'-UTR (3'-untranslated region) و اینترون‌ها نیز موجود هستند(Kurachi et al., 1995). ناحیه پروموتری دقیق برای ژن فاکتور ۹ تعریف نشده است ولی حداکثر فعالیت پروموتری این ژن در ناحیه بالادست ژن و تقریبا تا نوکلئوتید٤۰۰- گزارش شده است(Hirosawa et al., 1990). مهم‌ترین توالی‌هایی که باعث هدایت شروع رونویسی در این ناحیه می‌گردند در موقعیت ۱٦۲- قرار دارند (Hirosawa et al., 1990). همچنین در ناحیه فوق دو توالی فعال CCAAT و TATAبه ترتیب میان نوکلئوتیدهای ۲۳۲-/۲۳۸- و ۱٦۸-/۱۸۷- گزارش شده است(Hirosawa et al., 1990). به ناحیه پروموتری فوق عناصر ترانس

---

۱. Cis- acting elements

از قبیل پروتئین متصل شونده به CCAAT (C/EBP) ، پروتئین متصل شونده به D-site (DBP) ، فاکتور هسته‌ای-۱(NF-1)و فاکتور هسته‌ای=٤ هپاتوسیت(HNF-4) متصل می‌شوند(Giannelli et al., 1993).

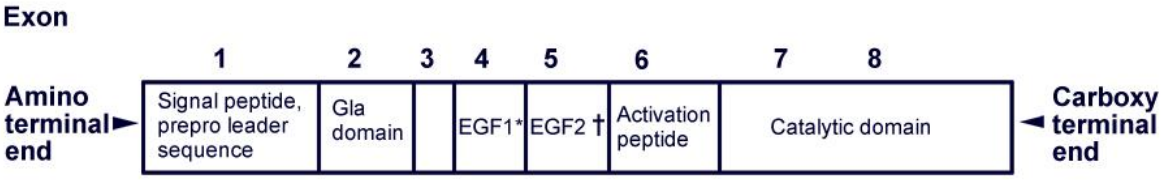
رونوشت[۱] ژن فاکتور ۹ یک ملکول mRNA بالغ با طول تقریبی ۳۰۰۰ جفت باز است، (شکل ۱-٤). در مورد طول و ساختار دقیق ملکول mRNA بالغ این ژن اختلاف نظر وجود دارد. دریک گزارش mRNA بالغ فاکتور ۹،به طول ۲٦٦۳ باز گزارش گردیده که شامل ناحیه 5'-UTR با طول ۲۹ باز، ناحیه کد کننده با طول ۱۳٦۹ باز و 3'-UTR با طول ۱۳۹۰ باز است. در گزارش دیگری طول mRNA بالغ این فاکتور ۲۹٦۹ باز گزارش گردیده و نواحی 5'-UTR ، کد کننده و 3'-UTR به ترتیب دارای ۲۰۵ ، ۱۳۸٦ و ۱۳۹۲ باز هستند (Hirosawa et al., 1990). محصول ترجمه ملکول mRNAفاکتور ۹ یک پروتئین پیش ساز به نام پری پرو فاکتور۲۹ با ٤٦۱ اسید آمینه است. این پروتئین دارای چندین ناحیه است که به ترتیب از انتهای آمینی به کربوکسی شامل ناحیه پری پپتید[۳] یا پپتید راهنما[٤]، ناحیه پروپپتید[۵]، ناحیه گلا[٦]، نواحی شبه فاکتور رشد اپیدرمی[۷]، ناحیه فعال سازی و ناحیه کاتالیتیکی است(Bowen, 2002). ساختار ژنتیکی، مولکول mRNA ، شکل پیش‌ساز فاکتور ۹ در(شکل ۱-۵) نشان داده شده است.



شکل ۱-۴ شکل شماتیک فاکتور ۹(Smith and Gailani, 2008)

---

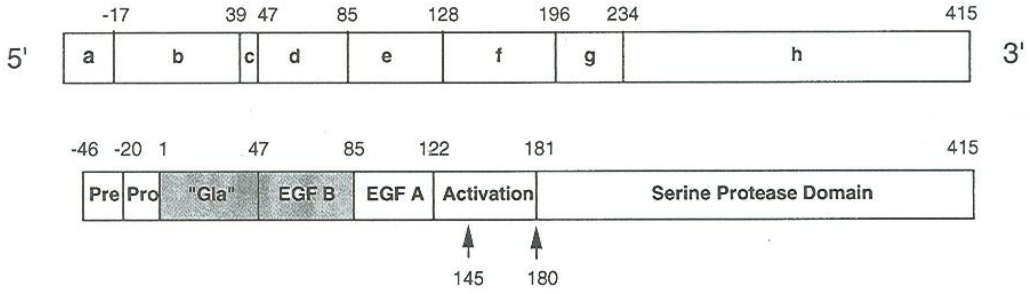
۲. Transcript
۳. Prepro factor IX
۱. prepeptide
۲. Signal peptide
۳. Propeptide
۴. GLA domain
۵. Epidermal Growth Factor



شکل ۱-۵ بخش‌های اصلی فاکتـور ۹(http://emedicine.medscape.com/article/199088-overview#a0104)

۱-۳-۲- نواحی کد کننده ژن فاکتور ۹

اگزون a فاکتور ۹کد گذار بخشی از '۵ -UTR ملکول mRNA و ناحیه پپتید نشانه است.. بخش '۵ اگزون b توالی پروپپتید را کد می‌نماید، اما بخش بزرگی از آن توالی Gla را کد می‌کند. اگزون c ناحیه آب گریز را کد می‌نماید که برای واکنش فاکتور ۹ با کوفاکتور آن (فاکتور۸) ضروری است. این ناحیه آب گریز دارای موتیف حفاظت شده Phe-Trp-X-X-Tyr است که برای تغییرات ساختاری وابسته به کلسیم نیز لازم است. بررسی‌ها نشان داده است که نواحی گلا و آب گریز (اسیدهای آمینه ۱ تا ٤٧ در فاکتور ۹ بالغ) با همدیگر یک جایگاه فعال را برای اتصال این فاکتور به غشای لیپیدی تشکیل می‌دهند(Anson et al., 1984). دو ناحیه فاکتور رشد شبـه اپیدرمـی ۱ و ۲ به ترتیب بوسیله اگزون‌های d و e کد می‌شوند. اگزون f نیز کد کننده ناحیه فعال سازی است و سرانجام اگزون‌های g و h، ناحیه با فعالیت کاتالیتیکی را کد می‌کنند. (شکل ۱-٦) ارتباط بین اگزون‌ها و دمین‌های فاکتور۹را به صورت شماتیک نشان می‌دهد.



شکل ۱-۶ دمین‌های فاکتور ۹(Freedman et al., 1995)

۱-۳-۳- ساختمان پیش‌ساز فاکتور ۹

پیش ساز فاکتور ۹ از سه بخش عمده تشکیل شده است که شامل پری پپتید با ۲۸ اسید آمینه، پروپپتید با ۱۸ اسید آمینه و فاکتور ۹ بالغ با ٤١٥ اسید آمینه است. توالی پری پپتید و پروپپتید با ٤٦ اسید آمینه مشهور به پری پرولیدر[۱]می باشد که شامل اسیدهای آمینه ٤٦- (متیونین) تا ۱- (آرژنین)

۱. Preproleader