الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق – كلية الزراعة
قسم التقانة الحيوية

تنسيل مورثة العامل المحفز لنمو المحببات البشري GCSF والتعبير عنها في جراثيم الإشريكيا القولونية

Cloning and expression of human granulocyte colony stimulating factor in E. coli

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في كلية الزراعة – قسم التقانة الحيوية

إعداد

الطالب: أكرم الأحمر

إشراف

الدكتور مجد الجمالي

قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة

كلية الصيدلة - جامعة دمشق

2017 م

تصريح

أُصرح بأن هذا البحث **(عزل مورثة العامل المحفز لنمو المحببات البشري والتعبير عنها في جراثيم الاشريكيا القولونية)** لم يسبق أن قُدم للحصول على أية شهادة، ولا هو مُقدم حالياً للحصول على شهادة أخرى.

المرشح

أكرم جمال الأحمر

Declaration

This is hereby to declare that this work (**Cloning and expression of human granulocyte colony stimulating factor in E. coli**) has not been accepted for any degree or it is not submitted to any other degree.

Candidate

Akram Jamal Alahmar

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الأطروحة (**عزل مورثة العامل المحفز لنمو المحببات البشري والتعبير عنها في جراثيم الاشريكيا القولونية)** هو نتيجة بحث علمي قام به المرشح الطالب أكرم جمال الأحمر تحت إشراف الدكتور مجد الجمالي المدرس في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة، كلية الصيدلة- جامعة دمشق، وإن أية مراجع أخرى لباحثين آخرين ذكرت في هذا العمل موثقة في نص الأطروحة وحسب ورودها في النص.

Certificate

It is hereby to certify that this work described in this thesis (**Cloning and expression of human granulocyte colony stimulating factor in E. coli**) is the results of the author's own investigation under supervision of Dr. Majd Aljamali at the Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Damascus University. In addition, any other references mentioned in this work are documented in the text of other treatise.

Candidate	Supervisors
Akram Jamal Alahmar	Dr. Majd Aljamali

قدمت هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في التقانات الحيوية من كلية الهندسة الزراعية- جامعة دمشق. نوقشت هذه الرسالة يوم الأربعاء بتاريخ 2017/09/13 وأجيزت أمام لجنة الحكم المؤلفة من السادة الأساتذة:

أ.د. سلام لاوند عضواً

الأستاذ المساعد في قسم المحاصيل الحقلية- كلية الزراعة- جامعة دمشق.

د. مجد الجمالي عضواً مشرفاً

مدرس في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة- كلية الصيدلة- جامعة دمشق.

د. أنطونيوس الداود عضواً

باحث في الهيئة العامة للطاقة الذرية.

الجمهورية العربية السورية

جامعة دمشق

قرار مجلس البحث العلمي والدراسات العليا رقم / ٢١٧٧/ المتخذ بالجلسة رقم /٢١/ تاريخ ٢٠١٧/٧/٣

اطلع مجلس البحث العلمي والدراسات العليا على قرار مجلس كلية الزراعة رقم /٧٣٢/ تاريخ ٢٠١٧/٦/٨ .

وبعد الرجوع إلى اللائحة التنفيذية لقانون تنظيم الجامعات الصادرة بالمرسوم /٢٥٠/ لعام ٢٠٠٦ .

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /٣٧/ص.م تاريخ ٢٠١٤/١٢/٦ بشأن الموافقة على تسجيل رسالة الطالب .

قرار مجلس جامعة دمشق رقم /٧٥٥/ص.م تاريخ ٢٠١٦/٢/١٨ بشأن الموافقة على إلغاء تسمية مشرف مشارك .

وبنتيجة المذاكرة قرر مجلس البحث العلمي والدراسات العليا :

الموافقة على تأليف لجنة الحكم على رسالة الماجستير في التقانات الحيوية التي أعدها الطالب **أكرم الأحمر** بعنوان : ((تنسيل مورثة العامل المحفز لنمو المحببات البشري والتعبير عنها في جراثيم الاشريكيا القولونية)) بكلية الزراعة من السادة الأساتذة :

د. سلام لاوند	الأستاذ المساعد في قسم المحاصيل الحقلية	كلية الزراعة
جامعة دمشق	الاختصاص: بيولوجيا جزيئية	عضواً
د. مجد الجمالي	مدرس في قسم الكيمياء الحيوية والأحياء الدقيقة	كلية الصيدلة
جامعة دمشق	الاختصاص : تقانة حيوية	عضواً مشرفاً
د. أنطونيوس الداوود	باحث في الهيئة العامة للطاقة الذرية	عضواً
	الاختصاص: الهندسة الوراثية	

وذلك وفق ما هو وارد في قرار مجلس الكلية آنف الذكر،،،

ملاحظة: يرجى إرسال نسخة عن الإعلان الخاص بتحديد موعد المناقشة فور صدوره إلى مكتب نائب رئيس الجامعة لشؤون البحث العلمي والدراسات العليا.

شكر وعرفان

- كلية الزراعة ممثلة بالأستاذ الدكتور العميد عبد الوهاب مرعي والوكيلين العلمي والإداري
- قسم التقانة الحيوية ممثلاً بكافة أعضاءه، وعلى رأسهم رئيس القسم الأستاذ الدكتور عماد عيسى المحترم.
- هيئة التقانة الحيوية ممثلة بمديرها الأستاذ الدكتور عصام قاسم المحترم على استضافتهم للأعمال المخبرية المتعلقة بهذا البحث، ونخص بالشكر مخبر الأبحاث المناعية والصيدلانية بكافة كوادره وباحثيه.
- والشكر الجزيل للجنة الحكم على تفضلها بقبول تحكيم هذه الأطروحة برئاسة الأستاذة القديرة الدكتورة سلام لاوند وعضوية الأستاذ المتميز الدكتور أنطونيوس الداود.
- والشكر الموصول للأخ والمعلم والصديق الدكتور الفاضل مجد الجمالي على قبوله الإشراف على هذا البحث وعلى كل التوجيهات والجهود التي بذلها خلال السنوات الماضية بكل إخلاص وأمانة ورحابة صدر.
- شكر خاص للأشخاص الذين بدون دعمهم ومساعدتهم ما كانت لتتم العديد من الأعمال في هذا البحث (الأستاذ العزيز الدكتور شادي سكرية، الزميل الصيدلاني غمكين حسن، المهندس عبد الحكيم برمو)
- الإمتنان العميق لمخبر البحوث في كلية العلوم وللعاملين فيه وعلى رأسهم الأستاذتان مريم وعائشة ولكل الأشخاص الذين ساعدوا في إتمام هذا العمل(المهندس إياد ديب، الزميل الصيدلاني محمد جاموس، المهندس إبراهيم قادوس،المهندس مازن شعبان).

إهداء

- إلـــى الجبل الشامخ والقلب المعطاء أبي العزيز.
- إلـــى نبع الحنان وشمس الأمان أمي الغالية.
- إلـــى إخوتي أدهم وأيهم وبشار.
- إلـــى زوجتي الحبيبة وطفلي العزيزين.
- إلـــى أصدقائي في كل مكان.
- إلى مدينتي العزيزة التل.

جدول المحتويات

جدول المحتويات 2

فهرس الجداول 6

فهرس الأشكال 7

قائمة الاختصارات 10

الملخص باللغة العربية 13

الملخص باللغة الإنجليزية 14

الدراسة المرجعية 16

1.تمهيد 17

2.السرطان 18

1.2.تعريفه 18

2.2. أنواعه 19

3.2. وبائيات السرطان 20

4.2.علاج السرطان 21

1.4.2.العلاج البيولوجي 22

1.1.4.2.العلاجات المستهدفة للسرطان 24

2.1.4.2. العلاج المناعي "العلاج المعدل للاستجابة البيولوجية " 24

1.2.1.4.2.أشكال العلاج المناعي 24

2.5 الآثار الجانبية لعلاج السرطان 26

3.العامل البروتيني المحفز لنمو المحبيات البشري 28

1.3.التعريف بالبروتين GCSF وبنيته 28
2.3. أهم الاستعمالات االسريرية للبروتين GCSF 31
3.3.منظومات التعبير المورثي للبروتين 33
1.3.3.في بدائيات النوى 33
1.1.3.3. مراحل تأشيب الDNA في بدائيات النوى 34
2.1.3.3. تعديلات على بنية البروتين المأشوب عند E. coli 35
2.3.3. إنتاج البروتين GCSFعند حقيقيات النوى Eukaryotes 39
4.3. الأشكال الدوائية العالمية لبروتين GCSF..... 40
1.4.3. Filgrastim 40
1.1.4.3. تعريفه 40
2.1.4.3.الاستخدامات العلاجية 41
3.1.4.3.المحاذير و الآثار الجانبية 41
2.4.3. Pegfilgrastim 42
1.2.4.3. تعريفه 42
2.2.4.3.استخداماته العلاجية 43
3.4.3. TBO-Filgrastim (XMO2-Filgrastim)..... 43
5.3.دراسات سريرية عن الأهمية االعلاجية للبروتين GCSF 43
مبررات البحث 47
مواد البحث وطرائقه 48
3.اصطناع تسلسل الدنا المتمم 52
4.تضخيم مورثة GCSF بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي 52
5.ترحيل نواتج تضخيم ال DNA على هلامة الآغاروز 55

6.استخلاص الدنا من هلامة الآغاروز 56
7 .تأشيب DNA المورثة GCSF داخل البلاسميد 56
1.7. البلاسميدات 56
1.1.7 . البلاسميد PTZ57R/T 56
2.1.7 . البلاسميد pET-15b 58
1.2.1.7. البلاسميد pET-15b/GCSF المؤشب 59
1.1.2.1.7. تقطيع المورثة والبلاسميد باستخدام أنزيمات التقييد 59
2.1.2.1.7. ربط المورثة إلى البلاسميد 59
2.7. استحالة الجراثيم 60
1.2.7. السلالات الجرثومية 60
2.2.7. تحضير الخلايا الجرثومية ذات الكفاءة 61
3.2.7. تحضير محلول الزرع العقيم 62
4.2.7. تحضير أقراص البتري 62
5.2.7. التحول البكتيري الحراري 62
6.2.7. استنبات الجراثيم المحولة على أطباق بتري 63
1.6.2.7 زرع الجراثيم المستحالة الحاوية على البلاسميد المؤشب PTZ57RT/ GCSF 63
6.2.6. 2 زرع الجراثيم المستحالة الحاوية على البلاسميد المؤشب pET-15b/GCSF 64
8.دراسة التعبير المورثي 65
1.8. استفراد النسائل الجرثومية المستحالة وإعادة استنباتها على أوساط سائلة 66
2.8. عزل ال DNA البلاسميدي من وسط الاستنبات 67
3.8. استخلاص ا لشدفة المورثية من البلاسميد بعد تقييده بأنزيمات القطع 67
9. سلسلة الدنا 68

10. تحريض التعبير البروتيني 68
11.الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلامة عديد الأكريلاميد 70
النتائج 75
1.عزل الرنا المرسال من خلايا متنوعة 76
3.اصطناع التسلسل المتمم 78
4.عزل المورثة المشفرة للبروتين المحفز لنمو المحببات GCSF 78
1.4.ترحيل تواتج مضاعفة ال cDNA الناتج عن الأنماط الخلوية المتنوعة 78
2.4.ترحيل نواتج مضاعفة ال cDNA الناتج عن البالعات المتمايزة Macrophage 79
5. تنقية المورثة GCSF من الهلامة 80
6.ربط المورثة GCSF مع نواقل بلاسميدية مختارة وتنسيل البلاسميدات المأشوبة 80
1.6. ربط المورثة مع البلاسميد PTz57R/T 80
2.6. ربط المورثة مع البلاسميد pET15-b 82
7. تحليل تسلسل المورثة GCSF 84
8. التعبير البروتيني 89
المناقشة 92
الملاحق 99
1. المواد المستخدمة 100
2.الأدوات 100
3.التجهيزات 101
4.المواد الكيميائية 102
5.البرمجيات 103
المراجع العلمية 105

فهرس الجداول LIST OF TABLES

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات النوعية للمورثة 53

الجدول(2): أحجام المواد الداخلة في تفاعل HF-PCR 53

الجدول(3).يوضح الشروط الضرورية لتفاعل ال PCR..... 54

الجدول(4).أحجام المواد الداخلة في تفاعل تقطيع المورثةGCSF والبلاسميد pET-15b 59

الجدول(5) . السلالات البكتيرية المستخدمة في التنسيل والتعبير البروتيني للمورثة GCSF 60

الجدول(6) .أحجام المواد الداخلة في تفاعل ال PCR مقدرة بـ ميكروليتر 65

الجدول(7). الشروط اللازمة لتفاعل ال PCR. 65

الجدول(8).أحجام المواد الداخلة في تفاعل تقطيع البلاسميد المأشوب المستخلص مقدرة بميكروليتر. 67

الجدول(9). تراكيز و أحجام المواد الداخلة في تحضير 10 مل من هلامة التركيز 5%. 70

الجدول(10).تراكيز و أحجام المواد الداخلة في تحضير 10 مل من هلامة الفصل 15% 71

الجدول(11).تراكيز وأحجام المواد الدخلة في تحضير دارئة معالجة العينة اللازمة لتحضير 71

الجدول(12).مكونات دارئة الرحلان..... 72

الجدول(13).الأحجام والكميات اللازمة لتحضيرملون أزرق الكومازي 72

الجدول(14).المواد المكونة لمزيل اللون 73

الجدول (15).العتائد المستخدمة ومصدرها 100

الجدول(16).الأدوات المستخدمة ومصدرها 100

الجدول(17).التجهيزات المستخدمة ومصدرها 101

الجدول(18).المواد الكيميائية المستخدمة في البحث ومصدرها 102

الجدول(19).البرمجيات المستخدمة 103

فهرس الأشكال LIST IF FIGURES

الشكل 1. مقارنة بين مواصفات الخلية الطبيعية والخلية السرطانية 19

الشكل 2. تنوع الأشكال الخلوية للأورام الخبيثة 20

الشكل 3. مسببات الوفاة الرئيسية عالمياً وموقع السرطان منها 21

الشكل 4. موقع الأدوية البيولوجية بين الأدوية الأكثر مبيعاً عالمياً 22

الشكل 5. مبيعات الأصناف الدوائية البيولوجية الأهم في العالم 23

الشكل 6. الأدوية البيولوجية العشرة الأكثر مبيعاً في الولايات المتحدة للعام 2016 23

الشكل 7 . تمايز الخلية الجذعية المكونة للدم إلى االخلايا الدموية..... 26

الشكل 8. الأمراض الناجمة عن انخفاض انتاج المكونات الدموية بسبب تثبيط نقي العظم 27

الشكل 9. تسلسل الأحماض الأمينية المكونة للبروتين الناضج GCSF المكون من 174 حمض أميني..... 29

الشكل 10. البنية الثالثية للبروتين 30

الشكل 11. ارتباط البروتين GCSF بشكل مثنوي بمستقبله على سطح الخلايا الهدف 31

الشكل 12. الإستعمالات السريرية المتنوعة للبروتين المحفز لنمو المحببات GCSF 32

الشكل 13. تسلسل نكليوتيدات المورثة المشفر للعامل المحفز لنمو المحببات GCSF 33

الشكل 14. يوضح مراحل التأشيب البروتيني داخل جراثيم الإشريكية القولونية 34

الشكل 15. زيادة التعبير المورثي عن البروتين GCSF باستخدام نوقل تحوي المحضض lac promoter 35

الشكل 17. اللصاقة التجارية للبروتين المؤشب GCSF تحت اسم NEUPOGEN 41

الشكل 18.البروتين المؤشب GCSF الحاوي على PEG تحت الإسم التجاري Neulasta 42

الشكل 19.ارتفاع معدلات الإصابة بالحمى الحرورية لدى المرضى غير المتلقين للبروتين GCSF مقارنة بالمرضى المتلقين للبروتين المؤشب GCSF 45

الشكل 20. شكل ترسيمي لتثفيل الدم مع الفيكول وانفصاله إلى طبقات متعددة..... 50

الشكل 21. يوضح المواد الداخلة في تفاعل ال PCR ومراحل التضاعف.....54

الشكل 22..خارطة مفصلة لبلاسميد التعبير المورثي /PTZ57R 57

الشكل 23. خارطة البلاسميد pET-15b 58

الشكل 24. التقصي الأزرق-الأبيض على سطح أطباق البتري 64

الشكل 25. نواتج تثفيل الدم على مدروج ال Ficol 76

الشكل 26. الخلايا الوحيدات النوى بعد فصلها على وسط الفيكول وقبل استنباتها وتمايزها 77

الشكل 27. الخلايا الوحيدات Monocytes بعد استنباتها. 77

الشكل 28. صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1% لنواتج تضاعف التسلسلات المتممةcDNA 78

الشكل 29. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1% للتسلسل المتمم(المعزول من البالعات الكبيرة) المضاعف بواسطة HF-PCR 79

الشكل 30. .قص العصابات الموافقة بالطول لطول المورثة GCSF من الهلامة 80

الشكل 31. التقصي الأزرق - الأبيض للجراثيم المأشوبة DH10B الحاوية على البلاسميد PTz57R/T الرابط للمورثة GCSF 81

الشكل 32. الترحيل على هلامة الأغاروز 1% لنواتج مضاعفة المورثة المأشوب داخل الجراثيم المستحالة البيضاء 81

الشكل 33. النمو الجرثومي على أطباق البتري للجراثيم DH10B المستحالة بالبلاسميد المأشوب pET-15b GCSF. 82

الشكل 34. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لنواتج تضاعف المورثة GCSF داخل 16 نسيلة جرثومية مستحالة ، مستفردة من طبق الزرع.....83

الشكل 35. الترحيل على هلامة الأغاروز لنواتج تنقية البلاسميد المأشوب pET-15b GCSF والمضخم بـ PCR 83

الشكل 36. الترحيل على الهلامة لنواتج قطع البلاسميد المأشوب pET-15b GCSF باستخدام أنزيمي القطع BamHI و XbaI 84

الشكل38.مطابقة نواتج السلسلة الناتجة باستخدام المرئسة الأمامية 85

الشكل 39. ناتج سلسلة المورثة GCSF في جهاز السلسلة باستخدام المرئسة الخلفية Primer Reverse. 86

الشكل 40.مطابقة نواتج تراصف السلسلة الناتجة باستخدام المرئسة الخلفية مع التسلسل المخزن في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI باستخدام برنامج BLAST..... 86

الشكل 41. ناتج تراصف التسلسلات النكليوتيدية باستخدام المرئستين الأمامية والخفية ومطابقتها مع التسلسل النكليوتيدي الكامل لمورثة GCSF. 87

الشكل 42. تراصف ناتج الترجمة الافتراضية للتتالي النكليوتيدي المؤشب مع تتالي الحموض الأمينية لبروتين GCSF 88

الشكل 43. يُوضّح القطع الإنزيمي الإفتراضي للبروتين المأشوب في دراستنا بين الحمضين الأمينين الألانين 18 و الثريونين 19.....

الشكل 44. .نمو الجراثيم E. coli BL21 المستحالة بالبلاسميد المأشوب pET-15b GCSF بعد الحضن لمدة 48 ساعة بالدرجة 37°. 89

الشكل 45. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لنواتج تضاعف المورثة GCSF داخل نسيلتين مستفردتين من جراثيم التعبير البروتيني المستحالة E. coli Bl21 90

الشكل 46. الرحلان الكهربائي العامودي على هلامة الأكريل أميد 15% SDS-PAGE ،لنواتج التعبير عن البروتين GCSF داخل جراثيم E. coli BL21..... 90

الشكل 47. الرحلان الكهربائي العامودي على هلامة الأكريل أميد 15% SDS-PAGE ، لنواتج التعبير عن البروتين GCSF داخل جراثيم E coli BL21..... 91

قائمة الاختصارات LIST OF ABBREVIATIONS

الاختصار	المصطلح باللغة العربية	المصطلح باللغة الإنجليزية
GCSF	العمل المحفز لنمو المحببات البشري	Granulocyte Colony Stimulating Factor
FDA	هيئة الغذاء والدواء الأمريكية	USA Food and Drug administration
NCCN	الشبكة العالمية لمقارنة أمراض السرطان	National Comprehensive Cancer network
NCI	منظمة السرطان الدولية	National Cancer institute
IL-11	الإنترلوكين 11	Interleukin 11
HSC_S	الخلية الجذعية المولدة للدم	Hematopoietic stem cell
IPTG	إيزو بروبيل بيتا ثيو غالاكتوبيرانوزايد	Iso Propyl β-D-1-thiogalactopyranoside
SDF	عامل المحفز للخلايا السدوية	Stromal Cell derived Factor
NAID	الهيئة الدولية للأمراض المزمنة والتحسسية	National institute of allergy and Instruction disease
MNC_S	الخلايا وحيدات النوى	Mononuclear Cells
PCR	نفاعل البوليمراز المتسلسل	Polymerase Chain Reaction
AML	متلازمة ابيضاض الدم النقوي الحاد	Acute Myeloid Leukemia

DNA	الحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين	Deoxy Ribo Nucleic Acid
cDNA	التسلسل المتمم للحمض النووي الريبي منقوص الأوكسجين	Complementary Deoxy Ribo Nucleic Acid
RNA	الحمض النووي الريبي	Ribo Nucleic Acid
mRNA	الحمض النووي الريبي الرسول	Messenger Ribo Nucleic Acid
WBC	خلايا الكريات البيض	White Blood Cell
WHO	منظمة الصحة العالمية	World Health Organization
EDTA	ثنائي ايتلين رباعي حمض الليمون	Ethylene Diamine Tetra Acetic Acid
ACS	مؤسسة السرطان الأمريكية	American Cancer Society
BCG	سرطان المثانة	Bacille Calmette Guerin
FN	متلازمة فقر العدلات المترافق مع حمى حرورية	Febrile Neutropenia
ANC	تعداد العدلات المباشر	Absolute Neutropenia Count
ICHS	منظمة المناعة المجتمعية	Immuno Compromised Host Society
mPEG	أحادي ميتلين عديد الإتيلين غليكول	mono methoxy Poly Ethylene Glycol
hr-GMcSF	العامل البروتيني المحفز لنمو المحببات البشري المؤشب من البالعات الكبيرة	Human recombinant granulocyte macrophage colony stimulating factor

MSC	خلايا جذعية بشرية ميزانشمية	Mesenchymal Stem Cells
SSC	خلايا جذعية بشرية سدوية	Stromal Stem Cells
APS	كبريتات الأمونيوم	Ammonium per sulfate
SDS	فوسفات دودوسيل الصوديوم	Sodium Dodecyl Sulfate
TEMED	رباعي ميتيل ايتلين	Tetra Methyl Ethylene Diamine
LB	وسط مغذي لوريا بيرتني	Luria Bertani
PBS	دارئة ملحية فوسفاتية	Phosphate Buffered Saline
NCBI	مركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية	National Center for Biotechnology Information

الملخص:

يُعدّ العلاج البيولوجي أحد أحدث التدابير العلاجية للسرطان وأكثرها نجاعةً وفعاليةً، إلا أن كلفته الباهظة وصعوبة الحصول عليه تحدّ من استخدامه على نطاق واسع. هدف بحثنا إلى تنسيل العامل البروتيني المحفِّز لنمو المحببات البشري GCSF الذي يعمل على تحفيز انقسام وتمايز العدلات داخل نقي العظم وتحررها في الدم، ويُستطب في وقاية مرضى السرطان المثبطين مناعياً من الأخماج المتكررة نتيجة تلقّيهم العلاج الكيميائي أو الشعاعي.

أجري تفاعل PCR لتضخيم الDNA المتمم لـ RNA المستخلص من خلايا الغلالة البيضاء المستنبتة مخبرياً باستخدام مرئسات نوعية لمورثة GCSF، وظهر ناتج تضخيم بالطول المتوقّع 670 pb بعد ترحيل نواتج التضخيم على هلامة الأغاروز 1 %. رُبط ناتج التضخيم مع بلاسميد من النمط (pET15-b) باعتماد التنسيل المُوجَّه، واستخدم البلاسميد المؤشب في استحالة سلالة خاصّة من جراثيم الإشريكية القولونية المُهيَّئة. تم التأكد من هوية المورثة المؤشب بتفاعل السَلسَلة وخلوه من الطفرات باستخدام البلاسميد المنقى من إحدى المستعمرات الجرثومية إيجابية التنسيل. كُشِفَ عن التعبير المورثي لمورثة GCSF في الجراثيم بواسطة الرحلان الكهربائي للبروتين على هلامة الأكريل أميد 15%، حيث ظهرت عصابة بروتينية متوافقة مع الوزن الجزيئي المتوقع للبروتين(18.8 كيلو دالتون) وزادت كثافتها بعد التحريض.

تشير نتائجنا إلى نجاح تنسيل مُنتسَخ مورثة GCSF في الجراثيم وحصولنا على سلالة جرثومية تعبّر عن العامل المحفّز لنمو المحببات، والتي يمكن أن تشكّل ركيزة لإنتاج البروتين العلاجي في المستقبل القريب على المستوى الصناعي.

الكلمات المفتاحية: مورثة GCSF، السرطان، تنسيل، تعبير مورثي.

ABSTRACT:

Biological therapy is considered as one of the most recent and effective tool for cancer management. However, due to a high cost and unavailability, the use of biological therapy is extremely limited. Our research aims to clone granulocyte colony stimulating factor, which promotes proliferation and differentiation of neutrophils within bone marrow and their release into peripheral blood, wich is believed to protect immune-compromised cancer patients from recurrent infections resulting from chemo- and radiotherapies.

Polymerase chain reaction (PCR) was performed to amplify complementary DNA from an RNA sample to cultured buffy coat cells using GCSF specific primers, resulting in the expected 670 bp band on a 1% agarose gel. The amplification product was ligated to pET15-b plasmid using directional cloning, and the recombinant plasmid was used to transform competent *E. coli* bacteria. The gene identity was verified by sequencing the plasmid purified from one cloning positive bacterial colony. Gene expression of GCSF in bacteria was demonstrated using protein on 15% poly acrylamide gel, as a protein band corresponding to the expected molecular weight appeared with an increasing density upon induction.

Our results indicate the success of GCSF cloning, obtaining a bacterial strain that expresses GCSF protein that could constitute a solid start to produce the therapeutic protein at an industrial level in the near future.

Key words: Cloning .Gene Expression, GCSF.

الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

1. تمهيد Preface:

يُعدّ السرطان بمختلف أشكاله العامل الثاني الأكثر تسبباً بالوفاة عالمياً. وتتعدد أشكال معالجة السرطان من كيميائية إلى إشعاعية وبيولوجية، ولكل شكل منها آثاره الجانبية السامة بالنسبة للمريض المتلقي، حيث تؤثر الأشكال العلاجية على أنسجة وأعضاء متعددة داخل الجسم أثناء محاربتها للورم الناشئ.

من جهةٍ أخرى، يُعدّ تثبيط نقي العظم وما يرافقه من انخفاض عام وحاد وشامل في مختلف المكونات الدموية (HMS_c) الأثر الجانبي الأكثر مباشرةً وحدوثاً وخاصةً لدى المرضى المتلقين للعلاج الكيميائي. وينجم عن هذا الانخفاض تدهور في الاستجابة المناعية لدى المرضى يؤدي لاستباحة الجسم بمختلف العوامل الانتانية. وقد أثبتت الدراسات السريرية الحديثة أهمية دعم القدرة المناعية لدى مرضى السرطان المتلقين للعلاج الكيميائي أو الاشعاعي.

يُمهد هذا البحث للحصول لاحقاً على البروتين المحفز لنمو المحببات البشري، والذي يُعدّ محفزاً قوياً لنمو وانقسام العدلات وتمايزها داخل نقي العظم، مما يؤدي إلى رفع مناعة مرضى السرطان المثبطين مناعياً ويسمح لهم بتلقي العلاج بشكل مستمر ومنتظم ويساعدهم على تجنب الأمراض الناتجة عن ضعف المناعة.

2. السرطان:

1.2. تعريفه:

يُشير السرطان إلى عائلة كبيرة من الأمراض تتضمن نمو غير طبيعي للخلايا مع قدرة على الانقسام والانتقال لأجزاء أخرى من الجسم، والتي قد تصيب كافة خلايا الجسم[44].

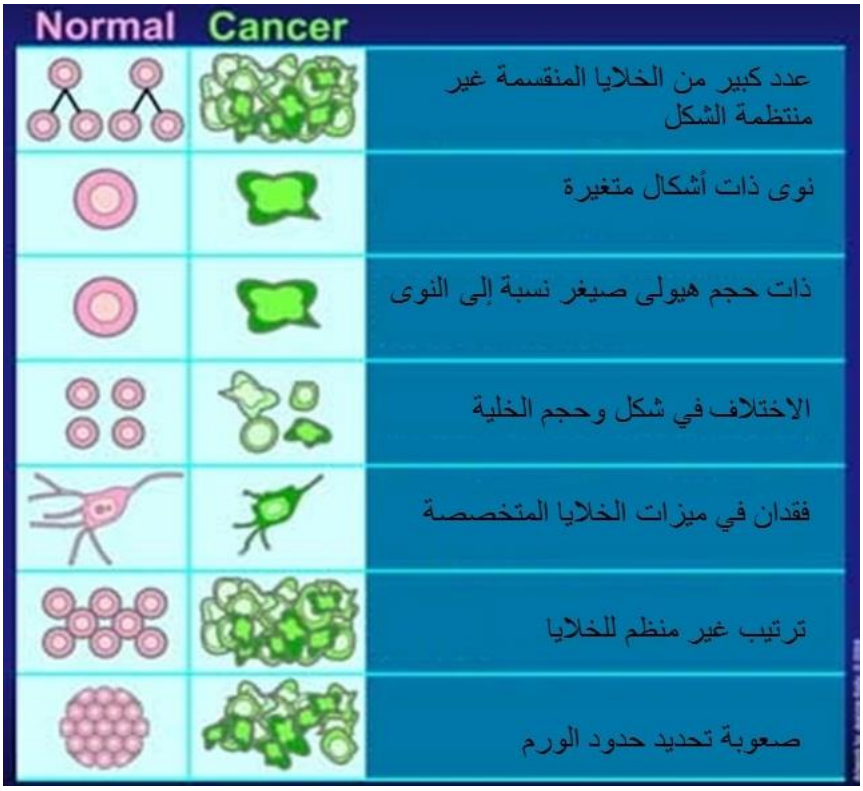
وتصنف الخلايا البشرية كخلايا سرطانية عندما تنطبق عليها المعالم التالية(الشكل .1)[45] :

- تكاثر وانقسام الخلايا العشوائي بغياب إشارات انقسام صحيحة.
- استمرار الانقسام والنمو حتى بوجود إشارات توقف.
- غياب قدرة الموت المبرمج لدى الخلايا.
- عدد انقسامات الخلايا لا نهائي.
- تشكيل تفرعات من الأوعية الدموية لتغذية الورم الناشئ.
- غزو الأنسجة وتشكيل بؤر سرطانية جديدة (***Metastasis***).

تتوزع أسباب نشوء الورم [46] إلى:

1. عوامل بيئية: تشكل نحو 90% (العدوى، الاشعاعات، ، الكحول، التبغ).

2.عوامل وراثية : نحو 10%.

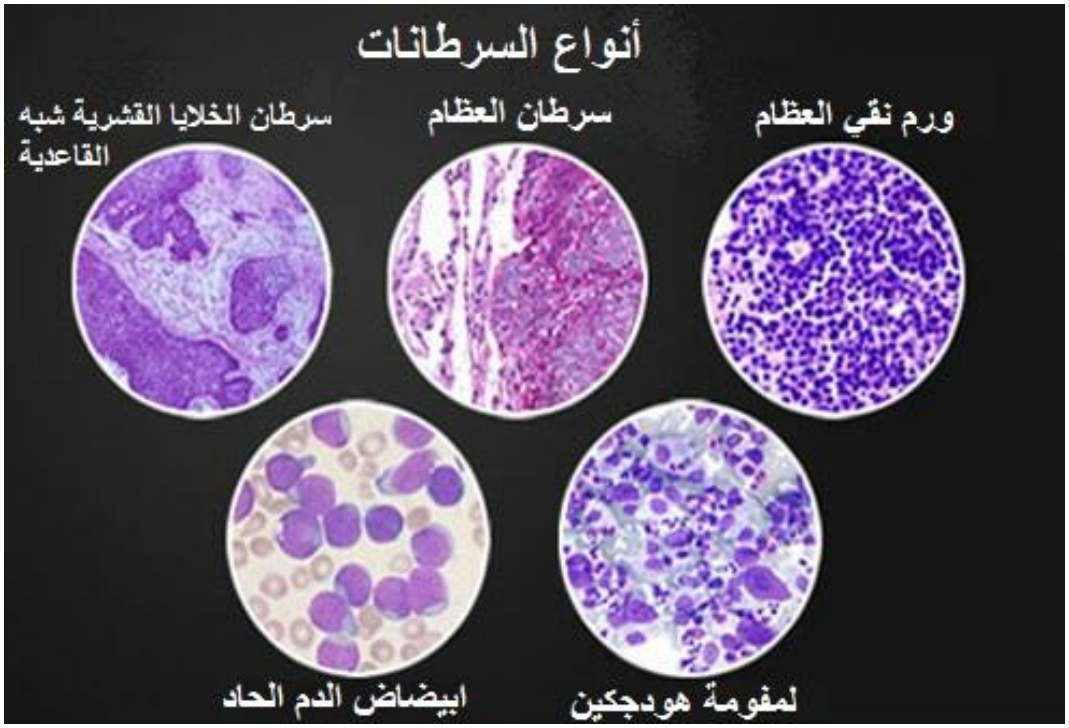


الشكل 1. مقارنة بين مواصفات الخلية الطبيعية والخلية السرطانية، مُعدَل من المرجع [2].

2.2. أنواعه[47]:

صنف السرطان إلى (الشكل.2):

- **كارسينوما (Carcinoma)**: الناشئ في الخلايا الظهارية ومنه (الثدي، البروستات، الرئة، البنكرياس، الكولون).
- **ساركوما(Sarcoma)** : الناشئ في خلايا النسج الضامة (عظام، غضاريف، دهون، ألياف عصبية).
- **سرطانات اللمف والدم (Leukemia and Lymphoma)**: تنشأ من الخلايا المكونة للدم، والتي تغادر نقي العظم لتنضج في الدم والغدد اللمفاوية.
- سرطان الخصية والمبيض (**Germcell Tumor**).
- ورم الأرومة(**Blastoma**).



الشكل 2. تنوع الأشكال الخلوية للأورام الخبيثة،مقتبس من المرجع [4].

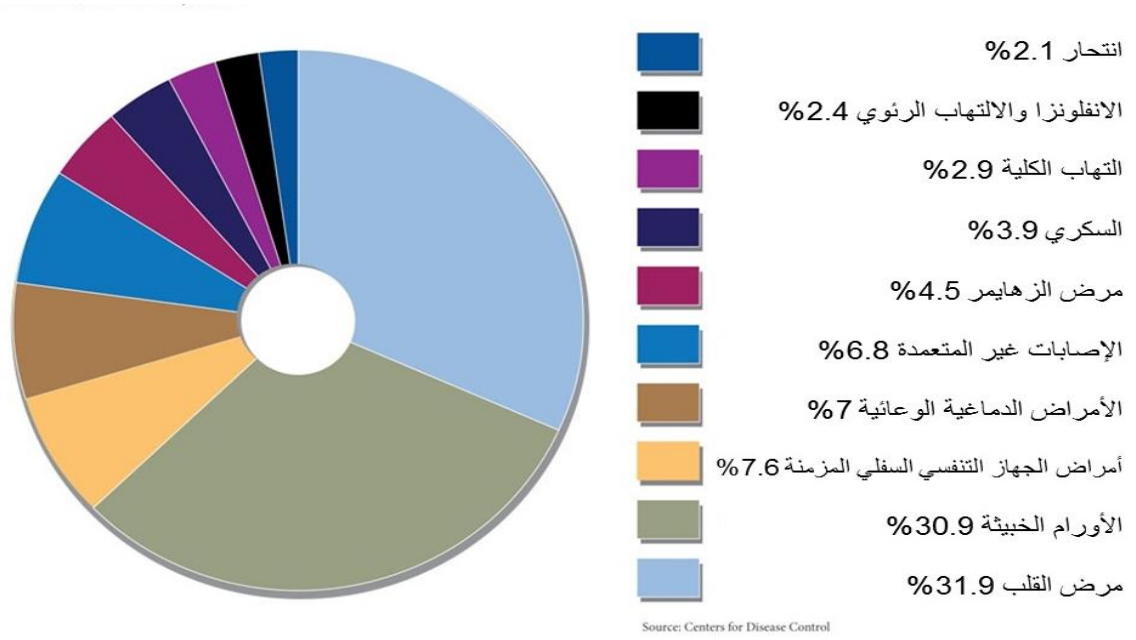
3.2. وبائيات السرطان Cancer Epidemiology:

يُعد السرطان المسبب الثاني الأكثر قتلاً في الولايات المتحدة الأمريكية حيث أن 1 من كل 4 من الأشخاص يموت بالسرطان[46]. وقد اكتشفت 1.7 مليون حالة في العام 2016 توفي منها 595000.

وبحسب منظمة الصحة العالمية فإنه قد تم الكشف عن 14 مليون إصابة حول العالم بمختلف أنواع السرطان في العام 2016 توفي منهم 8.2 مليون , ومن المتوقع أن تزداد الإصابات بالسرطان بنحو 70 % خلال العقدين القادمين(الشكل.3) وبلغ الاتفاق الإجمالي على سبل علاج السرطان 125 مليار دولار في العام 2012, ومن المتوقع أن يبلغ 156 مليار دولار في العام 2020[48].

وتحتل سورية حسب التقارير الإحصائية لمنظمة الصحة العالمية المنشورة في العام 2014 المرتبة 88 عالمياً في نسبة انتشار مرض السرطان و تبلغ هذه النسبة 105.94/100000نسمة[49]،علماً أن أخر

إحصائية رسمية مسجلة لوزارة الصحة السورية في العام 2009 اعتبرت السرطان المرض السابع الأكثر شيوعاً في القطر بنسبة 4.6% والمسبب الثالث للوفيات بنسبة تبلغ 7%من مجمل الوفيات [50]،بينما أشارت تقارير منظمة الصحة العالمية المسجلة عن سورية لارتفاع هذه النسبة في أواخر العام 2012 لتصل نسبة الوفيات بالسرطان إلى 10% من مجمل الوفيات العامة في سورية[51].



الشكل 3. مسببات الوفاة الرئيسية عالمياً وموقع السرطان منها، مقتبس من المرجع [4].

4.2.علاج السرطان:

يتنوع علاج السرطان حسب نمطه، ومنطقة إصابته، وشدته [49] إلى:

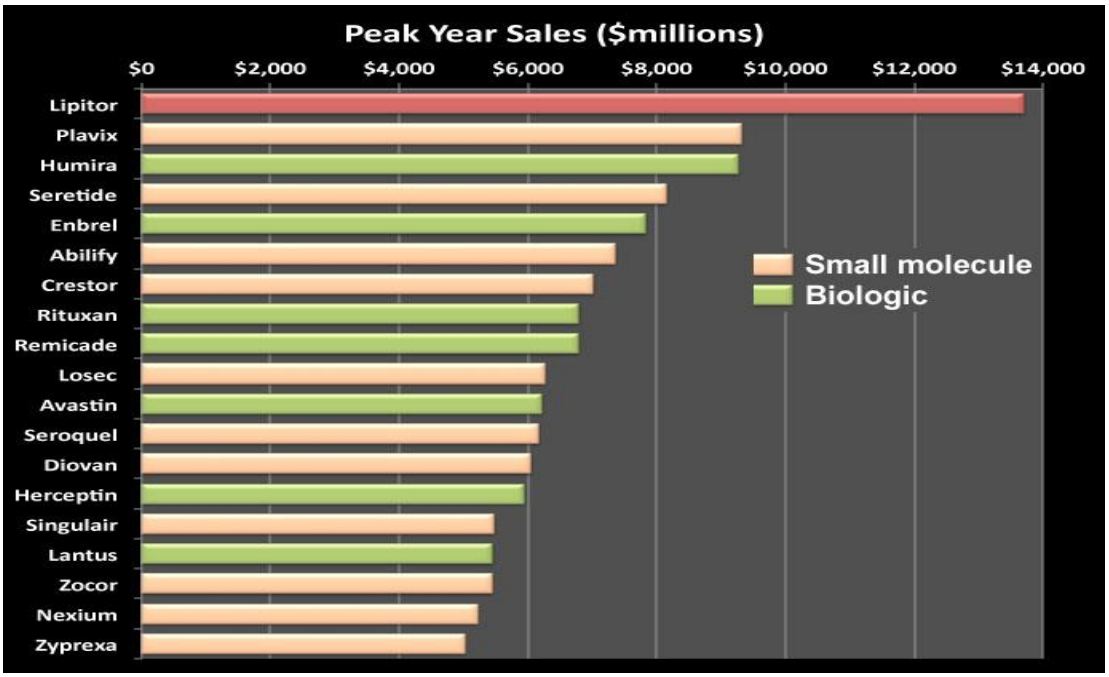
1. إشعاعي Radiation.
2. كيميائي Chemotherapy.
3. جراحي Surgery.
4. تلطيفي Pallalive care.
5. بيولوجي Biological.

وسنتوسع في نوع العلاج الأخير المرتبط بموضوع بحثنا.

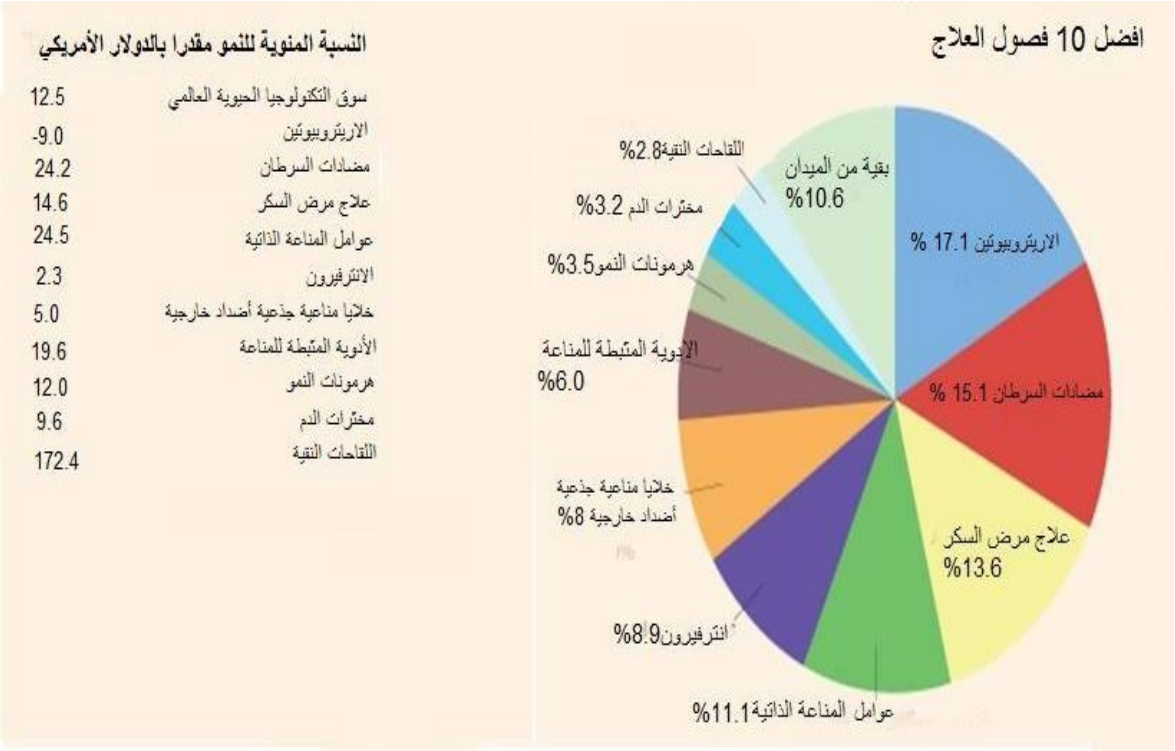
1.4.2. العلاج البيولوجي:

يُعرف العلاج البيولوجي بأنه المادة المستخلصة من الكائن الحي أو مشتقاته والمستخدمة في الوقاية والتشخيص والعلاج في أمراض عديدة أهمها السرطان[47]. ويستخدم العلاج البيولوجي لدى مرضى السرطان لعلاج السرطان بحد ذاته أو لمعالجة الآثار الجانبية الناتجة عن تلقي علاجات أخرى وتشمل الأضداد والانترلوكينات واللقاحات ومواد أخرى .

وتُعدّ الأدوية البيولوجية هدفاً واعداً لشركات الرعاية الصحية الصيدلانية. وقد أعلنت Evulate pharma المتخصصة بسوق قطاع الأدوية البيولوجية الحيوية أنه في العام 2016 كانت ستة من الأدوية العشرة الأكثر مبيعاً في العالم من الأدوية البيولوجية(الشكل.6)، لتشكل بذلك 75% من إيرادات بيع جميع الأدوية(الأشكال 4.5.6)، بعد أن بلغت مبيعاتها وفق نتائج العام 2006 الـ 57 مليار دولار في الأسواق الدوائية العالمية[52].



الشكل 4. موقع الأدوية البيولوجية بين الأدوية الأكثر مبيعاً عالمياً [11]



الشكل 5. مبيعات الأصناف الدوائية البيولوجية الأهم في العالم [47]

Orphan Drug	Marketer	Sales (M)
Avonex	Biogen	$1,707
Betaseron	Novartis & Bayer	$1,335
Ceredase/Cerezyme	Genzyme	$1,007
Enbrel	Immunex	$4,379
Epogen	Amgen	$2,503
Intron A/PEG-Intron	Schering	$1,074
Kogenate	Bayer	$1,070
Neupogen/Neulasta	Amgen	$3,923
Rituxan	Genentech	$3,972

الشكل 6. الأدوية البيولوجية العشرة الأكثر مبيعاً في الولايات المتحدة للعام 2016 [51]

يقسم العلاج البيولوجي[49] إلى قسمين:

1.1.4.2. العلاجات المستهدفة للسرطان(Targeted Cancer Therapies):

عبارة عن أضداد، أو أجزاء من مادة وراثية DNA أو RNA تستهدف الخلايا السرطانية مباشرة، وتتقاطع هذه العلاجات البيولوجية مع جزيئات محددة تشارك في نمو وتطور الخلايا السرطانية.

2.1.4.2 .العلاج المناعي "العلاج المعدل للاستجابة البيولوجية ":

(Immune therapy _ biological response modifier therapy)

وتعمل هذه العلاجات بعدة آليات [53] ومنها:

- تحفيز أجهزة المناعة لمهاجمة الخلايا السرطانية.
- تحوير الخلايا السرطانية لجعلها أكثر إتاحة لتلقي هجمات الخلايا المناعية.
- تغيير منحى نمو الخلايا السرطانية.
- تحفيز نمو الخلايا الطبيعية على حساب الخلايا السرطانية.
- دعم قدرة المناعة على مواجهة الآثار الجانبية الناجمة عن تلقي أنواع أخرى من العلاج.

1.2.1.4.2. أشكال العلاج المناعي : Types of immune therapy

1. أضداد وحيدة النسيلة: Monoclonal antibody

مصنفة ومحفزة لمُهاجمة أنواع سرطانية محددة وتدميرها بالتعرف على المستضدات السطحية و تصنف ضمن العلاج المباشر Target.

2. خلايا ناقلة للمستضدات :Adoptine cell transfer

تعمل على أخذ مستضدات سطحية من الخلايا الورمية وتعريف اللمفاويات الناشئة عليها لتصبح قادرة على مهاجمة الورم.

3. لقاحات السرطان: Cancer Vaccines

مثالها : جراثيم سل مضعفة تسبب استجابة مناعية ضد سرطانات المثانة عند حقنها بداخلها بواسطة قثطرة بولية.

4. السيتوكينات Cytokines :

والسيتوكسينات عبارة عن بروتينات تصنع أساساً في الجسم تلعب دوراً مهماً في تكوين الاستجابة المناعية الطبيعية ، ويتم اصطناعها مخبرياً بطرائق التأشيب البروتيني وتضم، الانترفيرونات Interferons التي تلعب دوراً في تحفيز الاستجابة المناعية ، ويمكنها مهاجمة الخلايا السرطانية مباشرةً لمنع نموها؛ والانترلوكينات Interleukins التي تحفز نمو الخلايا المناعية؛ بالإضافة إلى عدد من البروتينات المؤشبة Recombinant Proteins الأخرى كعوامل النمو المحفزة لتكاثر وتمايز خلايا الدم[13].

وقد استخدمت خلايا طلائعيات النوى *E. coli* أو حقيقيات النوى كالخميرة Yeast كمصنع لاصطناع العديد من البروتينات المؤشبة المستخدمة في أمراض عديدة كالسرطان [55] وغيره وأهمها(الشكل .7):

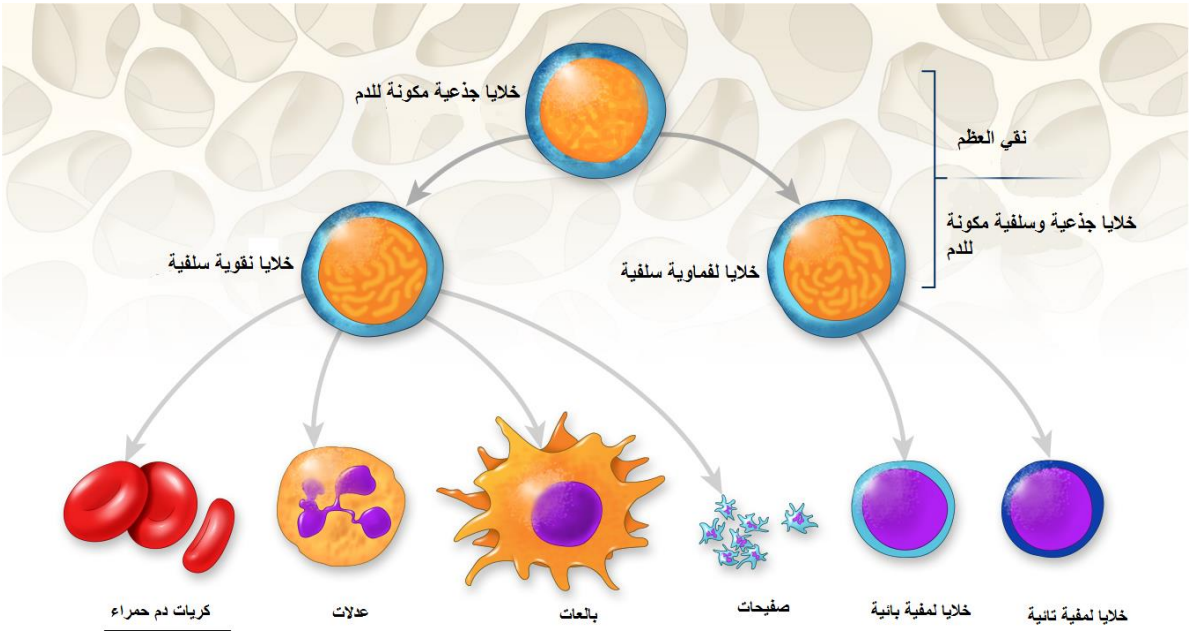
العامل المحفز لنمو المحببات GCSF: ويعمل على زيادة عدد الكريات البيضاء.

الإريتروبيوتين Erythropoietin : ويعمل على زيادة عدد الكريات الحمراء .

الإنترلوكين 11 (IL 11): ويعمل على زيادة عدد الصفيحات.

وتُعد هذه البروتينات المؤشبة ذات أهمية كبيرة في دعم قدرة المرضى على مجابهة السرطان رغم عدم مهاجمتها للخلايا السرطانية بصورة مباشرة.

وقد استخدمت منتجات التأشيب السابقة في معالجة حالات تثبط نقي العظم (Myelosuppression) والذي يُعد العرض الجانبي الأكثر شيوعاً لدى المرضى المتلقين للعلاج الكيميائي أو الاشعاعي[54].

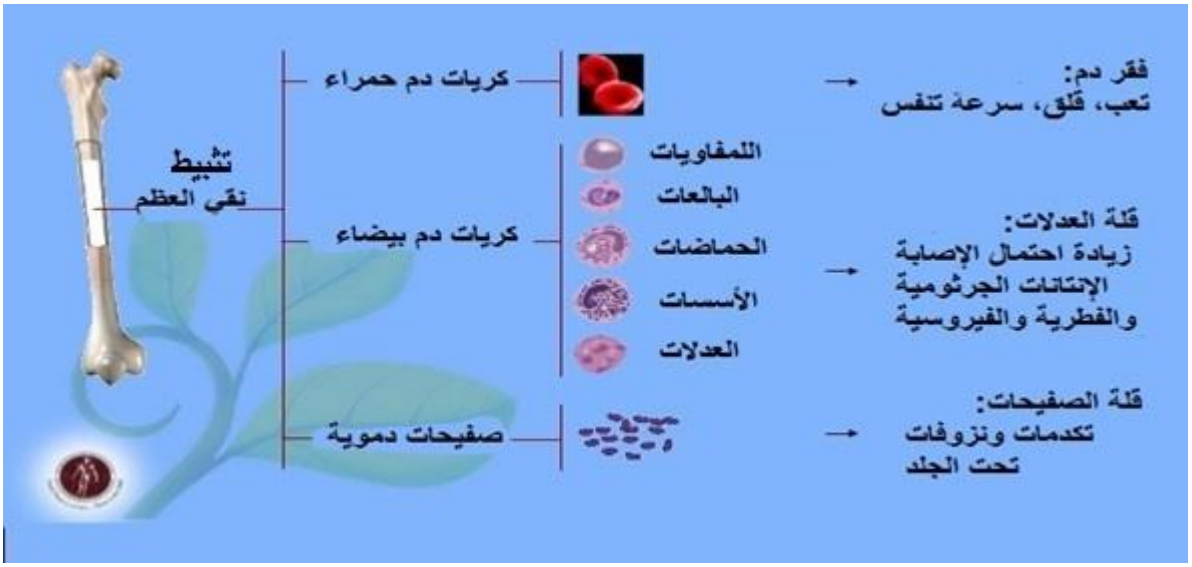


الشكل 7. تمايز الخلية الجذعية المكونة للدم إلى االخلايا الدموية ومواقع تأثير البروتينات المحفزة لها، مُقتبس من المرجع [55].

02.5 الآثار الجانبية لعلاج السرطان:

يُعدّ تثبيط نقي العظم Myelosuppression الأثر الجانبي الأهم للعلاج بالأدوية الكيميائية والشعاعية، وهو العرض الناجم عن تدمير نسيج نقي العظم نتيجة تعرضه للمواد الكيميائية أو الاشعاعية المستخدمة في علاجات السرطان والذي يُحدد بنقص إنتاج مختلف مكونات الدم[54] مؤدياً للإصابة بالأمراض التالية(الشكل.8):

- Anemia : انخفاض انتاج الكريات الحمراء(فقر الدم).
- Thrombocytopenia: انخفاض انتاج الصفيحات .
- Neutropenia : انخفاض إنتاج الكريات البيض والعدلات .



الشكل 8. الأمراض الناجمة عن انخفاض انتاج المكونات الدموية بسبب تثبيط نقي العظم،مقتبس من المرجع [55]

ويُشكل **مرض فقر العدلات Neutropenia** عبئاً إضافياً على مريض السرطان لما ينتج عنه من ترفعات حرورية و إصابات خمجية متكررة غالباً ما تستدعي تدخلات إسعافية متواصلة بالصادات الحيوية وقد تصل لمرحلة من الخطورة تقطع فيها تسلسل دورات العلاج الكيميائي لمريض السرطان أو تؤثر على حجم هذه الجرعات وتواترها[51].

وقد عُرفت المتلازمة السريرية الناتجة عن فقر العدلات الناجم عن تلقي العلاج الكيميائي المترافق مع ترفع حروري Febrile Neutropenia(FN) [48]، بأنها حالة الحمى لدى المرضى الذين يصبح لديهم:

العدد المطلق للعدلات (Absolute Neutropenia count): $ANC < 0.5 * 10^9$

وتكون الحرارة لديهم : $FN \geq 38.8^{\circ}$

مع تكرار درجة الحرارة هذه خلال 48 ساعة بشكل متواصل وتكرار هذا القياس كل 12 ساعة .

تتأثر حمى FN بنوع وشدة العلاج الكيميائي، وطبيعة ومدى المرض، واستخدام علاج شعاعي، ومراحل العلاج.

تحدث هذه المتلازمة عادةً بعد 3–7 أيام من تلقي العلاج الكيميائي [54] ، وتؤدي الإصابة بها إلى رفع معدلات الإصابة بالأخماج المهددة للحياة من 10 % إلى 28 %.

وفي دراسة Lyma وgray عام 2010 [54] لعينة عشوائية مؤلفة من 5990 مريضاً مصابين بأصناف عديدة من السرطان (لمفوما، ثدي، كولون، مستقيم)، تلقى هؤلاء المرضى علاجاً كيميائياً مثبطاً لنقي العظم.

قسمت الدراسة المرضى لمجموعتين إحداهما أصيبت بـ FN ، والأخرى لم تصب.

أظهرت هذه الدراسة ارتفاع نسبة الوفيات لدى مرضى السرطان الذين يعانون من FN بنسبة 15% مقارنةً مع مرضى السرطان غير المصابين بـ FN.

ويؤدي استخدام العامل المحفز لنمو المحببات البشري GCSF إلى حماية المريض المتلقي للعلاج الكيميائي من الإصابة بمرض فقر العدلات Neutropenia الناجم عن تثبيط النقي ، حيث تعمل المعالجة بهذا البروتين على تحفيز انقسام وتمايز الخلايا الجذعية المولدة للدم (HCSF) إلى كريات دم بيضاء وتمايزها إلى عدلات ،مما يرفع نسب حماية المرضى من الإصابة بالأخماج المترافقة مع العلاج الكيميائي.

3. العامل البروتيني المحفز لنمو المحببات البشري:

Granulocyte Cloning Human Stimulating Factor (GCSF)

1.3. التعريف بالبروتين GCSF وبنيته:

عُرف البروتين GCSF بأنه بروتين سكري Glycoprotein، عامل نمو وسيتوكين يُنتج من أنسجة مختلفة بالجسم ليحفز إنتاج نقي العظم للمحببات ثم تحريرها بالدم، كما أنه يُحرض البقاء والانتساخ والتمايز الوظيفي لأنسال العدلات(Nagata,1989). حُدد هذا العامل لأول مرة ونقي عند الفئران عام1983 وتم تأشيب الشكل البشري عام1986 (Souza et al,1986) .

بينت الأبحاث المتعلقة ببنية هذا البروتين أنه يُفرز من الخلايا الظهارية أو من البالعات الكبيرة Macrophages وعدد من الخلايا المناعية الأخرى (Yamamoto et al,1986)، يتواجد النموذج الفعال ضمن شكلين أحدهما مؤلف من 180 حمض أميني والأخر من 174 حمضاً أمينياً والذي يُعد الشكل الأكثر توافراً وفاعلية ويبلغ وزنه الجزيئيkd 18.8 (Nagata,1989)، ويتألف GCSF من سلسلة بولي ببتيدية مع رابطتين خارجيتين ثنائيتي الكبريت بين $cy^{s42}–cy^{s36}$، $cy^{s64}–cy^{s38}$ بالإضافة لسستئين حر في الموقع 17 ،ويُعد الشكل المؤلف من 174 حمض أميني هو الشكل المستخدم بتطوير المنتجات الطبية عير تقنية تأشيب DNA (الشكل.9) (Souza et al,1986).

>NP_757373.1 granulocyte colony-stimulating factor isoform b precursor [Homo sapiens](1993).

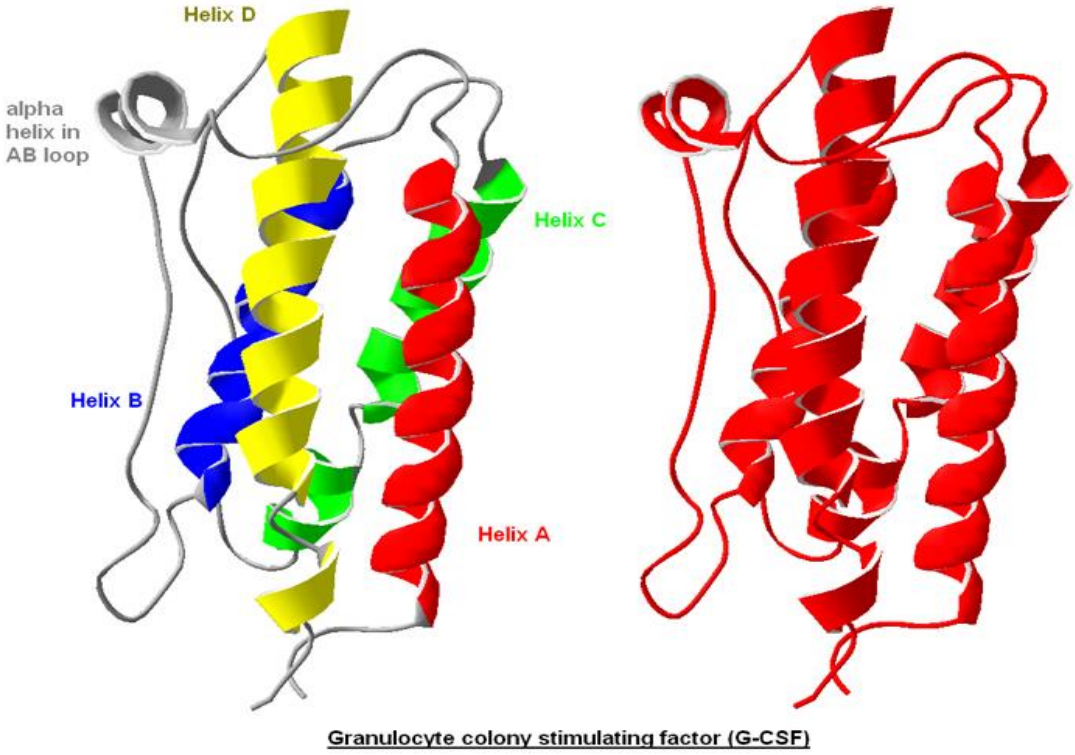
MALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQE KLCATYKLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLY QGLLQALEGISPELGPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGA MPAFASAFQRRAGGVLVASHLQSFLEVSYRVLRHLAQP

الشكل 9. تسلسل الأحماض الأمينية المكونة للبروتين الناضج GCSF المكون من 174 حمض أميني بعد إضافة ببتيد الإشارة المؤلف من 18 حمضاً أمينياً. مقتبس من .last access june2017https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_757373.1

تبين أن مستقبلات GCSF تتواجد في الخلايا السلفية في نقي العظام حيث إن ارتباط البروتين بمستقبلاته يُعد محفزاً قوياً لخلايا HSC_s "hematopoietic stem cells" لانتقالها من نقي العظام نحو المجرى الدموي.

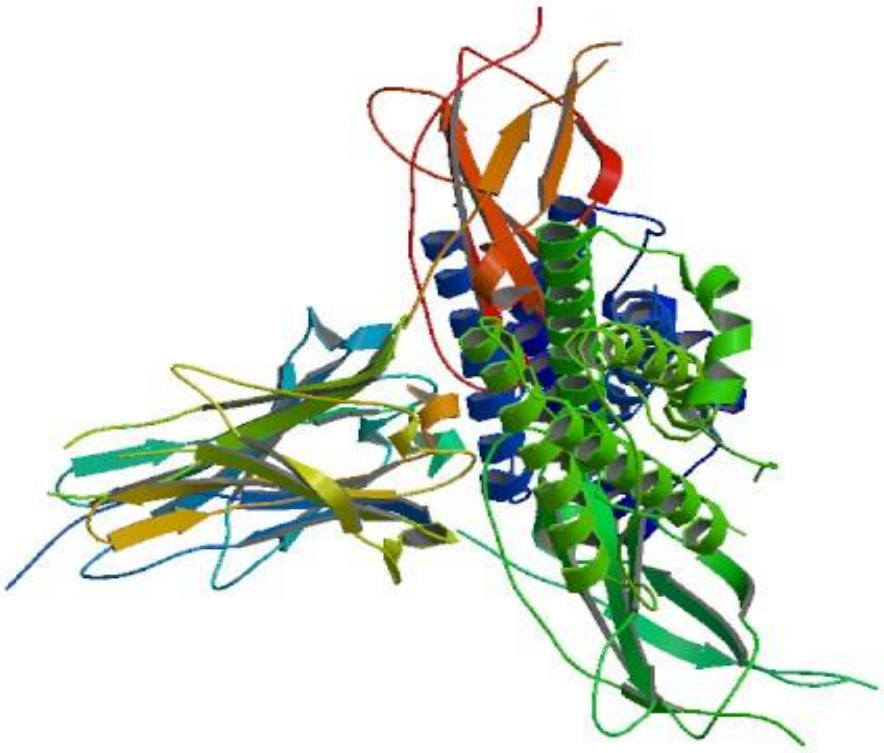
رُسمت الخارطة المورثية للبروتين وتبين أن المورثة المسؤول عن تشفير GCSF يتوضع على الكروموزوم 17 في الموقع $q_{11}–q_{12}$ ويحتوي هذا المورثة على أربعة إنترونات،(Yamamoto et

al,1986) وأظهر البنية الثالثية Tertiary Structure لبروتين GCSF أنه يتكوّن من خمسة حلزونات Helices 5، أربعة كبيرة هي Helix A–D والخامس صغير في العروة بين الحلزونين أ و بـ (الشكل.10).



الشكل 10. البنية الثالثية للبروتين (رقم PDB هو 1GNC) [28].

يعمل بروتين GCSF بشكل مثنوي dimer حيث ترتبط جزيئتا GCSF بمستقبلين اثنين على سطح الخلايا الهدف ويعمل على تشكيل مثنوي من المستقبلين يتآثران فيما بينهما لتوليد إشارة داخل خلوية قويّة intracellular signal (Yamamoto et al,1986) (الشكل.11).



الشكل 11. ارتباط البروتين GCSF بشكل مثنوي بمستقبله على سطح الخلايا الهدف(رقم PDB هو 1GNC) [28].

2.3. أهم الاستعمالات االسريرية للبروتين GCSF:

بالإضافة إلى الدور العلاجي الرئيس لـ GCSF في علاج نقص العدلات Neutropenia الناجم عن العلاج الكيميائي للسرطان والمؤدّي في كثير من الحالات إلى تثبيط تصنيع الكريات البيضاء في نقي العظام. فقد وجدت الأبحاث العديد من الاستعمالات المهمة لهذا البروتين(الشكل .12):

1. يلعب البروتين دور عامل عصبي تتواجد مستقبلاته في الدماغ والنخاع الشوكي مما يجعل تأثير GCSF مركزياً في النظام العصبي لتحفيز القدرة الترميمية للخلايا العصبية وفي التقليل من خطر الإصابة بالتصلب اللويحي للخلايا العصبية وإيقاف عملية التماوت الذاتي لهذه الخلايا(Steigleder et al,2005).

2.يستعمل GCSF في معالجة تحلل الخلايا القلبية بحقنه مباشرة مع SDF stromal cell derived factor" بالقلب (Zhang et al,2010).

3.أثبت الفريق العلمي العامل في

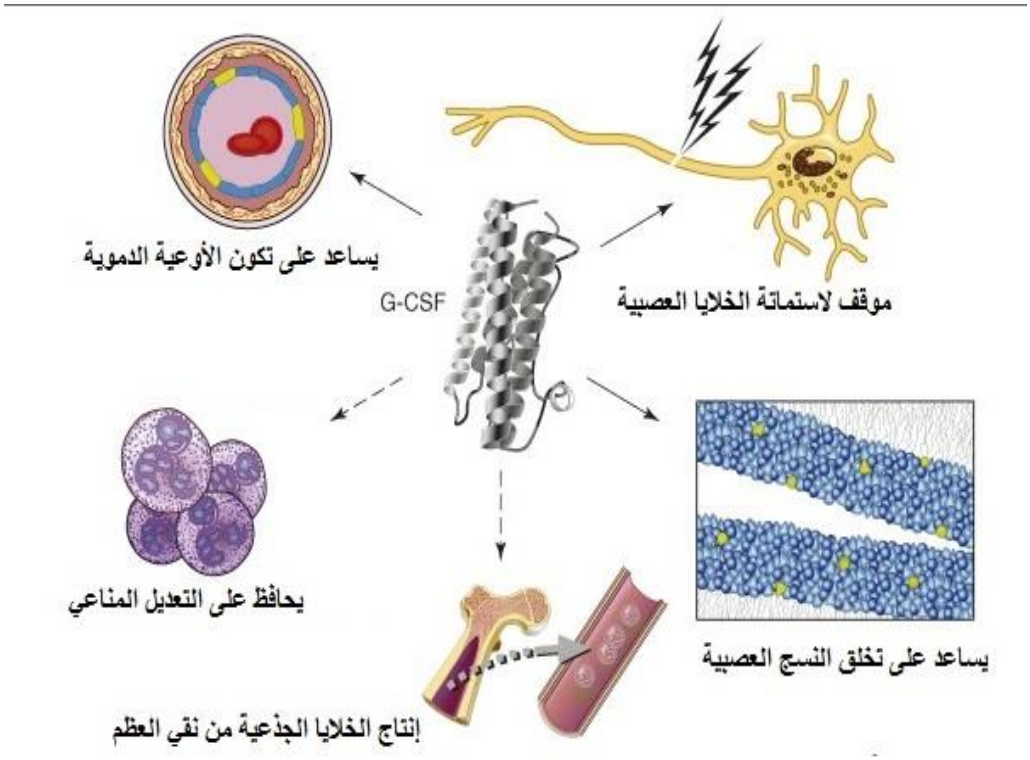
(National institutes of allergy and infection disease – NAiD 2009):

إن استخدام GCSF في علاج داء كرون المعند على السالسيلات والستيروئيدات فاعلية كبيرة، و أوضحت النتائج السريرية تناقصاً واضحاً في تسمّك جدران الأمعاء وتناقصاً في العوامل الإلتهابية والسيتوكينات التي تزداد عادةً في هذا الداء(Zhang et al,2010).

4.تحفز إشارات البروتين عمليات الإنقسام المستمر للخلايا المولدة داخل نقي العظم(Chris,2008).

5.يلعب GCSF دور في ترميم وتشكيل الأوعية الدموية(Bendal and Bradstock,2014).

6.يستخدم GCSF في تحريض هجرة الخلايا الجذعية المولدة للدم من نقي العظم إلى الدم المحيطي في عمليات زرع نقي العظم (Murphy,2012).



الشكل 12. الإستعمالات السريرية المتنوعة للبروتين المحفز لنمو المحببات GCSF،مقتبس من [26]

3.3. منظومات التعبير المورثي للبروتين GCSF Gene Expression Systems:

1.3.3. في بدائيات النوى Prokaryotes:

تم تأشيب recombination المورّثة المشفرة للبروتين المحفز لنمو المحببات في بلاسميد من النمط PET و تم نقله إلى جراثيم الإشريكية القولونية *E. coli* من النمط BLD_{21}. وعند القيام بزرع *E. coli* واستخلاص البروتين المنتج وتنقيته وكشفه ثم استخلاصه تبين انه يتطابق بالفاعلية البيولوجية بنسبة 109.4 % مع المعياري من HG-CSF(Shaz and Qinag,1998).

لقد تمت الموافقة على الشكل المؤشب recombinant المنتج بواسطة خلايا *E. coli* المعدلة وراثياً في العلاج البيولوجي للسرطان المترافق مع قلة العدلات من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية FDA في العام 1991 ودعي هذا الشكل تجارياً بـ Filgrastim. ويمتاز هذا الشكل الصيدلاني عن البروتين المفزز داخلياً باحتوائه على الموقع n-terminal methionine وبكونه غير غليكوزيدي(Park et al,1995) رغم تطابقهما في الفاعلية البيولوجية(الشكل.13).

```
                                        Met Thr Pro Leu Gly Pro Ala
TCTAGAAAAAACCAAGGAGGTAATAAATA ATG ACT CCA TTA GGT CCT GCT

Ser Ser Leu Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln
TCT TCT CTG CCG CAA AGC TTT CTG CTG AAA TGT CTG GAA CAG

Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu Gln Glu Lys Leu
GTT CGT AAA ATC CAG GGT GAC GGT GCT GCA CTG CAA GAA AAA CTG

Cys Ala Thr Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu Leu
TGC GCT ACT TAC AAA CTG TGC CAT CCG GAA GAG CTG GTA CTG CTG

Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro Leu Ser Ser Cys Pro
GGT CAT TCT CTT GGG ATC CCG TGG GCT CCG CTG TCT TCT TGT CCA

Ser Gln Ala Leu Gln Leu Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser
TCT CAA GCT CTT CAG CTG GCT GGT TGT CTG TCT CAA CTG CAT TCT

Gly Leu Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu Gly Ile
GGT CTG TTC CTG TAT CAG GGT CTT CTG CAA GCT CTG GAA GGT ATC

Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp Thr Leu Gln Leu Asp Val
TCT CCG GAA CTG GGT CCG ACT CTG GAC ACT CTG CAG CTA GAT GTA

Ala Asp Phe Ala Thr Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly
GCT GAC TTT GCT ACT ACT ATT TGG CAA CAG ATG GAA GAG CTC GGT

Met Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met Pro Ala Phe
ATG GCA CCA GCT CTG CAA CCG ACT CAA GGT GCT ATG CCG GCA TTC

Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala Gly Gly Val Leu Val Ala Ser
GCT TCT GCA TTC CAG CGT CGT GCA GGA GGT GTA CTG GTT GCT TCT

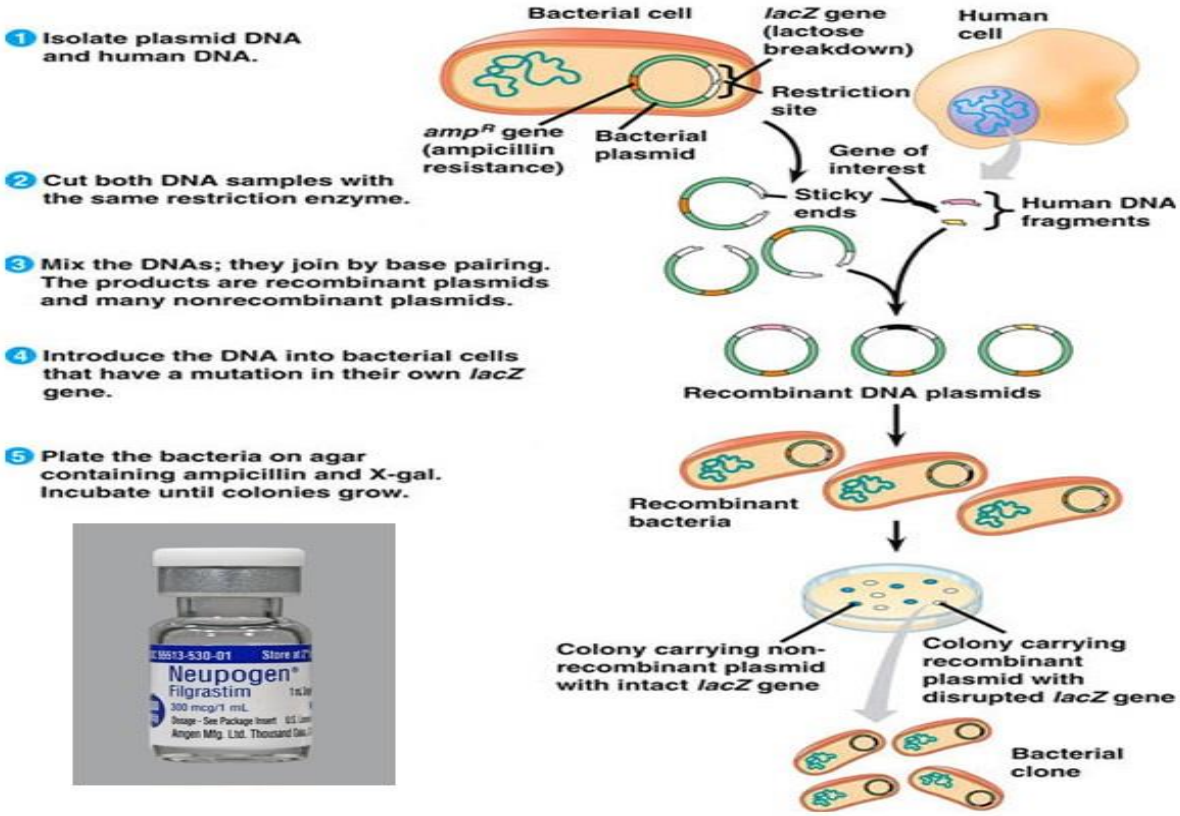
His Leu Gln Ser Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His
CAT CTG CAA TCT TTC CTG GAA GTA TCT TAC CGT GTT CTG CGT CAT

Leu Ala Gln Pro OC  AM
CTG GCT CAG CCG TAA TAG AATTC
```

الشكل 13. تسلسل نكليوتيدات المورثة المشفر للعامل المحفز لنمو المحببات GCSF (رقم PDB هو 1GNC) [28].

1.1.3.3. مراحل تأشيب الDNA في بدائيات النوى(الشكل.14): DNA cloning

- استخلاص الدنا المورثةومي (المورثة الهدف) من الخلايا البشرية، واصطناع الدنا المتمم.
- انتقاء البلاسميد الناقل الحاوي على موقع تنسيل المورثة (lac Z) ومورثة مقاومة الأمبيسلين.
- هضم الدنا المورثةومي والبلاسميدات بنفس أنزيمات القطع.
- تنسيل المورثة داخل البلاسميد ونقل البلاسميدات المأشوبة إلى أطباق الزرع الحاوية على الأمبيسلين و X–gal والحضن لمدة 24 ساعة بالدرجة 37°.
- انتقاء السلالات الجرثومية المستحالة النامية باللون الأبيض وتنميتها وتكثيرها على أوساط مغذية سائلة.
- تضخيم المورثة وتأكيد هويته عبر تفاعل ال PCR والترحيل على هلامة الأغاروز.
- التعبير البروتيني وتأكيد هوية االبروتين عبر الترحيل على هلامة الأكريل أميد.

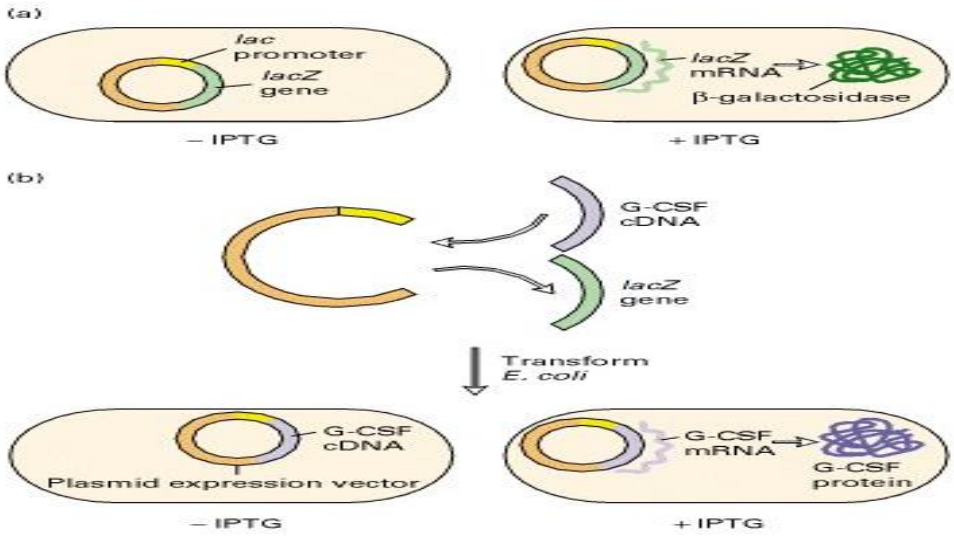


الشكل 14. يوضح مراحل التأشيب البروتيني داخل جراثيم الإشريكية القولونية،مقتبس من المرجع [33].

2.1.3.3. تعديلات على بنية البروتين المأشوب عند *E. coli* :

إنّ التعبير عن المورثات المشفرة للبروتينات داخل *E. coli* سيؤدي لمردود منخفض من هذه البروتينات ، يمكن التعبير عن GCSF وغيره من البروتينات منخفضة الإنتاج بواسطة نواقل مخصصة داخل *E. coli* [29]. تحتوي هذه النواقل البلاسميدية على منطقة تضاعف replication origin (ORI) ومورّثات مقاومة للصادات وللتعبير عن انتساخ قوي، يتم استخدام محضض منظّم ذو فاعلية عالية حيث يبدأ بوليميراز الرنا (RNA polymerase) عملية الانتساخ، ويمتاز هذا المحضض المنظم القوي بإعطائه العديد من النسخ المتماثلة من البروتين تحت نفس الظروف.

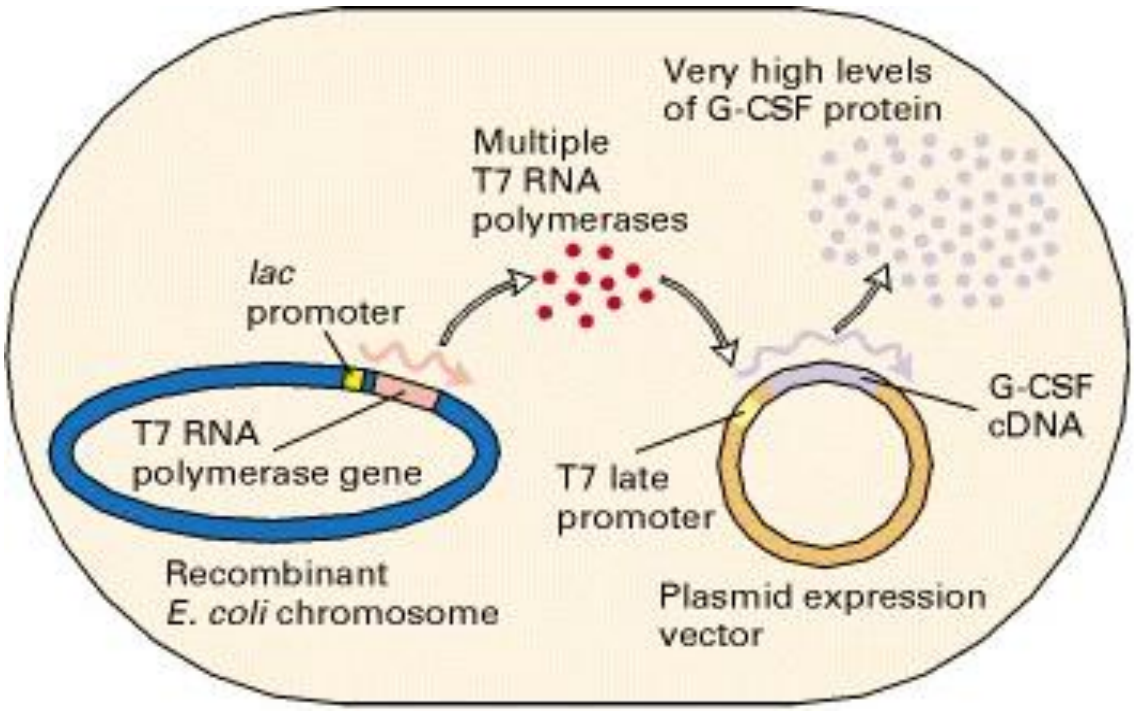
ويمكن الاستعانة بالناقل البلاسميدي الحامل للمورثة المشفر B-galactosidase والذي يحوي lac promoter و lac z gene ويعمل بوجود (IPTG) -iso propylithiol B galactoside- (Yamamoto et al,1986). تم تعديل هذا البلاسميد لإنتاج GCSF باستبدال Lac z gene بـ cDNA GCSF باستخدام انزيمات القطع restriction enzyme و DNA ligase بينما تتم المحافظة على المحضض القوي lac Z promoter والذي يعطي فاعلية عاليةً للانتساخ وذلك بوجود IPTG.(الشكل 15.)(Dubendorff and Studier ,1991).



الشكل 15. زيادة التعبير المورثي عن البروتين GCSF باستخدام نوقل تحوي المحضضlac promoter،مقتبس من المرجع [30].

هناك أنظمة تعبير أكثر تعقيداً والتي تتضمن مستويين من التضخيم فينتج كميات أعلى من البروتين،وتعتمد على وجود T7 RNA polymerase هو عبارة عن إنزيم يشفر داخل دنا عاثي الجراثيم (λDE3 –T7) يقوم بنسخ الدنا بدءاً من موقع محدد يحوي 23bp يدعى هذا التسلسل بالمحضض T7 lac promoter حيث يتواجد عدة نسخ من T7 رنا بوليمراز داخل جينوم عاثي الجراثيمT7. ولكن لا يتواجد هذا T7 رنا بولميراز ضمن جينوم الـ *E. coli* لذا سوف تتم إصابتها بعاثي الجراثيم λDE2 لتمتلك الإشريكية عندها T7 RNA polymerase (Vanz et al,2005).

في نظام التعبير المورثي هذا فإن البلاسميد الحامل للمورثة المشفر للبروتين المستهدف سيحوي نسخة T7 lac promoter متوضعة بدل موقع lac z promoter بجانب cDNA GCSF(الشكل.16). وعندما تتم إضافة IPTG إلى الوسط الزرعي الحاوي على *E. coli* الحاملة T7 RNA polymerase سيقوم T7 رنا بولميراز بالارتباط T7 lac promoter داخل البلاسميد الناقل محفزاً عملية الترجمة لـ cDNA وإنتاج كميات عالية من البروتين(Vanz et al,2005).



الشكل 16. التعبيرالمورثي عن البروتين GCSF باستخدام نواقل تحوي المحضضات T7 lac promoter،مقتبس من المرجع [31].

تم العمل على ايجاد طرق تأشيب لهذا البروتين تختزل خطوات العمل وتخفض تكاليف الإنتاج ،حيث تمت عملية التعبير عن البروتين في جراثيم *E. coli* BL21 الحاوية على البلاسميد المؤشب PET23 بدون إضافة محرض التعبير البروتيني IPTG ،نقي البروتين الناتج بالكروماتوغرافيا السائلة بالتمرير ولمرة واحدة على عامود تبادل الأيونات الموجبة ، طوبق هذا الشكل مع المعياري hG-CSF بالترحيل على SDS-page و Westren blot كما أجريت اختبارات التطابق المناعي والبيواوجي بين الشكلين وتبين أن نسبة التطابق بينهما بلغت 109%(Dubendorff and Studier ,1991).

عملت أبحاث أخرى على دراسة أثر أوساط النمو وشروطه للحصول على أعلى تعبير بروتيني حيث عمل Kang وزملائه على زيادة نسبة الإفراز في الخلايا الجرثومية المستحالة عبر استخدام أنظمة الخلايا مرتفعة الكثافة High cell density cullture والمزودة بأنظمة تغذية زرعية مخصصة ومتجددة بشكل دوري Fed-batch cullture مع شروط نمو محددة (تراكيز IPTG، إضافة حمض الليمون بتركيز معين، انتقاء درجة PH محددة للتعبير البروتيني)، يتم إفراز البروتينات في هذه الجراثيم في المنطقة Peri-plasmic، وقد تبين أن القدرة الإفرازية للجراثيم ترتفع بمقدار 98% ،بينما ارتفعت نسبة البروتينGCSF المفرز لـ 22% من البروتينات الكلية المفرزة ، ليرتفع مردود إنتاج البروتين GCSF لـ 4 أضعاف (Lodish et al,2005).

عمل Abas وزملائه على زيادة نسبة الجراثيم الإفرازية المستحالة بأقل فترة زمنية للحصول على أعلى عائد بروتيني نقي ، بغض النظر عن زيادة نسبة الإفراز الخلوي ، وتم ذلك باستخدام أنظمة تغذية يتم من خلالها إضافة المغذيات (الغلوكوز،الأحماض) بصورة تدريجية مع تغيير درجة الحموضة pH لكل مرحلة من مراحل الإضافة،أدى ذلك لرفع المردود البروتيني المفرز لـ 40% من مجمل البروتينات المفرزة ، وقورن الشكل البروتيني الناتج بالطرائق البيولوجية والمناعية مع البروتينات

المعيارية(PD-grastim،Neupogen) وأعطى تطابق بالشكل والفاعلية بنسبة 99% (Abas et al ,2015) .

عمل Yamaguchi وزملائه على ايجاد مشتق صنعي مماكب للبروتين GCSF بهدف الحصول على بروتين أكثر ثباتاً ، وذلك باستبدال مواقع الأحماض الأمينية الخمس في GCSF :Cys17،Pro5،Gly4،Leu3،Thr2 بالأحماض الأمينية Ser17،Arg5،Tyr4،Thr3،Ala2 ،أطلق على المشتق الناتج Kw2228،أظهرت تحاليل التبصيم البروتيني والمناعي والاختبارات البيولوجية على العضوية الحية وفي الزجاج تطابقاً في الشكل الفراغي والفاعلية بنسبة 99% بالمقارنة مع filgrastim (Yamazaki et al,1995) .

تم العمل على أنظمة تعبير مورثي في بدائيات النوى مختلفة عن *E. coli* ،حيث عمل Sadaf وزملائه على استخدام تقنية التضاعف Prolonged overlap expression PCR والتي لا تحتاج لأنزيمات القطع كما تختصر الحاجة لأنزيم الوصل T4DNA Ligase. تعتمد هذه التقنية على استخدام عملية تضاعف بسيطة Simple PCR باستخدام مرئسات نوعية تعطي تسلسلات نكليوتيدية متكاملة في النهايات الطليقة لكل من البلاسميد والشدفة المورثية ، تتحول هذه النهايات إلى مواقع التصاق في دورات التضاعف التالية ويتشكل البلاسميد المورثي متعدد القسيمات multimeric expression plasmid والذي سيتكور فور دخوله للعصويات *Bacillus subtillis SCK6* لتبدأ عملية التعبير البروتيني المورثي بداخلها، حيث بلغت نسبة البروتين المفرز 17% من مجمل البروتينات المفرزة بعد 72 ساعة من الحضن ،وأظهرت اختبارات الثبات والنقاوة والفاعلية البيولوجية تطابقاً بنسبة 90% مع Filgrastim.أظهرت هذه الدراسة فوائد استعمال نظام التعبير داخل العصويات والذي يختصر العديد من مراحل التأشيب البروتيني التقليدي ويعطي مردود بروتيني ذو تراكيز عالية وفاعلية مرتفعة وبتكاليف أقل (Sadaf et al,2015).

2.3.3. إنتاج البروتين GCSFعند حقيقيات النوى Eukaryotes :

إن عدداً من البروتينات المُنتَجة عبر التعبير المورثي في *E. coli* ستحتاج لتعديلات ما بعد الترجمة لكي تصبح فعالة بيولوجياً حيث تتم هذه التعديلات خلال أو بعد عمليات الاصطناع وهو ما يجعل أنظمة التعبير المورثي في *E. coli* غير قادرة على إنتاج الشكل البروتيني الفعال بشكل كليّ(Vanz et al,2008)، ومثال ذلك هو الغليكوبروتينات التي تحتاج لإضافة مجموعة كربوهيدرات بعد عمليات الترجمة والتي لا تمتلك *E. coli* الإنزيمات الخاصة لإضافتها، لذا يتم استخدام أنظمة تعبير تعتمد على خلايا مأخوذة من حقيقيات النوى تقوم بإعطاء بروتين متكامل وبكميات وفيرة وبشكل مباشر. ورغم نجاح إنتاج بروتين GCSF بواسطة تقنية التأشيب في *E. coli* فقد جرت مؤخراً العديد من الأبحاث التي تناولت إنتاج هذا البروتين في خلايا حقيقيات النوى ، كما أن إنتاج البروتين في هذه الأنظمة سوف يلغي معظم مشاكل التنقية التي عادة ما تسبب ضياع جزء من الفاعلية البيولوجية للبروتين GCSF(Chien,2010)، وقد استخدمت العديد من أنظمة التعبير في نماذج خلوية مختلفة لحقيقيات النوى أهمها:

- في خلايا الخميرة Yeast (*Pichia pastori*)، حيث تبين أن 100 ملغ من المنتج الفعال بيولوجياً يمكن الحصول عليه من ليترين من مفرزات الفطور حقيقيات النوى داخل المفاعل الحيوي. وبعد الزرع والحضن بدرجة حرارة 30° والغمر بألواح تغذية مخصصة (yeast extract YPDS pepton dextrose sorbitol– أعطت خلال ساعتين منتجاً بروتيناً متطابقاً بتسلسل أحماضه الأمينية مع GCSF . وأطلق على الشكل المنتج بواسطة تقنية التأشيب في خلايا حقيقيات النوى الاسم التجاري Lenograstim ويمتاز بكونه شكل غليكوزيدي ولا يحوي N–terminal methionine ، ولم يلاحظ أي اختلاف في الفاعلية البيولوجية بين Lenograstim عند مقارنته مع Filgrastim(Chien,2010).

- باستخدام خميرة الهانسنولا متعددة الأشكال(*Hansenula polymorpha-Pichia angusta*)، تمتاز هذه الخميرة بقدرتها العالية على النمو باستخدام أوساط تغذية بسيطة ورخيصة تعتمد على الميتانول ،حيث يتم تنسيل المورثة GCSF في بلاسميد مصمم خصيصاً zeo/gcsf/pyt Vector يحوي على مورثة مقاومة للصاد الحيوي zeocin . تبين أن البروتين الناتج عن التعبير مطابق بالوزن الجزيئي وتسلسل الأحماض الأمينية مع المعياري hG-CSF بعد الترحيل على هلامة الأكريل أميد والتلطيخ المناعي و لا يحوي N-terminal methonin (Samadi et al,2016) .
- باستخدام فطر (*Aspergillus niger*) ، تمتاز هذه الفطور بنشاطها التكاثري العالي والذي يتفوق على *E. coli* بنسبة 10% ، أعطى التعبير عن المورثة GCSF داخل هذه الفطور بروتيناً أكثر انحلالية لا يحتاج للتعديل ،نقي هذا البروتين بالكروماتوغرافيا السائلة لمرة واحدة وأعطى مردود من البروتين النقي يفوق بـ 65% البروتين الناتج من *E. coli*(Milunovic and Krasevec,2014).

4.3. الأشكال الدوائية العالمية لبروتين GCSF:

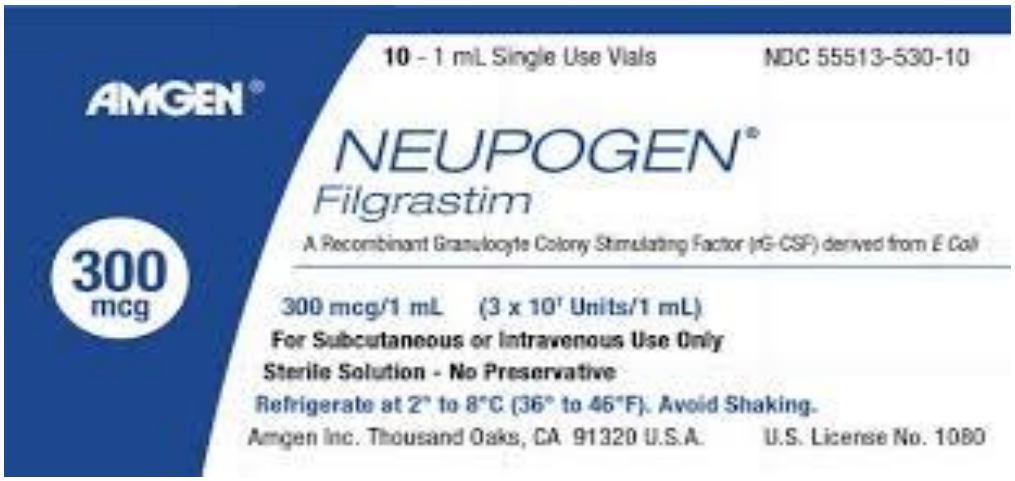
1.4.3. Filgrastim :

1.1.4.3. تعريفه:

هو الشكل الأساسي للبروتين GCSF غير الغليكليوزيدي مع النهاية N-Terminl Methionine . ينظم انتاج العدلات داخل نقي العظم ويؤثر على تمايزها وانقسامها وانتشارها في المجرى الدموي لتحفز الأشكال المناعية الأخرى (الخلايا القاتلة، البالعات، الأضداد)، كما يرفع التعبير عن بعض المستضدات السطحية الموجودة في الخلايا المناعية[58].

أُنتج تجارياً لأول مرة من قبل شركة Amgen تحت اسم Neupogen في العام 1991 ،ويبلغ سعر الجرعة الواحدة منه 300 دولار أمريكي، وحازت شركة Sandoz على الموافقة بإنتاجه من قبل FDA

في العام 2006 تحت اسم Zarox10 ،وقد تلقى أكثر من 7.1 مليون مريض سرطان العلاج Filgrastim أو أحد مشتقاته منذ العام1991 حتى العام 2016 (الشكل.17).



الشكل 17. اللصاقة التجارية للبروتين المؤشب GCSF تحت اسم NEUPOGEN،مقتبس من المرجع [39].

2.1.4.3. الاستخدامات العلاجية:

- المرضى المتلقين للعلاج الكيميائي المثبط لنقي العظام.
- مرضى ابيضاض الدم النقوي الحاد (AML).
- مرضى السرطان اللذين يتلقون زرع نقي العظم.
- مرضى فقر العدلات المزمن.
- المرضى مثبطي النقي المتلقين للعلاج الإشعاعي.
- المرضى الخاضعين لعمليات نقل الدم.

3.1.4.3. المحاذير و الآثار الجانبية:

تعد آلام العظام و الأطراف العرض الأكثر شيوعاً لدى المرضى المتلقين للعلاج و Neupogen، مع حالات نادرة من ردود الفعل التحسسية وآثار جانبية أكثر ندرة كمتلازمة الضائقة التنفسية الحادة، وتمزق الطحال.

3.4.2. Pegfilgrastim :

3.4.2.1. تعريفه:

– أنتج باحثو شركة Amgen ، شكلاً مطوراً عن الشكل Filgrastim وذلك بإضافة جرعة mono methoxy poly ethylene glycol وذلك بهدف إطالة مدة عمر الدواء بجسم المريض.حاز هذا الشكل على موافقة FDA في العام 2002، وأنتج تحت اسم Neulasta، مع نصف عمر طويل يتراوح بين (15– 80)ساعة ،أدت هذه الإضافة إلى رفع الوزن الجزيئي للبروتين من 19 كيلو دالتون في Filgrastim إلى 35 كيلو دالتون مع Pegfilgrastim وعُد هذا الشكل من البروتين GCSF الشكل الأكثر نجاحاً وفاعلية لأنه حقق أكبر قدر من السوية العلاجية مع تكرارية أقل بكثير في الاستخدام ،وهو ما يعني ألم أقل بالنسبة للمريض وراحة أكبر ُيعطى Neulasta مرة واحدة فقط بعد 24 ساعة من بدء دورة العلاج الكيميائي، أو قبل أسبوعين من البدء فيها،وتبلغ جرعة Neulasta 300/مكغ/كغ بشكل جرعة وحيدة موجودة في سرنغ معد للحقن(الشكل.18)، ويبلغ سعر الجرعة منه 5900 دولار أمريكي[55].



الشكل 18.البروتين المؤشب GCSF الحاوي على PEG تحت الإسم التجاري Neulasta.مقتبس من المرجع (40).

2.2.4.3. استخداماته العلاجية:

يستخدم في الاستخدامات السريرية العلاجية ذاتها التي يستخدم فيها Neupogen ،ولكن نظراً لقدرته العلاجية الأقوى في زيادة العدلات وخفض الأخماج لدى مرضى السرطانات وسرعة تأثيره مع طول نصف عمره الدوائي ،فقد أصبح Neulasta جزءاً من بروتوكولات مكافحة السرطان منذ العام 2006 وذلك لدى:

- المرضى الكهول فوق عمر ال 65 عاماً.
- الإصابة المسبقة بنقص تعداد الكريات البيض Neutropenia قبل تلقي العلاج الكيميائي.
- تمدد السرطان نحو نقي العظم.
- مرضى السرطان المصابين بأمراض قلبية أو كبدية أو سكري

3.4.3. TBO-Filgrastim (XMO2-Filgrastim)

- حاز هذا الشكل على موافقة FDA عام 2012 وأنتج من قبل شركة Teva تحت اسم Granix.

- هو شكل مؤشب للبروتين GCSF مع مفعول قصير، يستخدم لحث نقي العظم على انتاج الكريات البيض لخفض نقص العدلات المترافق مع حمى FN في أنماط سرطانية محددة (non- -myeloid malignancies) الأورام الخبيثة غير النخاعية وذلك بعد تلقيهم لعلاج كيميائي مثبط لنقي العظم ،ويبلغ سعر الجرعة الواحدة منه 2000 دولار أمريكي[53].

5.3. دراسات سريرية عن الأهمية االعلاجية للبروتين GCSF:

- دراسة schwartberg (الشكل.19)[48]:

تمت الدراسة في 82 موقعاً في أمريكا و أوروبا على 1928 امرأة تعاني من سرطان الثدي وتتلقى العلاج الكيميائي Docetaxel . قسمت مجموعة المرضى لقسمين ،تلقى القسم الأول العلاج بـ Neulasta بعد دورة العلاج الكيميائي، وتلقى القسم الثاني الدواء الغفل Placebo .

وجدت الدراسة ما يلي :

- 1% ممن تلقوا Neulasta عانوا من الحمى الحرورية التالية لانخفاض العدلات FN مقابل 17% ممن تلقوا الدواء الغفل.

- 67% من المرضى الذين لم يتلقوا Neulasta عانوا من فقر العدلات الناجمة عن تثبيط نقي العظم بالأدوية الكيميائية .

- 94 % من المرضى الذين تلقوا Neulasta لم يصابوا بأي نوع من الأخماج أو الالتهابات الجرثومية.

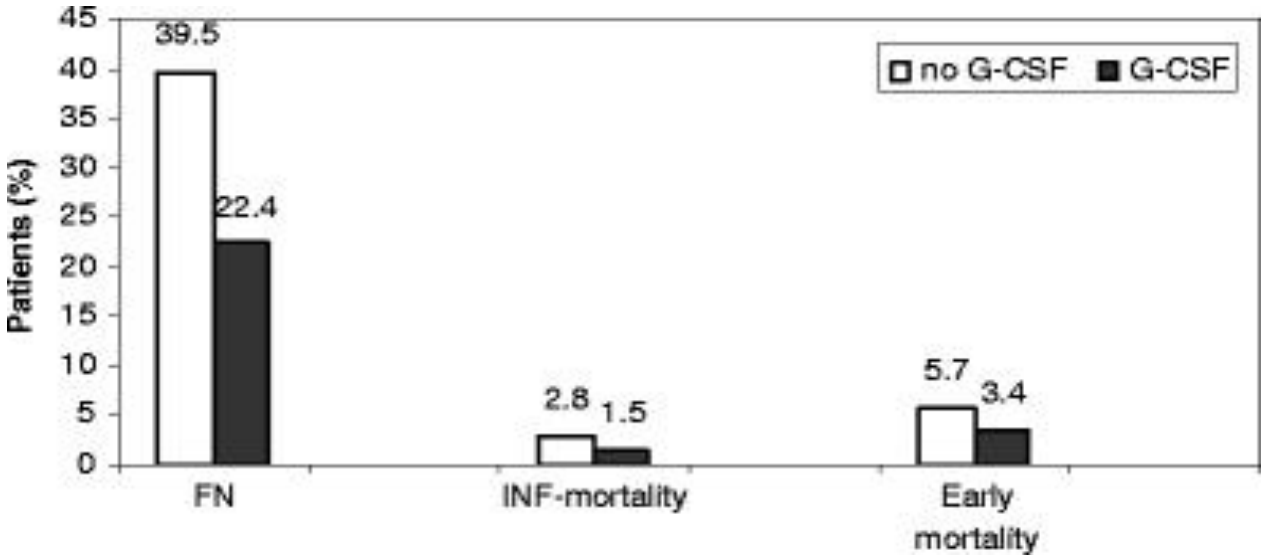
- 80 % ممن تلقوا Neulasta لم يحتاجوا لاستخدام الصادات الحيوية.

- انخفضت نسبة زيارات المرضى للمشافي كمراجعات سريرية ممن تلقوا Neulasta إلى 7%.

- أدت الدراسة إلى وفاة شخصين ممن تلقوا الدواء الغفل بالصدمة الانتانية الناتجة عن فقر العدلات "ضعف المناعة" بينما لم يتوفى أي من المرضى المتلقين لـ Neulasta .

- وجدت الدراسة أن تلقي المريضات لـ Neulasta بعد تلقيهم Docetaxel بـ24 ساعة أدت إلى خفض كبير في نسبة الإصابة بفقر العدلات و الحمى الحرورية ، والإصابة بالأخماج والحاجة لاستخدام صادات حيوية أو الحاجة لمراجعة سريرية في المشافي.

- كما تابعت هذه الدراسة الآثار الجانبية الناجمة عن Neulasta ووجدت أن العرض الأكثر ظهوراً هو آلام الأطراف لدى 31% من المرضى مقابل 7% ممن تلقوا الدواء الغفل.



الشكل 19.ارتفاع معدلات الإصابة بالحمى الحرورية لدى المرضى غير المتلقين للبروتين GCSF مقارنة بالمرضى المتلقين للبروتين المؤشب GCSF ،مقتبس من المرجع [39].

- دراسة Kourlaba.G وزملائه عام 2015[44]:

أجريت هذه الدراسة على 157 مريضة مصابة بسرطان الثدي و يتلقين البروتوكول العلاجي المؤلف من Doxorubicin و Docetaxel.

قسمت الدراسة المريضات إلى ثلاثة مجموعات:

أ)تلقت Neulasta ب)تلقت Neupogen ج)تلقت Placebo

هدفت الدراسة بشكل أساسي إلى مقارنة تأثيرات Neulasta مع Neupogen وكانت النتائج كالتالي:

- 40% ممن تلقوا الدواء الغفل أصيبوا بـ Febrile Neutropenia (FN) .

- نسبة المصابين بـ Febrile Neutropenia (FN) ممن تلقوا ال Neupogen بلغت 30% مقابل 13% ممن تلقوا الNeulasta .

وبعد رفع تركيز الجرعة من Neulasta إلى 300 مكغ/كغ/اليوم مقابل رفع تركيز الجرعة من Neupogen إلى 10 مكغ/كغ/اليوم

أصيب نحو 9% بـ Febrile Neutropenia (FN) ممن تلقوا Neulasta .

أصيب نحو 18% بـ Febrile Neutropenia (FN) ممن تلقوا Neupogen.

- أظهرت دراسة D.Wegcke وزملائه عام 2012 [54] تفوق Neulasta على كل من GMCSF و Neupogen في عملية رفع العدلات التالي للمعالجة الكيميائية والوقاية من الأخماج .

مبررات البحث:

أثبتت الممارسة السريرية على مدى عقدين من الزمن فعالية البروتين المحفز لنمو المحببات البشري GCSF في رفع معدلات البقيا والاستشفاء لدى المرضى المصابين بالسرطان بمختلف أشكاله والمتلقين للعلاج الكيميائي أو الاشعاعي، وانخفاض معدلات الإصابة بالإنتانات وحالات الحمى الحرورية الناتجة عن تثبيط المناعة. وبناءً عليه،حاز بروتينGCSF على موقع متميز كجزء من العلاج التلطيفي الداعم لمرضى السرطان بالإضافة إلى دوره الأساسي كأحد أنواع العلاج البيولوجي المعدل للاستجابة المناعية. مع ذلك، فإنّ الكلفة الباهظة للشكل الصيدلاني للبروتين المؤشب حدَّت من استخدامه على نطاق واسع في العديد من البلدان النامية كسورية، رغم الانتشار الواسع لمرضى السرطان. حيث أن جزءاً كبيراً من تكلفة إنتاج البروتين هي لقاء المعرفة التي تراكمت خلال عقود في إنتاج البروتينات المؤشبة وتحضير الأشكال الصيدلانية الدوائية الفعالة منها.

لذلك كله، انطلقنا في بحثنا من الحاجة الماسة لامتلاك المعرفة الخاصة بإنتاج بروتين GCSF مخبرياً واختبار التقانات الجزيئية الضرورية لإنجاز ذلك.

هدف البحث

يهدف البحث إلى عزل وتضخيم المورثة المشفرة للبروتين المحفز لنمو المحببات GCSF من خلايا بشرية وتأشيبها في بلاسميد خاص بالتعبير عن البروتين في سلالة من الإشريكيا القولونية، مع التأكد من التسلسل النكليوتيدي للمورثة المؤشبة وهوية البروتين المعبّر عنه في الجراثيم.

مواد البحث وطرائقه

PRACTICAL SECTION

1. الخلايا المستخدمة:

تمَّ استخلاص الـ RNA من خلايا بشرية تعبر عن البروتين GCSF،وتم العمل على عدة أنماط خلوية:

1.خلايا جذعية بشرية معزولة من دم الحبل السريMesenchymal stem cells متوفرة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومجمدة في الآزوت السائل.

2. خلايا جذعية بشرية سدوية :Stromal stem cells: متوفرة في الهيئة العامة للتقانة الحيوية ومجمدة في الآزوت السائل.

3.خلايا دم محيطية Peripheral Blood مسحوبة من وريد إنسان سليم على مانع تخثر EDTA.

4.خلايا دم بيضاء بشرية وحيدة النوى مأخوذة من طبقة الغلالة البيضاء:

(MNCS) Mono-Nuclear White Blood Cells from buffy coat

تم فصل المكونات الخلوية التي توجد في عينة الدم المحيطي لشخص سليم مأخوذة من بنك الدم على شكل عينة الغلالة البيضاء (Buffy coat) وهي عينة تم التخلص فيها من معظم خلايا الدم الحمراء والصفيحات، لذلك هي غنية بخلايا الدم البيضاء والتي تصل نسبتها إلى90%(Yamazaki).

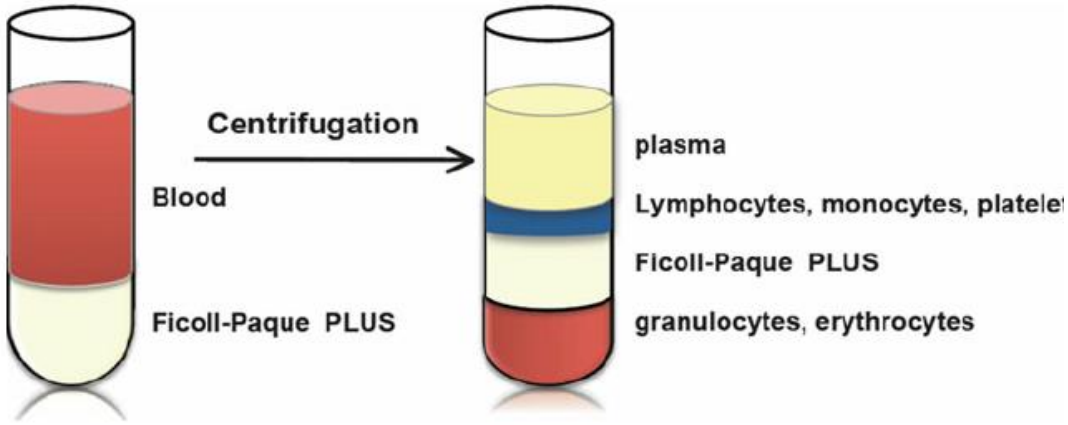
طريقة فصل وحيدات النوى البشرية:

مُدِّدَت عينة الدم بنسبة 1:3 بدارئة ملحية فوسفاتية PBS خالية من شوارد الكالسيوم والمغنزيوم (DPBS, HyClone)بتركيز 1.4 ملغ/مل ، ونُبِذَت على وسط الفيكول تركيزه 1.077 غرام/ ميلي لتر (Ficoll-Paque plus, Stem Cell Technologies, Canada) بسرعة 800xg مدة 30 دقيقة في درجة حرارة الغرفة(David and Sally ,2007,).

جُمِعَت وحيدات النوى Monocyte من السطح البيني(الشكل.20)، وغُسِلَت، بالنبذ بسرعة 400xg مدة 10 دقائق وعند نفس درجة الحرارة، بالمحلول الموقي الملحي الفوسفاتي المدعم بـ 2% من مصل بقري جنيني FBS (Euro lone Fetal bovine serum) تركيزه 2.2 ملغ /مل بعد تخريب بروتينات

جملة المتممة بالحرارة (التسخين في الدرجة 56 مئوية مدة 30 دقيقة)، وتحوي صادات حيوية (100 وحدة دولية/ ميلي لتر من بنسلين/ستربتومايسين penicillin/streptomycin (Stem Cell Technologies, Canada)، والمضاد الفطري amphotericin (Euroclone, ITaly)، و1 ميلي مول EDTA. كُرِرَت عملية الغسل وبنفس المحلول الموقي ولكن بسرعة نبذ 200 xg مدة 10 دقائق في درجة حرارة الغرفة.

حُضر مُعَلَّقْ خُلَوِي تركيزه 2×10^{8} خلية/ ميلي لتر من دارئة الغسل، وتم تقييم عَيُوشِيَة الخلايا cell viability بتلوينها بمحلول التريبان الأزرق (Sigma, Germany) تركيزه 0.4%، وعُدَّت الخلايا باستعمال عَدَادَة النيوباور (New power: Germany).



الشكل 20. شكل ترسيمي لتثفيل الدم مع الفيكول وانفصاله إلى طبقات متعددة،مقتبس من المرجع [42]

نقلت الخلايا إلى أطباق استنبات عقيمة خاصة بالزرع الخلوي Flask واستنبتت بتركيز مئة ألف خلية في ال1 مل من وسط الاستنبات RPMI-1640(Sigma , Germany)المضاف له 10% من مصل البقر الجنيني Fetal bovine serum(FBS)(,Cytogen, Germany) منزوع المتممة، ضمن حاضنة 5% CO2 عند درجة الحرارة37° لمدة ساعتين.

تم اهمال المعلق الخلوي بعد ساعتين من الحضن لإزالة الخلايا غير الملتصقة وتم الحفاظ على الخلايا الملتصقة Monocytes بقاع طبق الاستنبات وتمت متابعتها بشكل يومي بدراسة شكلها تحت المجهر المقلوب، مدة خمسة أيام إلى أن تتمايز إلى بالعات كبيرة Macrophage(Fallah et al,2003).

واستعمل محلول التربسين بتركيز 0.05% والمضاف إليه الـ EDTA لجرف الخلايا الملتصقة بحضنها مدة 5 دقائق في الحاضنة عند درجة الحرارة 37°، ثم أُضيف حجم مماثل من وسط الاستنبات المدعم بمصل جنين البقر 10% لتثبيط فعالية أنزيم التربسين، وبعد أن تحررت وعُلقت جميع الخلايا، نُبذت عند السرعة 200gx مدة عشر دقائق، وأُتبعت بمراحل غسل بالوقاء الملحي الفوسفاتي بنفس الشروط.

2. استخلاص الرنا الكلي (The total RNA extraction) من الخلايا السابقة باستخدام Trisol:

– غسلت العينات السابقة بالماء المقطر وثفلت بسرعة 1200 rpm لـ 3 دقائق ،ثم أُلقي السائل الطافي ، وأُضيف لكل عينة كاشف Trisol بمقدار 500 ميكروليتر.

– تمت مجانسة العينات مع Trisol والتأكد من الانحلال الكامل للخلايا، وتركت الأنابيب بحالة ثبات لـ 5 دقائق ، قبل أن يضاف الكلورفورم بمقدار 0.2 مل لكل 1 مل Trisol .

– ثُفلت المزائج بالمثفلة الكهربائية الالكترونية بسرعة 12000 rpm في الدرجة 4° لـ 5 دقائق، ألقيت الطبقة السفلية الحمراء الحاوية على DNA وبروتينات ومكونات دسمة، واستخلصت الطبقة العلوية الصفراء الحاوية على RNA .

– غُسلت هذه الطبقة بالايزوبربانول بمقدار 0.5 مل ايزوبربانول لكل1 مل Trisol وثُفل الناتج بسرعة 1200 rpm بالدرجة 4° لـ 10 دقائق.

– أُعيد الغسل باستخدام الايتانول 75% بمقدار 0.5 مل ايتانول/1 مل Trisol وذلك بعد سحب الايزوبربانول والتخلص منه.

– ثُفلت الخلاصات الخلوية الناتجة بسرعة 7500rpm مدة5 دقائق عند الدرجة4°، وتركت المزائج للتوازن ل10 دقائق ثم ألغيت طبقة الايتانول المضافة.

– أُضيف RNase inhibitor بمقدار 50 مل لحماية الرنا من الانحلال والتحطم.

– قِيست تراكيز الرنا الناتجة بواسطة مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer وذلك بعد ضبط الجهاز على شاهد سلبي (Blank) يحوي ماء مقطر بطول موجة 260/280 n.m .

– حُفظ الرنا المرسال الناتج في المجمدة عند الدرجة −20° (Chomczynki and Sacchi 1987).

3. اصطناع تسلسل الدنا المتمم:

preperation of Complementary DNA –cDNA

اصطنُع التسلسل المتمل لـ mRNA المعزول من الأنماط الخلوية السابقة وذلك بتطبيق البروتوكول : (first Strand CDNA Synthesis kit. thermo) حيث يبدأ أنزيم الناسخة العكسية (Reverse Transcriptase) بالنسخ اعتباراً من النهاية 3´ لـ mRNA وهي عبارة عن تسلسل أدنين poly (A) tail الموجود في أنواع mRNA عند حقيقيات النوى, حيث استُخدم تسلسل متمم عبارة عن عديد نكليوتيد oligo dT primer والذي يرتبط مع Poly (A) ويشكل نقطة بدء عمل أنزيم الناسخة العكوس.

4. تضخيم مورثة GCSF بواسطة تفاعل البوليمراز التسلسلي:

Polymerase Chain Reaction(PCR)

يقوم مبدأ هذه التقانة على تكرار تضاعف الحمض النووي في الزجاج باستخدام مرئسات نوعية Primers تتشافع مع أطراف السلسلة المراد تضخيمها، وقد استخدمنا زوجين من المرئسات صممما بالاعتماد على التسلسل النكليوتيدي للمورثة المأخوذ من بنك المورثات (Genbank Accession www.ncbi.nlm.nih.gov:) وتم التصميم بالاعتماد على برنامج primers3 وهي:

الجدول (1): التسلسل النكليوتيدي للمرئسات النوعية للمورثة GCSF .(Eurofin,Germany)		
Primers forword	**(BamHI)GCF1**	ATATAT**GGATCC**ATGGGATGGGGAGGGCT
	GCF2	AGGGCTTGGCTCAGGGCTGG
Primers reverse	**(NdeI)GCR1**	ATATAT**CATATG**GCTGGACCTGCCACC
	GCR2	ATGGCTGGACCTGCCACCCAG

حيث احتوى الزوج الأول (GCF1/R1) على موقعين للقطع بإنزيمي BamH1 والثاني NdeI (مبينين بالخط الغامق في الجدول)، على التوالي، بينما لم يحتو الزوج الثاني (GCF2/R2) على أي تسلسل نكليوتيدي إضافي.

ضُخم الـ DNA الجديد بواسطة تفاعل أنزيمي ابتداءً من المرئسات باستخدام إنزيم DNA polymerase ، وقد استخدم أنزيم High fidelity DNA polymerase (Phusion,England Biolabs) من أجل تفادي الأخطاء أثناء عملية التضخيم.

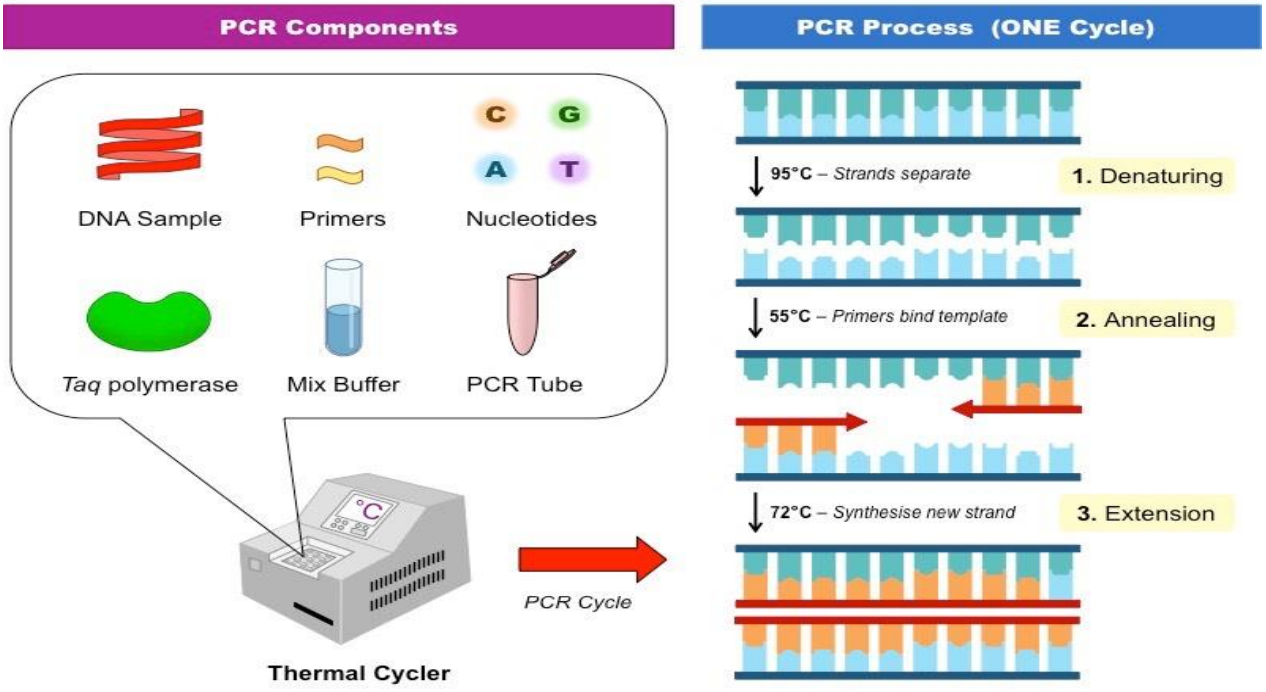
طريقة العمل:

1. تحضير مزيج تفاعل ال PCR وفق الجدول (7)، والمزج بشكل جيد.

الجدول(2): أحجام المواد الداخلة في تفاعل HF-PCR	
Sample	**Volume**
5X phusion HF buffer	10 ميكروليتر
dNTPS	1 ميكروليتر
Forward Primer	0.5 ميكروليتر
Reverse Primer	0.5 ميكروليتر
cDNA(GCSF)	5 ميكروليتر
Phusion DNA polymerase	0.5 ميكروليتر
Water	8.5 ميكروليتر

2. يتم التضخيم وفق برنامج ال PCR المؤلف من 35 دورة كما هو موضح في الجدول (8).

الجدول(3).يوضح الشروط الضرورية لتفاعل ال PCR		
التمسخ الأولي	95° C	2 min
التمسخ	94° C	30 sec
التشافع	57° C	30 sec
الاستطالة	72° C	2 min
الدورات	35	دورة
وقت النهاية الإضافي	72° C	10 min



الشكل 21. يوضح المواد الداخلة في تفاعل ال PCR ومراحل التضاعف،مقبس من المرجع [37]

5. ترحيل نواتج تضخيم ال DNA على هلامة الآغاروز:

Electrophoresis on Agaros Gel

تُستخدم هذه التقانة في فصل شدف DNA،حيث تعتمد على أن الأحماض النووية هي جزيئات متعددة الشحنة السالبة في درجة ال PH المتعادلة ، يعود هذا إلى وجود مجموعات الفوسفات على هيكل ثنائي إستر الفوسفات من سلسلة DNA وهذا يعني أن هذه الجزيئات السالبة سوف تهاجر إلى القطب الموجب عند وضعها في حقل كهربائي وتتم هذه العملية على الهلامة وبذلك يتم فصل هذه الجزيئات وفقاً لحجمها ، حيث تهاجر الجزيئات الأصغر بسرعة أكبر على الهلامة.

طريقة العمل:

1. تُحضر هلامة الأغاروز بتركيز 1%، حيث يتم وزن 1 غرام من مادة الأغاروز ووضعها في أرلينة ، ثم إكمال الحجم إلى 100 مل من محلول Tris–acetate–EDTA (TAE).
2. تسخين المزيج حتى يتم انصهار الأغاروز في محلول TAE.
3. سكب المزيج المنصهر في قالب الهلامة الخاص بجهاز الرحلان بعد إضافة عدة قطرات من صبغة الاتيديوم بروماید (0.3 ميكروليتر) ذو التركيز 10 ملغ/مل، ومن ثم وضع مشط الهلامة متعدد الأبار.
4. ترك الهلامة تتبلمر لمدة ثلاثين دقيقة.
5. إزالة المشط ، ونقل الهلامة إلى جهاز الرحلان الكهربائي.
6. إضافة محلول الرحلان إلى الصندوق ، بحيث تغمر الهلامة.
7. إضافة 1ميكروليتر من محلول Loading buffer 6X لكل 5 ميكروليتر من ال DNA.
8. وضع ال DNA في الآبار المناسبة.

09 وضع 10 ميكروليتر من الواسم العياري لل DNA.

10. ترحيل هلامة الأغاروز على الفولطية V 100 ، لمدة 20 دقيقة.
11. تصوير الهلامة بالأشعة فوق البنفسجة UV ، حيث تظهر حزم الأحماض النووية.

6. استخلاص الدنا من هلامة الآغاروز: DNA Extraction from agarose gel

قصت هلامة الجل في مكان العصابة الموافقة بالطول لطول المورثةة GCSF بواسطة المشرط, نقلت إلى بيشر زجاجي واستخدم طاقم QIAquick gel Extraction Kit(QIAgen) ، من أجل تنقية DNA من هلامة الأغاروز ، حيث يتم إضافة ثلاثة أحجام من محلول Buffer QG وحجم واحد من محلول الإيزوبربانول لكل 100 غرام من وزن الهلامة.

نقي الدنا المستخلص من الأنزيمات والشوائب باستخدام البروتوكول :

.(Quick PCR Purification Kit – invitrogen)

7. تأشيب DNA المورثة GCSF داخل البلاسميد:cloning of GCSF

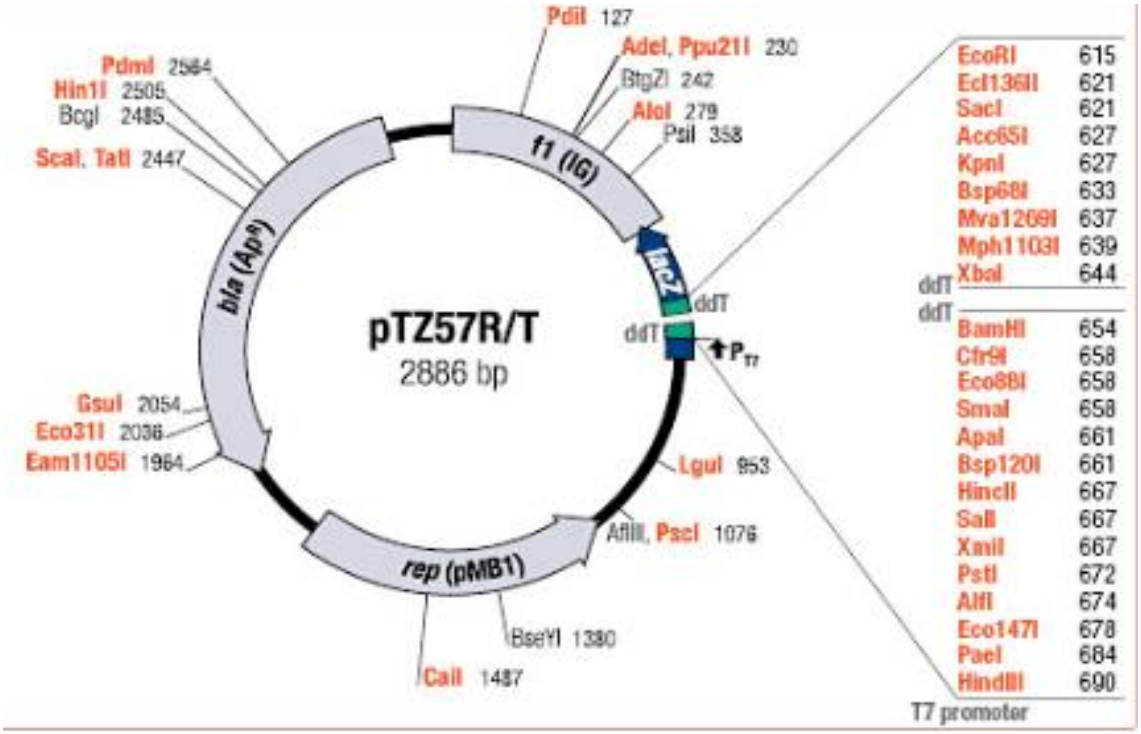
1.7. البلاسميدات :Plasmids

1.1.7 . البلاسميد PTZ57R/T:

استخدم بلاسميد التنسيل المورثي PTZ57R/T (Thermo) لاختبار نجاح عملية التنسيل ويمتاز هذ البلاسميد بتأشيبه المباشر للشدفة المورثية دون الحاجة لأنزيمات تقييد،حيث تُختزل خطوات العمل بخطوة واحدة موفرة بذلك الكثير من الوقت والجهد (الشكل.22).

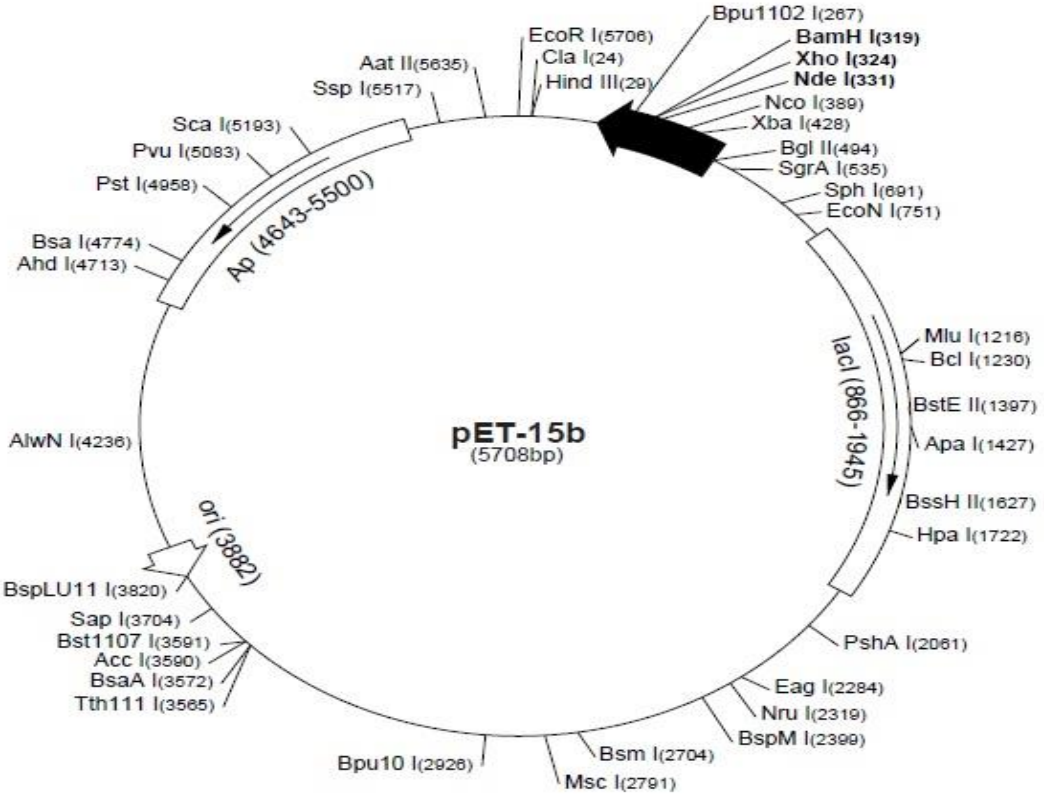
تتم عملية تأشيب البلاسميد مع المورثة GCSF حسب البروتوكول Ins TAclone PCR Cloning

.(Thermo) KIT



الشكل 22..خارطة مفصلة لبلاسميد التعبير المورثي PTZ57R/T تُوضح موقع تنسيل المورثة(lacZ) ومورثة مقاومة الأمبيسيللين،ومواقع حض التضاعف ،ومواقع قطع أنزيمات التقييد.مقتبس من المرجع [48].

2.1.7 . البلاسميد pET-15b:



الشكل 23. خارطة البلاسميد pET-15b.مقتبس من المرجع [49]

تم استخدام بلاسميد التعبير المورثي pET-15b (Novogen) من أجل التنسيل والتعبير البروتيني للمورثة GCSF ضمن بكتيريا *E. coli* (Forger and Hall.2007) ، من أهم الصفات التي يتميز بها هذا البلاسميد(الشكل.23) امتلاكه لـ :

1. محضض PT7: الذي يعمل ضمن البكتيريا ويحض انتساخ المورثة.
2. مورثة مقاومة الأمبيسليين Ampicillin resistant gene : تساعد في انتقاء المستعمرات الإيجابية الحاوية على البلاسميد والتي تستطيع النمو على الأطباق الحاوية على الأمبيسلين.
3. لاحقة الهيستيدين Histidine tag :تساعد في تنقية البروتين المأشوب.
4. وحدة التضاعف Origin replication: تُمكن البلاسميد من التضاعف ضمن *E. coli* .
5. موقع إنزيمات التقييد ال poly linker .
6. تسلسل منهي الانتساخ Terminator .

1.2.1.7. البلاسميد pET−15b/GCSF المؤشب:

1.1.2.1.7. تقطيع المورثة والبلاسميد باستخدام أنزيمات التقييد : Digestation Reaction

تم معاملة كل من الشدفة المورثية الناتجة عن عملية التضخيم وبلاسميد التعبير المورثي:(pET−15b) بأنزيمي التقييد NdeI و BamHI(Fermentase).

طريقة العمل :

1. يضاف كل من ال DNA وأنزيمات التقييد ومحلول التفاعل Buffer tango 2x وفق الجدول التالي:

الجدول(4).أحجام المواد الداخلة في تفاعل تقطيع المورثةGCSF والبلاسميد pET−15b بـ ميكروليتر		
Content	**GCSF**	**pET-15b**
Insert	20	15
Buffer Tango 2X	6	6
NdeI	1.5	0.25
BamHI	1.5	0.25
H2O	1	8.5
Total	30	30

2. حضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 37° ولمدة 4 ساعات.

2.1.2.1.7. ربط المورثة إلى البلاسميد :Ligation Reaction

يعمل أنزيم الربط ligase T4 على وصل قطع ال DNA ذات النهايات اللزجة والعمياء على حد سواء وذلك من خلال ربط زمرة الهيدروكسيل في النهايةَ 3´مع الفوسفات من النهاية 5´ للنيكليوتيدات المتجاورة وبذلك تتكون روابط فوسفورية ثنائية الإستر ،يحتاج هذا الأنزيم ATP كعامل مُساعد.تتم

عملية الربط حسب البرتوكول Rapid DNA Ligation Kit (Fermentas) .يحضن المزيج في نهاية عملية الربط في حمام مائي درجة حرارته 16 لمدة 16 ساعة (Overnight).

2.7. استحالة الجراثيم :Bacterial Transformation

يتم في هذه العملية انتقال ال DNA بواسطة البلاسميدات المؤشبة إلى داخل الخلية البكتيرية، يحدث هذا التحول إما بواسطة التثقيب الكهربائي Electroporation أو من خلال الصدمة الحرارية Thermal.

1.2.7. السلالات الجرثومية :Strains

استخدمت كل من ال *E. coli* DH10B والـ *E. coli* BL21(DE3) كسلالة مضيفة للتنسيل والتعبير البروتيني للمورثة GCSF على التوالي، حيث يظهر الجدول (10)خصائص هذه السلالات.

الجدول(5) . السلالات البكتيرية المستخدمة في التنسيل والتعبير البروتيني للمورثة GCSF

السلالة Strains	الصفات والطراز المورثةومي Features and Genotype	المصدر Source
E. coli **DH10B**	*F-mcrAΔ(mrr-hsdRMS-mcrBC) 80 lacZΔM15ΔlacX74 recA1 endA1 araΔ139Δ(araleu)7697 galU galK rpsL nupg*	Gibco BRL
E. coli **BL21(DE3)**	*Resistant to the lytic bacteriophage T1 and T5 F ompT gal dcm Ion hsdSB(rB-mB-)λ(DE3[lac lac UV5-T7 gene 1 ind1 sam 7nin5])*	Novagen

تُسبق عملية التحول البكتيري ،بجعل الخلايا البكتيرية كفؤة على استقبال البلاسميد المؤشب من الوسط، يتم تحضير كل من بكتيريا *E. coli* DH10B،*E. coli* BL21 (DE3) من خلال وضع الخلايا البكتيرية في محلول مُبرد من كلوريد الكالسيومCaCl2 تركيزه 2.5 ملغ /مل الذي يجعل السطح البكتيري مشحون بشحنة موجبة لكي تتمكن الخلايا البكتيرية من إدخال ال DNA.

2.2.7. تحضير الخلايا الجرثومية ذات الكفاءة :Competent Bacterial Cells

طريقة العمل:

1.استنبات 10ميكروليتر من البكتيريا المحفوظة في الدرجة – 80° على طبق بتري يحتوي على وسط LB في حاضنة درجة حرارتها 37° لمدة 16 ساعة.

2. انتقاء مستعمرة مفردة واستنباتها في 10 مل من وسط LB ، وذلك في هزازة حاضنة درجة حرارتها 37 لمدة ليلة كاملة.

3 . إضافة 5 مل من المستنبت البكتيري النامي إلى 200 مل من وسط LB،ثم وضع المستنبت في هزازة حاضنة درجة حرارتها 37° لمدة ساعتين وحتى الوصول إلى الكثافة الضوئية Optic density (0.3-0.4).

4. التثفيل باستخدام مثفلة بسرعة 3000 rpm ودرجة حرارة 4 °ل 10 دقائق.

5. التخلص من الطافي بحذر.

6. حل الراسب بـ 40 مل من محلول CaCl2/Glycerol البارد.

7. التثفيل باستخدام مثفلة بسرعة 2500 rpm لـ 5 دقائق، ثم التخلص من الطافي بحذر.

8. حل الراسب بـ 40 مل من محلول CaCl2/Glycerol البارد.

9. حضن في الثلج لمدة ثلاثين دقيقة.

10. التثفيل باستخدام مثفلة بسرعة 2500 rpm لـ 5 دقائق، ثم التخلص من الطافي بحذر.

12. حل الراسب بـ 8 مل من محلول Cacl2/Glycerol البارد.

13. توزيع 200 ميكروليتر من الخلايا البكتيرية المهيئة على أنابيب إبندروف .

14. الاحتفاظ بالخلايا البكتيرية في درجة حرارة – 80°.

3.2.7. تحضير محلول الزرع العقيم:Preparation Sterile LB Solution

حُضر لهذه الغاية وللتعاطي مع عمليات الزرع والاستنبات التالية, محلول LB العقيم, وذلك بوزن 3 غ من مسحوق (LB Broth) أضيف اليه 200 مل من الماء المقطر, ونقل المحلول إلى جهاز التعقيم الجاف (Auto Clave) , والذي يضبط بشروط درجة حرارة 121° , ورطوبة 20% لمدة ساعتين, نحصل في نهايتها على محلول LB عقيم.

4.2.7. تحضير أقراص البتري : Preparation Petri Dishes

تحضر أطباق البتري بوزن 3غ من مسحوق LB Agar وحله بـ 200 مل ماء مقطر نضيف له 1مل أمبيسلين، ويعقم في جهاز التعقيم الجاف(Auto clave) بحرارة 121° ورطوبة 20% لمدة 3 ساعات, ثم يصب الآغار في الأطباق ويصلب بالدرجة 37°.

5.2.7. التحول البكتيري الحراري :Chemical Transformation

تتم إضافة جزء من تفاعل ربط الDNA إلى جزء من الخلايا البكتيرية الكفوءة(*E. coli* DH10B) والتي يتم مزجها بلطف ،وحضنها على الثلج ، يعرض بعدها هذا المزيج للصدمة الحرارية ،ثم يوزع ناتج التحول على أطباق بتري حاوية على الصادات الحيوية .

طريقة العمل :

1. إضافة 10 ميكروليتر من ناتج ربط المورثة إلى البلاسميد Ligation reaaction إلى 400 ميكروليتر من خلايا E. coli ذات الكفاءة.
2. حضن المزيج في الثلج لمدة 30 دقيقة.
3. نقل المزيج إلى حمام مائي درجة حرارته 42° لـ 45 ثانية.
4. حضن المزيج في الثلج لمدة دقيقتين .
5. إضافة 500 ميكروليتر من وسط LB خالي الأمبيسلين .
6. وضع المزيج في حاضنة درجة حرارتها 37° لساعة .

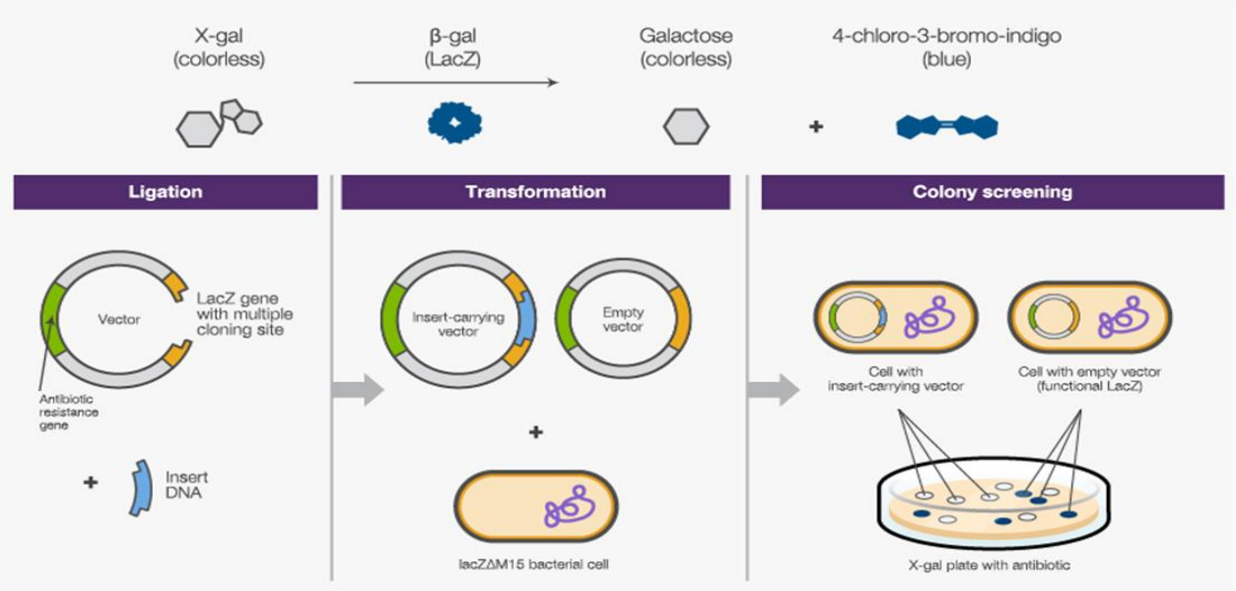
6.2.7. استنبات الجراثيم المحولة على أطباق بتري:

Culture bacterial Transformation On Petri Agar Dishes

وُزع 200 ميكروليتر من ناتج التحول على أطباق بتري ،واستخدمت طريقتان مختلفتان لدراسة استحالة الجراثيم ونجاح عملية تنسيل البلاسميد المؤشب:

1.6.2.7 زرع الجراثيم المستحالة الحاوية على البلاسميد المؤشب PTZ57RT/ GCSF:

1. يُفرش 40 ميكروليتر IpTG + 40 ميكروليتر Xgal على سطح أطباق البتري المعدة للحضن.
2. فُرشت العينة الجرثومية المعدة سلفاً والمجهزة من ارتباط البلاسميد PTZ57R/T مع الإشريكية القولونية.
3. حُضن الطبق بالدرجة 37° لمدة 24 ساعة .
4. لوحظ النمو الأزرق – الأبيض على سطح أطباق الآغار(الشكل.24).
5. تُتقصى الجراثيم المستحالة البيضاء الحاوية على المورثة، وتُؤخذ منها مسحات عشوائية .
6. مُددت مسحات النسائل الجرثومية بالماء المقطر وأعدت لإجراء عملية تضاعف PCR.



الشكل 24. التقصي الأزرق–الأبيض على سطح أطباق البتري.مقتبس من المرجع [49]

6.2.6. 2 زرع الجراثيم المستحالة الحاوية على البلاسميد المؤشب pET–/GCSF 15b:

تم تهيئة ثلاثة أطباق بتري لاستقبال عينات الزرع

1.الطبق الأول : جراثيم الإشريكية القولونية الحاوية على البلاسميد المربوط مع الشدفة المورثية GCSF

2.الطبق الثاني : جراثيم الإشريكية الحاوية على البلاسميد المقطوع فقط كشاهد سلبي .

3.الطبق الثالث : جراثيم الإشريكية الحاوية على البلاسميد بدون قطع كشاهد ايجابي.

4. حُضنت الأطباق السابقة بالدرجة 37° لمدة 24 ساعة وتم متابعة شكل وطبيعة النمو في الأطباق الثلاثة، للتأكد من نجاح عملية التنسيل والتحول الجرثومي.

5. أخذت مسحات للسلالات الجرثومية الحاوية على البلاسميد المؤشب والنامية بشكل منتظم على طبق البتري

6. مددت مسحات النسائل الجرثومية بالماء المقطر وأعدت لإجراء عملية تضاعف PCR.

8. دراسة التعبير المورثي : Gene Expession

دُرس التعبير المورثي للنسائل الجرثومية المستحالة المنتقاة من أطباق البتري بشكل عشوائي ،بمضاعفة ال DNA المورثي المؤشب بداخلها بواسطة الPCR، حيث تتم عملية التضاعف باستخدام أنزيم ال DNA Polymerase ووجود النكليوتيدات منقوصة الأوكسمورثة وملح Mgcl2 ووقاء مناسب وفق البروتوكول Clonejet Cloning Kit (Fermentas)، رُحلت بعدها نتائج التضاعف بالرحلان الكهربائي الأفقي على هلامة الأغاروز 1%.

طريقة العمل :

1.جُضر مزيج تفاعل الPCR وفق الجدول(11)،ومزج بشكل جيد.

الجدول(6) .أحجام المواد الداخلة في تفاعل ال PCR مقدرة بـ ميكروليتر

Sample	Volume
Primers forward-GCRI	0.5
Primers reverse-GCFI	0.5
cDNA-GCSF	5
Master Mix	10
Water	9

2. يتم التضخيم وفق برنامج ال PCR الذي يتضمن 35 دورة كما هو موضح في الجدول(12).

الجدول(7). الشروط اللازمة لتفاعل ال PCR.

Initial denaturation	95˚ C	2 min
Denaturation	94˚ C	30 sec
Annealing	57˚ C	30 sec
Extension	72˚ C	2.5 min
Cycles	35	Cycles
Final Extraction	72˚ C	10 min

3. تحضير هلامة الأغاروز 1%.

4. تُرحل نتائج مضاعفة المورثة المؤشب داخل الجراثيم على هلامة الجل بالترحيل الكهربائي الأفقي على الفولطية 80V ،ولمدة 20 دقيقة .

5. تُصور الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية UV، وتظهر الأحماض النووية .

1.8. استفراد النسائل الجرثومية المستحالة وإعادة استنباتها على أوساط سائلة:

Choose Transformation Colonies and pre-culture

تهدف هذه العملية لتكثير النسائل الجرثومية المستحالة ذات التعبير المورثي الإيجابي ، لزيادة كمية ال DNA الفعال(Plachevski and Finkle,2006).

طريقة العمل:

1.استفردت النسائل الجرثومية المستحالة والتي أظهرت تعبيراً مورثةياً عن المورثة GCSF بعد التضخيم والترحيل على هلامة الأغاروز.

2. أُضيف محلول ال LB العقيم بمقدار 5 مل مع الأمبيسللين بتركيز 1% لكل نسيلة مستفردة.

3. تنقل أنابيب الزرع إلى هزازة الإكثار الجرثومي بعد ضبط السرعة على 100 rpm والحرارة على 37،وتترك لمدة 4 ساعات.

4. نُقل المستنبت إلى 50 مل من ال LB الحاوي على الصاد الحيوي وُحضن لمدة 16 ساعة.

2.8. عزل ال DNA البلاسميدي من وسط الاستنبات:Miniprep

استخلص البلاسميد من مستنبتات الخلايا البكتيرية باستخدام الطاقم GeneJET Plasmid Miniprep (Thermo)، أُكد نجاح عملية عزل البلاسميد بالترحيل الكهربائي على هُلامة الأغاروز بالمقارنة مع العياري.

3.8. استخلاص ا لشدفة المورثية من البلاسميد بعد تقييده بأنزيمات القطع:

Gene extraction

تهدف هذه العملية للحصول على الشدفة المورثية النقية المشفرة للبروتين GCSF .

طريقة العمل:

1.هُضم البلاسميد المستخلص مع أنزيمي القطع XbaI و BamHI (Fermentase)، ومحلول التفاعل Buffer tango 10x وفقاً للجدول التالي:

الجدول(8).أحجام المواد الداخلة في تفاعل تقطيع البلاسميد المأشوب المستخلص مقدرة بميكروليتر.

Content	Volume
pET-15b GCSF	10
Buffer Tango 2X	3
XbaI	1
BamHI	1
H2O	10
Total	25

2. حضن المزيج في حمام مائي درجة حرارته 37° ولمدة 16 ساعة (Over night).

3. رُحلت نواتج تفاعل القطع بالرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1%،مع ترحيل شاهد سلبي (البلاسميد المقطوع غير الحاوي على المورثة).

4.صُورت الهلامة بالأشعة فوق البنفسجية UV.

9. سلسلة الدنا: DNA Sequencing

تمت سلسلة مورثة GCSF المؤشب ضمن بلاسميد التعبير المورثي pET-15b ،بواسطة جهاز Genetic 114 Analyzer system ABI-310 في هيئة التقانات الحيوية باستخدام مرئسات نوعية لتسلسل المورثة (الجدول.6)،ومن ثم تمت مقارنة ناتج السلسلة فيما بعد باستخدام برنامج ال BLAST التابع للمركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية National Canaer for Biotechnology Information(NCBI)(http://www.ncbi.nlm.nih.gov).

طريقة العمل:

1.إضافة 5 µl من ناتج البلاسميد المستخلص إلى أنبوب إبيندروف.

2.إضافة 1 µl من كل من المرئسة الأمامية والعكسية إلى أنابيب إبيندروف .

3.إرسال الأنابيب إلى المختبر لسلسلة المورثة GCSF.

10. تحريض التعبير البروتيني :Protein Overexpression

يتم التعبير البروتيني للمورثةGCSF من خلال إدخال بلاسميد التعبير المورثي pET-15b الحاوي على المورثة GCSF إلى داخل بكتيريا التعبير البروتيني عالية الكفاءة *E. coli* BL21(DE3) ،حيث يمتلك جينوم هذه البكتيريا المورثة المرمز لأنزيم RNA polymerase T7 تحت سيطرة محضض Lac،وعند إضافة محلول (IPTG) المضاهئ لسكر اللاكتوز إلى الوسط ،يعمل أنزيم RNA polymerase على انتساخ المورثة إلى RNA polymerase T7 والذي يرتبط بدوره إلى محضض T7 من بلاسميد pET-15b ويعمل على تحريض انتساخ المورثة GCSF(Provos and Wallert.1998).

طريقة العمل:

1. نُسلت البلاسميدات المؤشبة pET−15b GCSF داخل جراثيم التعبير البروتيني مرفوعة الكفاءة *E. coli* BL21 بالصدمة الحرارية .

2. نُميت الجراثيم المؤشبة على أطباق البتري الحاوية على أمبيسللين وحُضنت بالدرجة 37° لمدة يوم كامل.

3. اسُتفردت مستعمرتان جرثوميتان من الطبق،وأعُيد استنباتها في أنابيب تحتوي 5 مل من وسط Amp+LB.

4. وُضعت الأنابيب في حاضنة درجة حرارتها 37° مع الرج بسرعة 200 rpm ولمدة ليلة كاملة.

5. أضيف 500 ميكروليتر من المستعمرات كلاً على حدا إلى أرلينة (250 مل) تحوي 20 مل من الوسط Amp+LB ،نميت في حاضنة 37 مع الرج بسرعة 400 rpm حتى الوصول إلى OD600(0.5−0.7).

6. أُحذ 2 مل من المستعمرة إلى أنبوب إبندروف ، وثُفل بسرعة 6000 rpm لمدة 10 دقائق،أُلقي الطافي ،و حُفظ الراسب الأول بالدرجة −20° .

7 . أُضيف لل18 مل المتبقة 9 ميكروليتر من محلول IPTG (0.5 mM) وحضن مع الرج بالدرجة 37 ° لمدة 4 ساعات.

أُضيف كذلك لل 18 مل من أنبوب زرع المستعمرة الثانية 9 ميكروليتر من محلول IPTG وحضن مع الرج بالدرجة 16° لمدة 4 ساعات.

8. ثُفل 10 مل من كل من المحلولين السابقين بسرعة 20000 rpm لمدة 5 دقائق، يُلقى الطافي ونحتفظ بالراسبين بالدرجة −20°.

8 . حُضن 8 مل المتبقي في الأنبوب الأول بالدرجة 30° لمدة 16 ساعة (Over Night)،كما حضن ال8 مل المتبقية في الأنبوب الثاني بالدرجة 16 ° لمدة 16 ساعة.

9 . ثُفل الأنبوبان بسرعة 10000 rpm لمدة 5 دقائق ،أُلقي الطافي واحتُفظ بالراسبين بالدرجة −20.

11.الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلامة عديد الأكريلاميد:

Sodium Dodecylsulfate –PAGE Electrophoresis

يُعد الرحلان الكهربائي للبروتينات على هلامة متعدد الأكريلاميد SDS Polyacrylamide–gel من أفضل الطرق المستخدمة في فصل البروتينات وفي تحديد كتلتها الجزيئية ،حيث يعمل منظف دودوسيل _ سلفات الصوديوم (Sodium dodecylsulfate): تمسيخ البروتين إلى سلسلته متعددة الببتيد وشحنه بشحنة سالبة وتُخلص البروتين من الارتباط إلى بروتينات أو جزيئات ليبيدية أخرى .

_ يعمل العامل المُرجع القوي بيتاميركابتو ايتانول B–mercapto–ethanolعلى تحطيم الجسور الكبريتية. وبتطبيق تيار كهربائي تهاجر هذه السلاسل عديدة الببتيد المشحونة بشحنة سالبة من القطب السالب إلى القطب الموجب لجهاز الرحلان الكهربائي حسب كتلتها الجزيئية النسبية .

المواد المستخدمة في الرحلان الكهربائي:

هلامة تركيز العينة:Stacking gel

حُضر 5 مل من هلامة التركيز 5% حسب الجدول (14)،ثم يمزج بشكل جيد.

الجدول(9). تراكيز و أحجام المواد الداخلة في تحضير 10 مل من هلامة التركيز 5%.

Sample	Concentration	Volume
Acrylamide/Bis 30%	5%	0.833 مل
Tris/Hcl(PH=6.8)1M	0.125 M	0.625 مل
SDS10%	0.1%	50 ميكروليتر
APS10%	0.1%	0.3-0.5غ
TEMED1X	0.1%	8 ميكروليتر
ddH2O	Sq for 5 ml	3.484

هلامة الفصل :Running gel

حُضر 10 مل من هلامة الفصل 15% وفق الجدول (15)،ومُزجت بشكل جيد.

الجدول(10).تراكيز و أحجام المواد الداخلة في تحضير 10 مل من هلامة الفصل 15%		
Sample	**Concentaration**	**Volume**
Sample	**Concentaration**	**Volume**
Acrylamide/Bis 30%	15%	5 مل
Tris/Hcl(PH=8.8)1M	375 Mm	3.75 مل
SDS10%	0.1%	100 ميكروليتر
APS10%	0.1%	0.3-0.5 غ
TEMED1X	0.05%	5ميكروليتر
ddH2O	Sq for 10 ml	1.145

دارئة معالجة العينة:Sample buffer

حُضر 10 مل من دارئة معالجة العينة حسب الجدول(16):

الجدول(11).تراكيز وأحجام المواد الدخلة في تحضير دارئة معالجة العينة اللازمة لتحضير 10 مل من الدارئة المركزة (5X).		
Sample	**Concentaration**	**Volume**
Tris/Hcl(PH=6.8)1M	16 Mm	0.016 مل
Glycerol	25%	2.5 مل
SDS	10%	1 غ
B-mercaptoethanol	5%	0.5 مل
Bromophenol	0.01%	0.001غ
ddH2O	Sq H2O for 10	6.84 مل

تضاف دارئة معالجة العينة إلى العينات(الرواسب) بتركيز نهائي قدره 1X بحيث يصبح الحجم النهائي للمزيج 20 ميكروليتر ويسخن المزيج لمدة 5 دقائق على الدرجة 95،مما يسمح بتحطيم الروابط الهيدروجينية والروابط اللاتكافؤية لكي يعود البروتين لبنيته الأولية.

دارئة الرحلان الكهربائي :Electrophoresis Buffer

حُضر 1 ليتر من دارئة الرحلان وفق التراكيز النهائية في الجدول (17):

الجدول(12).مكونات دارئة الرحلان

Sample	Concentaration	Sq H2O for 1 Litter
Tris Base	25 Mm	غ3.0285
GLycine	192 Mm	غ 14.14
SDS	0.1%	غ 1

واسمات الأوزان الجزيئية :Molecular Weight Markers

أستُخدمت واسمات أوزان جزيئية معيارية (Promega)، لحساب الأوزان الجزيئية للبروتينات في العينات بعد ترحيلها،ويتألف هذا الواسم من مزيج من تسعة بروتينات مؤشبة تتراوح أوزانها الجزيئية بين 10و 25 كيلو دالتون.

محلول التلوين :Staining Solution

يتكون الملون من أزرق الكومازي الملون النوعي للبروتينات، ويحضر وفق الجدول:

الجدول(13).الأحجام والكميات اللازمة لتحضيرملون أزرق الكومازي

Sample	Valume
Coomassie Brilliant Blue R-250	غ 0.64
Methyl Alcohol	120 مل
Asetic Acid	200مل
ddH2O	80 مل

مزيل اللون :Destaining Solution

يزيل هذا المحلول الارتباط غير النوعي للملون ،ويحضر وفق الجدول (19)،ويكمل الحجم بالماء المقطر إلى 1 ليتر.

الجدول(14).المواد المكونة لمزيل اللون

Sample	Concentration
Methyl Alcohol	30%
Asetic Acid	10%

طريقة العمل:

1. تُسكب هلامة الفصل 15% عندما تصبح جاهزة بعد إضافة 4 ميكروليتر من محلول رباعي ميتيل ايتيلين الأمين Tetra methyl ethylene diamine.
2. تُركت الهلامة للتتبلمر لمدة 10 دقائق.
3. أُضيفت طبقة من محلول الإيزوبربانول Isopropanol،حيث تساعد طبقة الإيزوبربانول في منع البلمرة وتؤدي لسطح أملس على الهلامة المتبلمرة.
4. عندما تتبلمر الهلامة يتم التخلص من طبقة الإيزوبربانول من خلال قلب الهلامة رأساً على عقب وإجراء غسل بالماء المقطر.
5. سكبت هلامة التركيز 5%.
6. أُدخل مشط ذو سماكة 10 ملم بعشرة أبار.
7. تركت الهلامة تتبلمر لمدة 15 دقيقة ،يتم بعد ذلك إزالة المشط .
8. أُضيف محلول الرحلان إلى الأبار بهدوء من أجل التخلص من أثار الأكريلاميد المتبقية التي يمكن أن تعيق رحلان العينة.
9. حُضرت العينات (الرواسب)،المراد ترحيلها بينما تتبلمرهلامة التكديس.
10. أُضيف 5 ميكروليتر من محلول 5X Loading Buffer إلى كل أنبوب موافق.
11. إضافة الماء المقطر إلى أنابيب إبندروف ،بحيث يصبح الحجم النهائي للمزيج 20 ميكروليتر.

12. سُخنت الأنابيب في وعاء يحوي ماء مغلي لـ 5 دقائق.

13. ثُفلت العينة بسرعة 14000 rpm ول 5 دقائق.

14. وُضع 20 ميكروليتر من كل عينة في البئر المناسب.

15. وُضع 10 ميكروليتر من واسم بروتين عياري Standard .

16. رُحلت الهلامة من خلال استخدام الفولطية 85V حتى يتم دخول العينات في هلامة الفصل ،لترفع الفولطية إلى 110 v .

17 أُضيفت صبغة الكومازي R−250 لمدة عشرين دقيقة .

18. ثُفلت الهلامة من محلول صبغة الكومازي إلى محلول مزيل اللون.

النتائج

Results

1.عزل الرنا المرسال من خلايا متنوعة :

عُزل ال Total RNA من مختلف الخلايا بشكل مباشر عبر كاشف Trisol ،تم قياس تراكيز ال RNA بمقياس الطيف الضوئي بطول موجة 260/230 نانو متر وهي كالتالي :

M.S.C : تركز الرنا الكلي 42.5 مكغ /مل بنقاوة 1.1.

S.S.C : تركز الرنا الكلي 41.4 مكغ /مل بنقاوة 1.36.

خلايا دم محيطية: تركز الرنا الكلي 40.3 مكغ /مل بنقاوة 1.1.

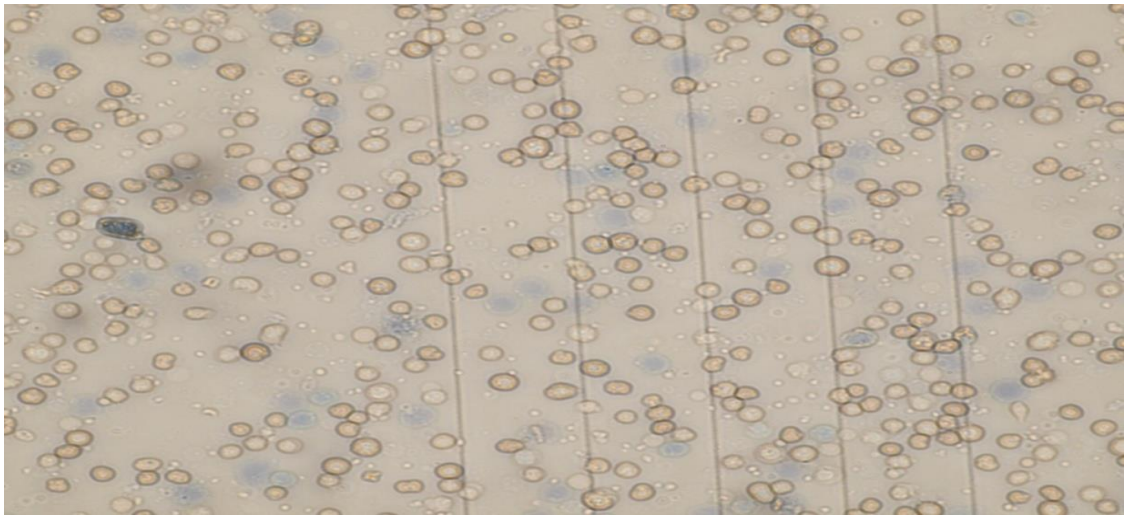
2.عزل الرنا المرسال من خلايا بشرية وحيدة النوى (MNCs):

عُزلت كريات الدم البيضاء وحيدة النوى من الغلالة البيضاء الناتجة من تثفيل الدم المأخوذ من كيس Buffycoat على مدروج ال Ficol ، حسب الشكل:

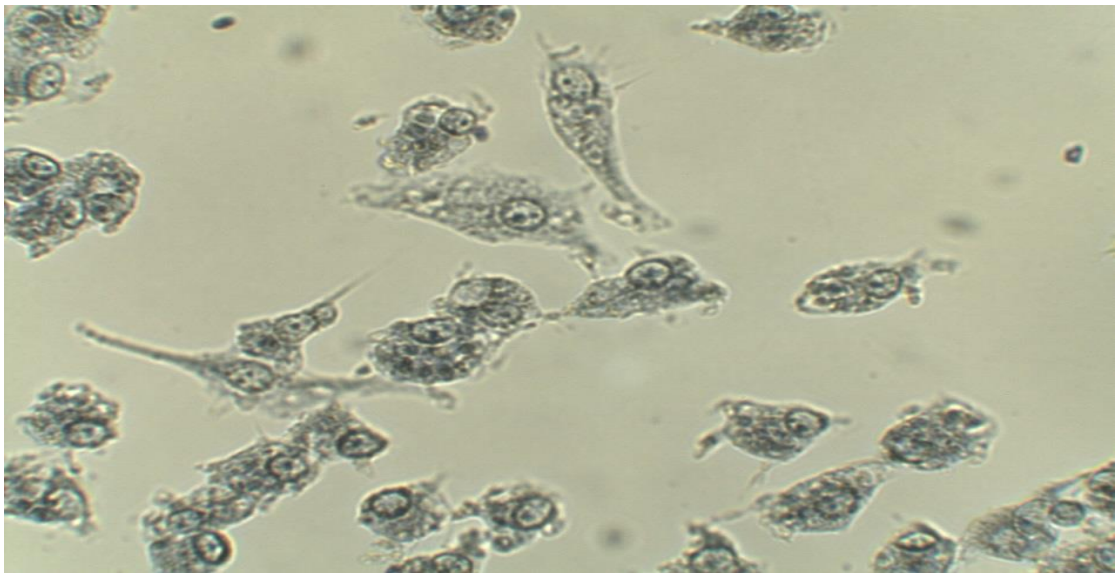


الشكل 25. نواتج تثفيل الدم على مدروج ال Ficol. يوضح الشكل طبقة ال Buffy coat الحاوية على (MNCs) بشكل هالة بيضاء رقيقة

سُحبت طبقة الغلالة البيضاء في الطبقة البينية وأُعيد زرع كريات الدم البيضاء وحيدة النوة في أوساط زرعية خاصة حيث توبع نموها والتصاقها على قعر سطح الزرع عبر المجهر مقلوب العدسة ،وخضعت لمدة 5–7 أيام لتتمايز بعدها إلى البالعات الكبيرة :



الشكل 26. الخلايا الوحيدات النوى بعد فصلها على وسط الفيكول وقبل استنباتها وتمايزها إلى بالعات كبيرة، تحت المجهر الضوئي على ساحة العد عند التكبير 200 مرة.



الشكل 27. الخلايا الوحيدات Monocytes بعد استنباتها مدة 5–7 يوم وتمايزها إلى بالعات كبيرة Macrophage، تحت المجهر المقلوب عند التكبير 400 مرة.

عُولجت البالعات المتمايزة بكاشف Trisol وقِيس تركيز ال Total RNA الناتج بمقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer بطول موجة 260/280 نانو متر،وبلغ تركيز ال Total RNA الناتج (87.3 مكغ/مل) بنقاوة 1.93.

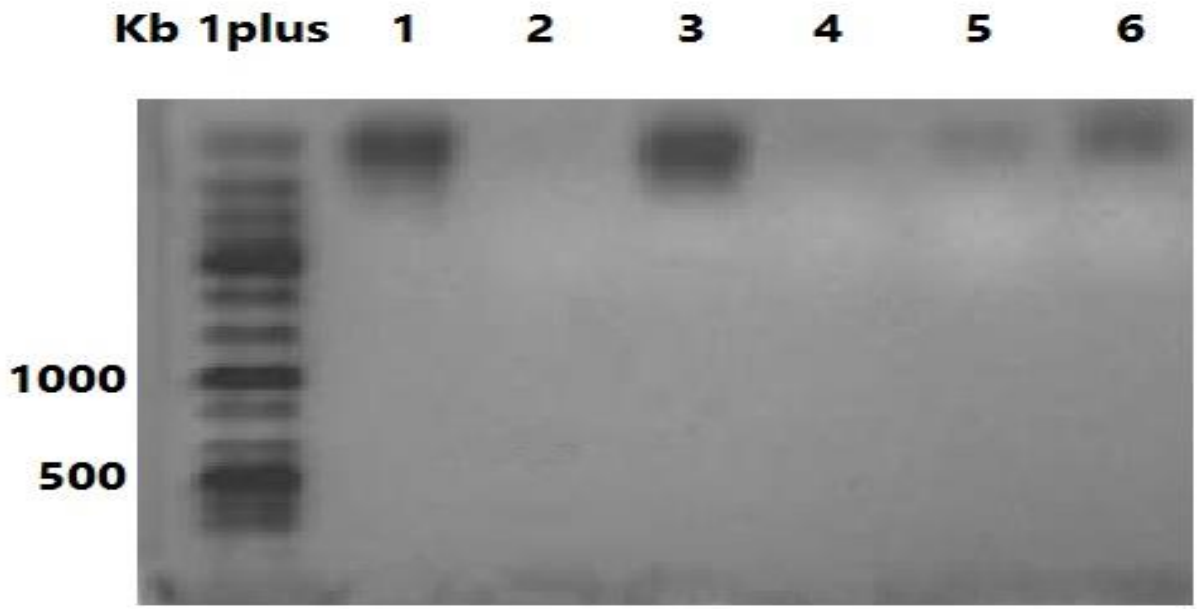
3.اصطناع التسلسل المتمم: cDNA Synthesis

اصطُنعت التسلسلات المتممة لل mRNA المعزول من كافة الأشكال الخلوية السابقة

4.عزل المورثة المشفرة للبروتين المحفز لنمو المحببات GCSF:

1.4.ترحيل تواتج مضاعفة ال cDNA الناتج عن الأنماط الخلوية المتنوعة:

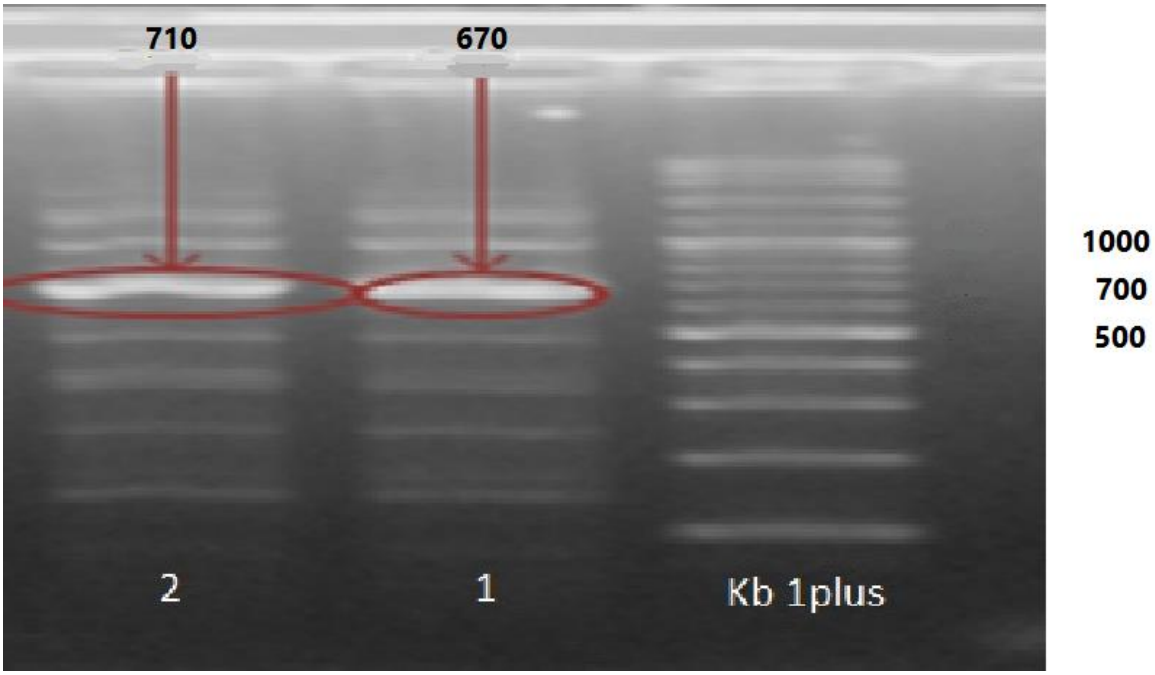
– ضُوعفت التسلسلات المتممة cDNA السابقة بواسطة ال PCR باستخدام زوجين نوعيين من المرئسات المصممان خصيصاً لهذه المورثة.ورُحلت نواتج التضاعف كهربائياً على هلامة الأغاروز 1% ووثقت نتائج الترحيل بالتصوير بالأشعة فوق البنفسجية UV :



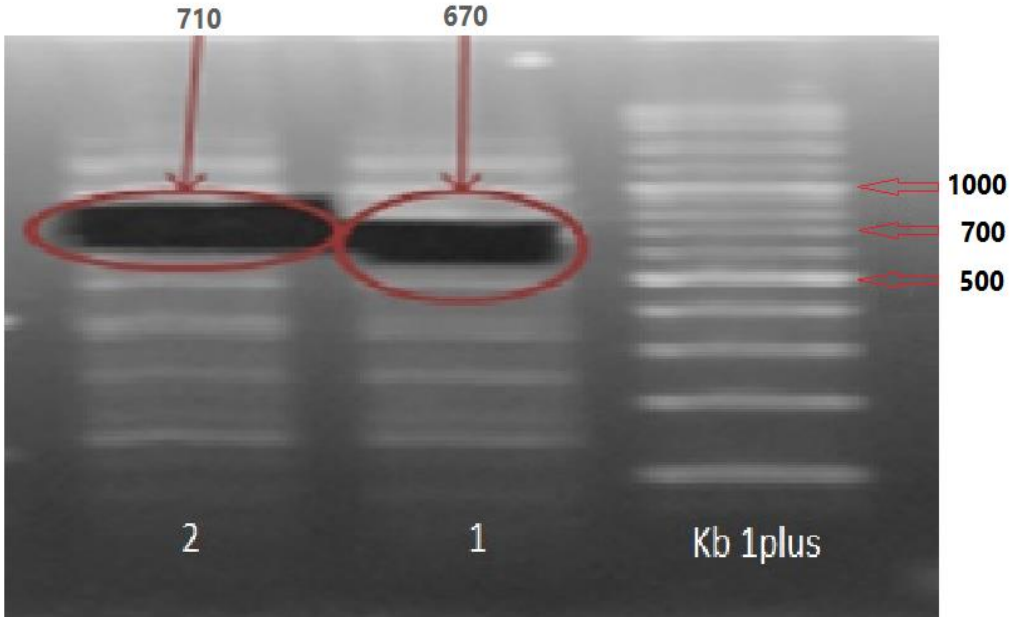
الشكل 28. صورة الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1% لنواتج تضاعف التسلسلات المتممة cDNA للخلايا (دم محيطي،M.S.C،S.S.C) باستخدام زوجي المرئسات (GCF1,GCR1)(GCF2,GCR2) مع كل منها.:
المسار الجانبي :المعياري 1Plus KP، المساران(2.1)دم محيطي مع الزوجين (GCF1,GCR1) (GCF2,GCR2)على التوالي،المساران (4.3)S.S.C مع الزوجين (GCF1,GCR1) (GCF2,GCR2)على التوالي،المساران(6.5) M.S.C مع الزوجين (GCF1,GCR1)(GCF2,GCR2)على التوالي.

2.4.ترحيل نواتج مضاعفة ال cDNA الناتج عن البالعات المتمايزة Macrophage :

ضُوعفت التسلسلات المتممة الناتجة عن mRNA المعزول من البالعات باستخدام HF-PCR ورُحلت النواتج على هلامة الأغاروز(الشكل.30):



الشكل 29. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز 1% للتسلسل المتمم(المعزول من البالعات الكبيرة) المضاعف بواسطة HF-PCR باستخدام زوجي المرئسات (GCF1,GCR1)(GCF2,GCR2):.
المسار الجانبي الأيسر:الشاهد المعياري Kb 1plus،المسار(1) عصابة بطول (670 شفع أساس) للcDNA المضاعف مع زوج المرئسات(GCF1,GCR1)،المسار (2)عصابة بطول (710 شفع أساس) لل cDNA المضاعف مع زوج المرئسات (GCF2,GCR2).



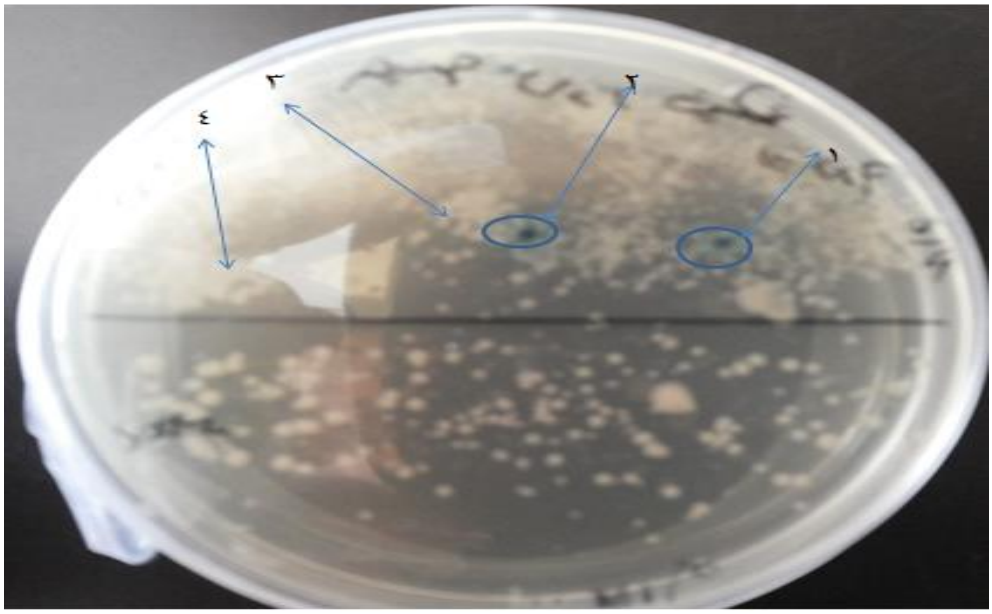
الشكل 30. .قص العصابات الموافقة بالطول لطول المورثة GCSF من الهلامة

5. تنقية المورثة GCSF من الهلامة .

6.ربط المورثة GCSF مع نواقل بلاسميدية مختارة وتنسيل البلاسميدات المأشوبة داخل جراثيم E. coli وتحري عملية التأشيب :

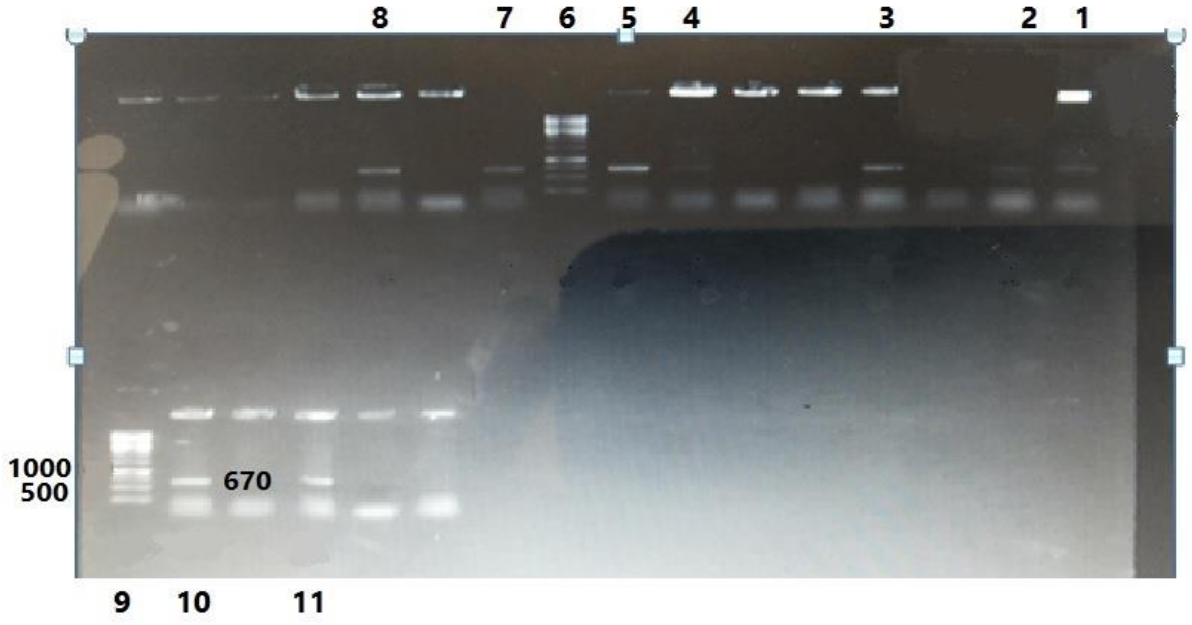
1.6. ربط المورثة مع البلاسميد PTz57R/T:

رُبطت المورثة GCSF المعزولة مع البلاسميد PTz57R/T عبر بروتوكول مخصص، أُدخل البلاسميد المأشوب إلى جراثيم التعبير المورثي *E. coli* DH10B بواسطة الصدمة الحرارية Thermal (Shock)،زُرعت الجراثيم المأشوبة على أطباق بتري مفروشة ب(IPTG,X-gal,Amp) ،استُفردت بعدها عدة نسائل مستحالة بيضاء(الشكل.31) وأُعيد تضخيم المورثة بداخلها باستخدام زوجي المرئسات (GCF1,GCR1) بواسطة ال PCR :



الشكل 31. التقصي الأزرق – الأبيض للجراثيم المأشوبة DH10B الحاوية على البلاسميد PTz57R/T الرابط للمورثة GCSF:

يوضح الشكل نمو الجراثيم المستحالة بالبلاسميد المأشوب بالمورثة باللون الأبيض(3.4)،بينما تتلون الجراثيم المتلقية للبلاسميد غير المأشوب بالمورثة باللون الأزرق(1.2)، وتموت الجراثيم التي لم تتلقى البلاسميد نهائياً تحت تأثير الأمبيسللين.



الشكل 32. الترحيل على هلامة الأغاروز 1% لنواتج مضاعفة المورثة المأشوب داخل الجراثيم المستحالة البيضاء باستخدام زوجي المرئسات (GCF2,GCR2):

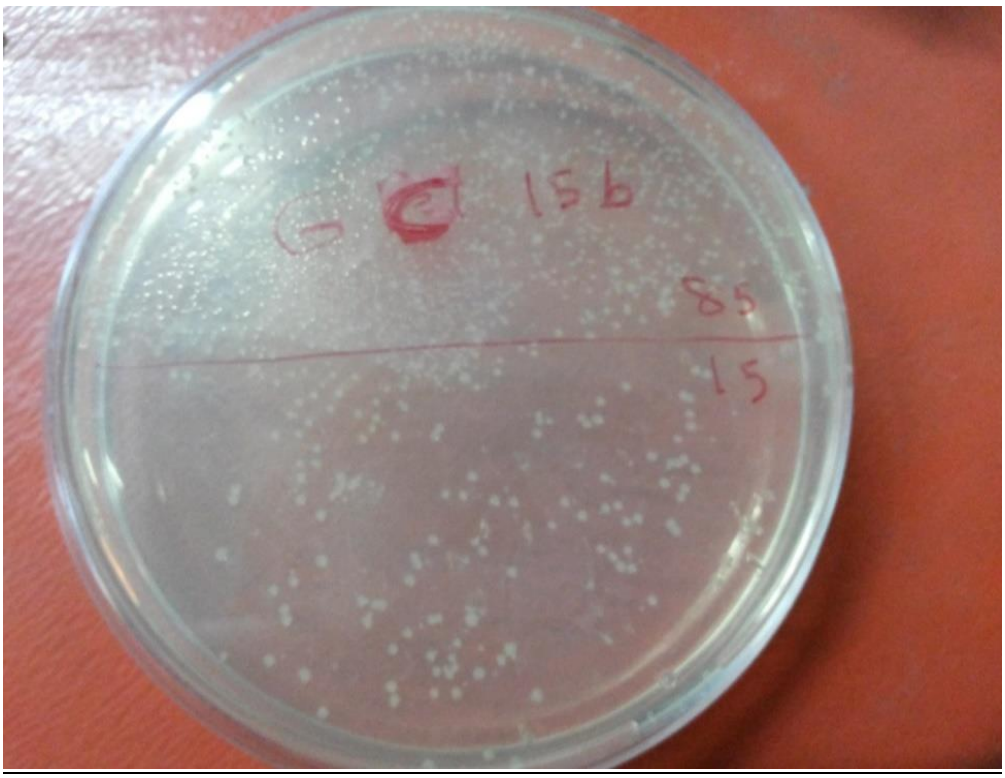
المساران (9.10) شاهد معياري من النمط KB،المسارات (1.2.3.4.5.7.8.10.11) نسائل جرثومية مستحالة بيضاء مستفردة من طبق الزرع تضاعف المورثة GCSF بداخلها وأعطى عصابة بطول 670 شفع أساس في كل منها .

2.6. ربط المورثة مع البلاسميد pET15-b:

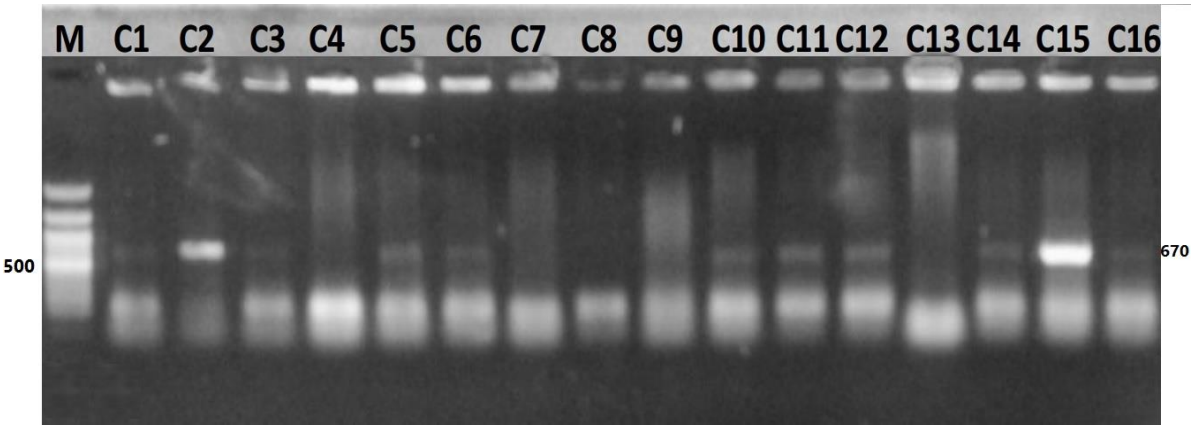
أُدخلت المورثة GCSF إلى داخل البلاسميد بعد أن قُطع كلاهما باستخدام أنزيمي القطع BamHIو NdeI، رُبطت بعدها الشدفة المورثية ذات الطول 670 pb مع البلاسميد المقطوع باستخدام T4 Ligation، نُسل البلاسميد المأشوب pET-15b GCSF داخل جرايثم *E. coli* DH10B مرفوعة الكفاءة بالصدمة الحرارية Thermal Shock، زُرعت الجراثيم المأشوبة على أطباق بتري.

استُفردت عدة نسائل جرثومية مستحالة(الشكل .30) وضخم المورثة GCSF بداخلها لتأكيد نجاح عملية التنسيل، كُثرت المستعمرات المستفردة الإيجابية ،وأُعيد استخلاص البلاسميد المأشوب منها وقطعه باستخدام الأنزيمين BamHI و XbaI.

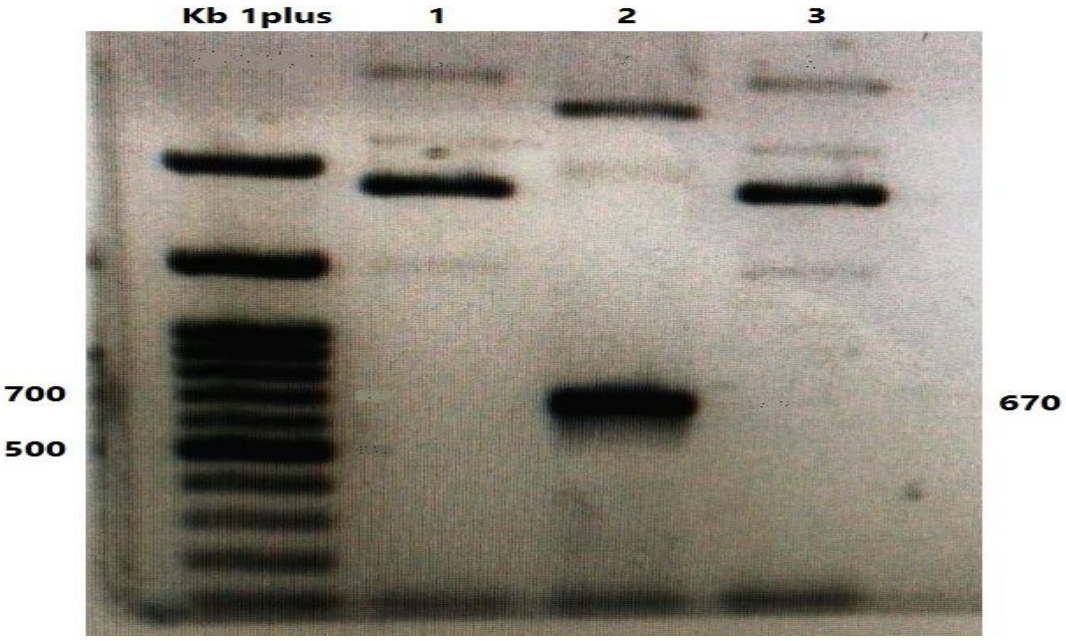
وثقت عملية الاستخلاص والقطع بالترحيل على هلامة الأغاروز 1% والتصوير بUV.



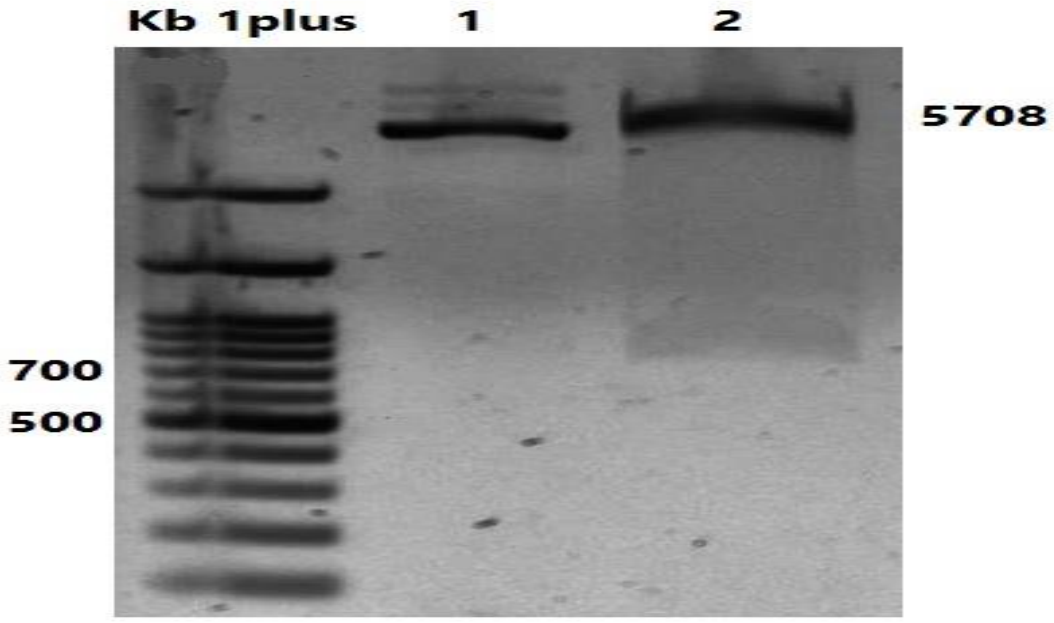
الشكل 33. النمو الجرثومي على أطباق البتري للجراثيم DH10B المستحالة بالبلاسميد المأشوب pET-15b GCSF.



الشكل 34. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لنواتج تضاعف المورثة GCSF داخل 16 نسيلة جرثومية مستحالة ، مستفردة من طبق الزرع: المسار الأيمن M. الشاهد المعياري Kb PLUS، المسارات (C1 .C2. C3. C5. C6.C10.C11.C12.C14.C15.C16) تظهر عصابة تضاعف بطول 670 شفع أساس موافقة لطول المورثة GCSF المأشوب داخل الجراثيم .



الشكل 35. الترحيل على هلامة الأغاروز لنواتج تنقية البلاسميد المأشوب pET-15b GCSF والمضخم بـ PCR المسار (2).يظهر وجود عصابتين إحداهما بطول 670 شفع أساس موافقة لطول المورثة GCSF والأخرى 5708 موافقة لطول البلاسميد pET-15b.

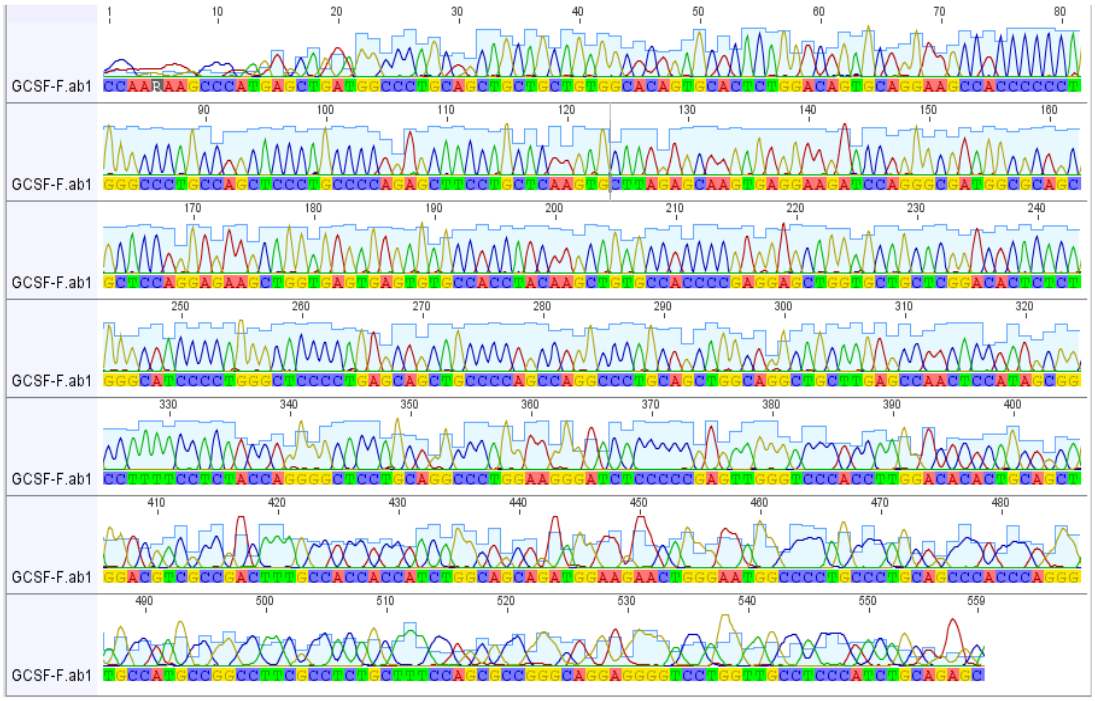


الشكل 36. الترحيل على الهلامة لنواتج قطع البلاسميد المأشوب pET-15b GCSF باستخدام أنزيمي القطع BamHI و XbaI: المسار (2). خروج الشدفة المورثية للمورثة GCSF بتاثير عملية القطع الأنزيمي وظهور عصابة دالة على البلاسميد المقطوع،المسار(1)شاهد سلبي يحوي البلاسميد المقطوع غير الحاوي على المورثة.

7. تحليل تسلسل المورثة GCSF:

تم تحديد التتالي النكليوتيدي للبنية البلاسميدية pET/GCSF للتأكد من عدم حدوث خطأ في تتالي النكليوتيدات أثناء تفاعل التضخيم ،حيث تمت عملية السلسلة باستخدام جهاز تحديد سمات الدنا Genetic analyzer. بينت النتائج عدم وجود أي رامزة (codon) توقف مُبكرة ضمن التسلسل الأمر الذي يدل على نجاح عملية تنسيل المورثة GCSF ضمن البلاسميد pET-15b بالشكل الصحيح وخلو المورثة من أي طفرة أثناء عملية التنسيل (الأشكال 37 و 38) كما أظهرت نتيجة تفاعل السَلسَلة وتراصف ناتج الترجمة الافتراضية للتتالي النكليوتيدي المؤشب وتتالي الحموض الأمينية لبروتين GCSF المخزّن في قاعدة بيانات GenBank برقم NP_000750.1 تطابقاً تاماً بين تسلسل الحموض الأمينية بين البروتينين (الشكل 39). وتبيّن أن البروتين المأشوب يحتوي على تتالي من الحموض الأمينية في النهاية الأمينية، وقدره 18 حمضاً أمينياً، يمثّل جزءاً من التتالي الكلي لببتيد

الإشارة والبالغ 30 حمضاً أمينياً. وباستخدام برمجية Signal P تبيّن أن التتالي المتبقي كافٍ نظرياً لقطع البروتين بإنزيم Signal Peptidase بين الحمضين 18 (ألانين) و 19 (ثريونين) (الشكل 40).



الشكل 37. ناتج سلسلة المورثة GCSF باستخدام المرئسة الأمامية Primer forward

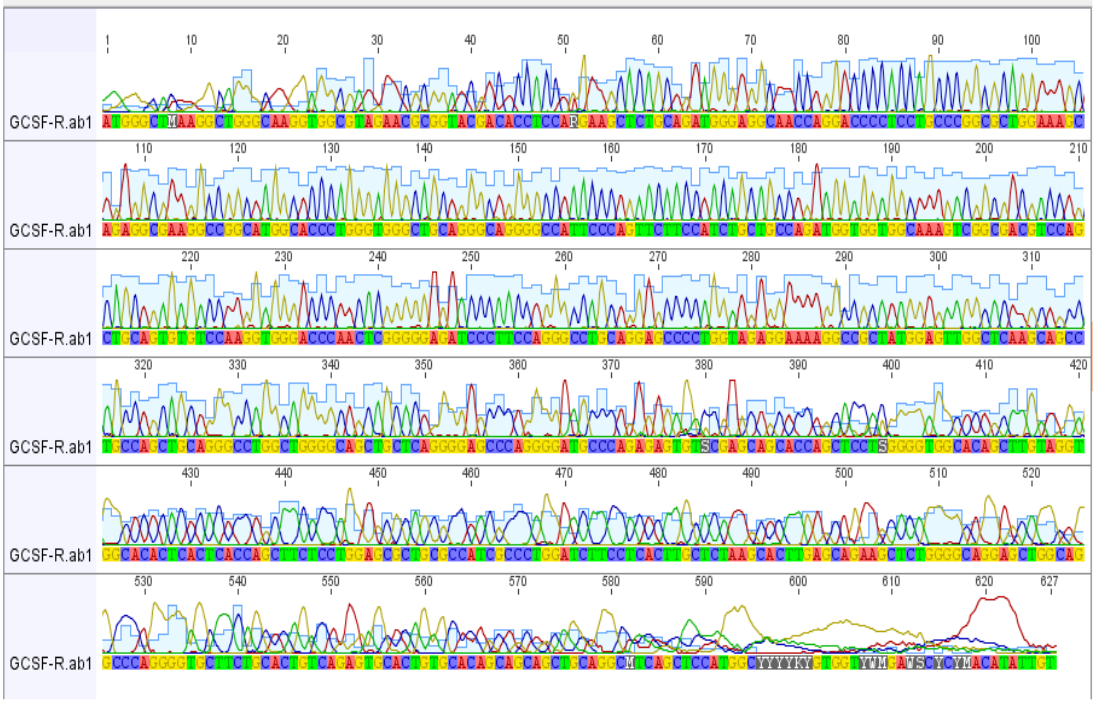
Homo sapiens colony stimulating factor 3 (CSF3), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: NM_000759.3 Length: 1602 Number of Matches: 1

Range 1: 139 to 690 GenBank Graphics Next Match Previous Match

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1020 bits(552)	0.0	552/552(100%)	0/552(0%)	Plus/Plus

Query	9	CCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG	68
Sbjct	139	CCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG	198
Query	69	GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTA	128
Sbjct	199	GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTA	258
Query	129	GAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAG	188
Sbjct	259	GAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAG	318
Query	189	TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGC	248
Sbjct	319	TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGC	378
Query	249	ATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTG	308
Sbjct	379	ATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTG	438
Query	309	AGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATC	368
Sbjct	439	AGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATC	498
Query	369	TCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACC	428
Sbjct	499	TCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACC	558
Query	429	ACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGT	488
Sbjct	559	ACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGT	618
Query	489	GCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCC	548
Sbjct	619	GCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCC	678
Query	549	CATCTGCAGAGC 560	
Sbjct	679	CATCTGCAGAGC 690	

الشكل38.مطابقة نواتج السلسلة الناتجة باستخدام المرئسة الأمامية مع التسلسل المخزن في قاعدة المركز الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI باستخدام برنامج BLAST



الشكل 39. ناتج سلسلة المورثة GCSF في جهاز السلسلة باستخدام المرئسة الخلفيةPrimer Reverse

Homo sapiens colony stimulating factor 3 (CSF3), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: NM_000759.3 Length: 1602 Number of Matches: 1

Range 1: 160 to 718 GenBank Graphics Next Match Pr

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1033 bits(559)	0.0	559/559(100%)	0/559(0%)	Plus/Plus

```
Query  1    CAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAGGAAGCCACCCCCCCTGGGCCCT  60
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  160  CAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAGGAAGCCACCCCCCCTGGGCCCT  219

Query  61   GCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAG  120
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  220  GCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTAGAGCAAGTGAGGAAGATCCAG  279

Query  121  GGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGC  180
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  280  GGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAGTGTGCCACCTACAAGCTGTGC  339

Query  181  CACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGC  240
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  340  CACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGCATCCCCTGGGCTCCCCTGAGC  399

Query  241  AGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTT  300
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  400  AGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTGAGCCAACTCCATAGCGGCCTT  459

Query  301  TTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACC  360
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  460  TTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATCTCCCCCGAGTTGGGTCCCACC  519

Query  361  TTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAA  420
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  520  TTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACCACCATCTGGCAGCAGATGGAA  579

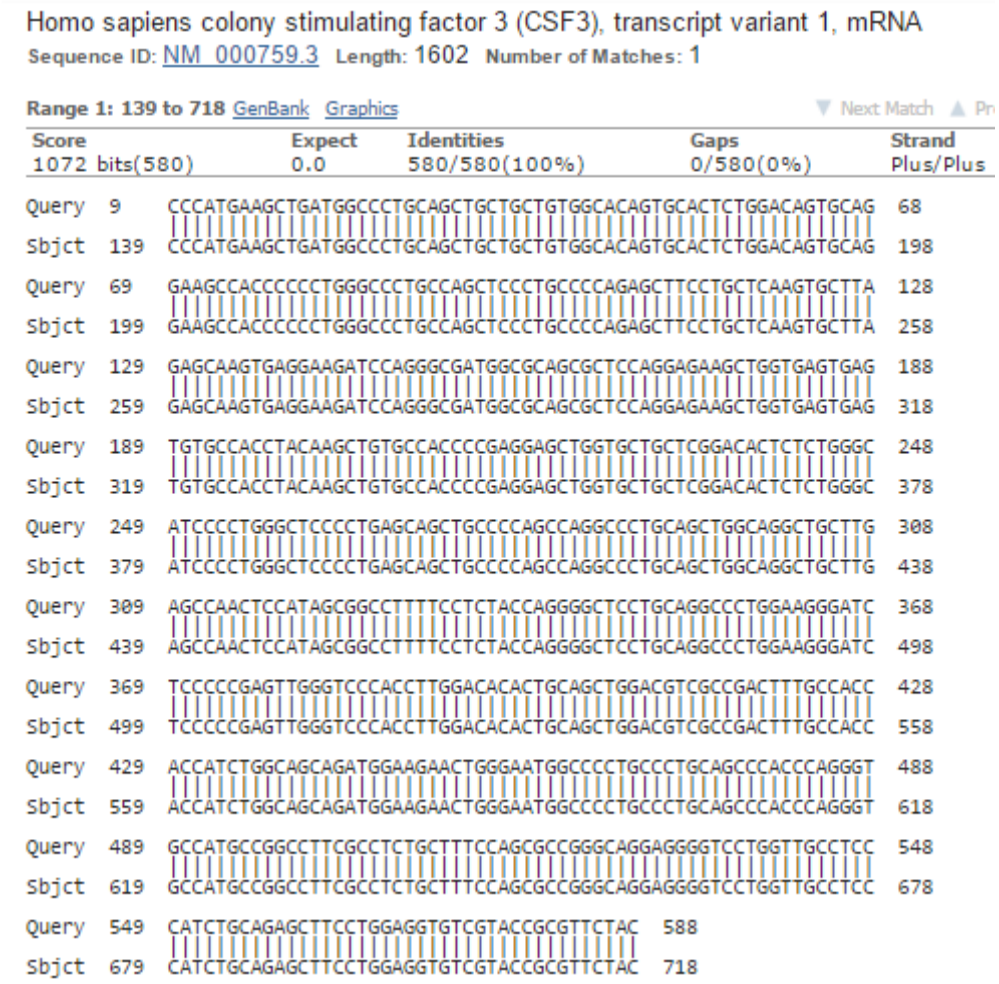
Query  421  GAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCT  480
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  580  GAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGTGCCATGCCGGCCTTCGCCTCT  639

Query  481  GCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAG  540
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  640  GCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCCCATCTGCAGAGCTTCCTGGAG  699

Query  541  GTGTCGTACCGCGTTCTAC  559
            |||||||||||||||||||
Sbjct  700  GTGTCGTACCGCGTTCTAC  718
```

الشكل 40.مطابقة نواتج تراصف السلسلة الناتجة باستخدام المرئسة الخلفية مع التسلسل المخزن في قاعدة المركز

الوطني لمعلومات التقانة الحيوية NCBI باستخدام برنامج BLAST


Homo sapiens colony stimulating factor 3 (CSF3), transcript variant 1, mRNA
Sequence ID: NM_000759.3 Length: 1602 Number of Matches: 1

Range 1: 139 to 718 GenBank Graphics

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1072 bits(580)	0.0	580/580(100%)	0/580(0%)	Plus/Plus

```
Query  9    CCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG  68
Sbjct  139  CCCATGAAGCTGATGGCCCTGCAGCTGCTGCTGTGGCACAGTGCACTCTGGACAGTGCAG  198

Query  69   GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTA  128
Sbjct  199  GAAGCCACCCCCCTGGGCCCTGCCAGCTCCCTGCCCCAGAGCTTCCTGCTCAAGTGCTTA  258

Query  129  GAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAG  188
Sbjct  259  GAGCAAGTGAGGAAGATCCAGGGCGATGGCGCAGCGCTCCAGGAGAAGCTGGTGAGTGAG  318

Query  189  TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGC  248
Sbjct  319  TGTGCCACCTACAAGCTGTGCCACCCCGAGGAGCTGGTGCTGCTCGGACACTCTCTGGGC  378

Query  249  ATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTG  308
Sbjct  379  ATCCCCTGGGCTCCCCTGAGCAGCTGCCCCAGCCAGGCCCTGCAGCTGGCAGGCTGCTTG  438

Query  309  AGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATC  368
Sbjct  439  AGCCAACTCCATAGCGGCCTTTTCCTCTACCAGGGGCTCCTGCAGGCCCTGGAAGGGATC  498

Query  369  TCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACC  428
Sbjct  499  TCCCCCGAGTTGGGTCCCACCTTGGACACACTGCAGCTGGACGTCGCCGACTTTGCCACC  558

Query  429  ACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGT  488
Sbjct  559  ACCATCTGGCAGCAGATGGAAGAACTGGGAATGGCCCCTGCCCTGCAGCCCACCCAGGGT  618

Query  489  GCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCC  548
Sbjct  619  GCCATGCCGGCCTTCGCCTCTGCTTTCCAGCGCCGGGCAGGAGGGGTCCTGGTTGCCTCC  678

Query  549  CATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTAC  588
Sbjct  679  CATCTGCAGAGCTTCCTGGAGGTGTCGTACCGCGTTCTAC  718
```

الشكل 41. ناتج تراصف التسلسلات النكليوتيدية باستخدام المرئستين الأمامية والخفية ومطابقتها مع التسلسل النكليوتيدي الكامل لمورثة GCSF المخزنة في قاعدة بيانات المركز الوطني للتقانات الحيوية NCBI، بالرقم NM 000759.3 باستخدام برنامج BLAST، تظهر هذه النتيجة التطابق التام بين التسلسلين النكليوتيدين بمقدار 588 نكليوتيد من طول الجين بدون وجود أي طفرة أو أي رامزة توقف مما يدل على نجاح عملية التنسيل والسلسة.

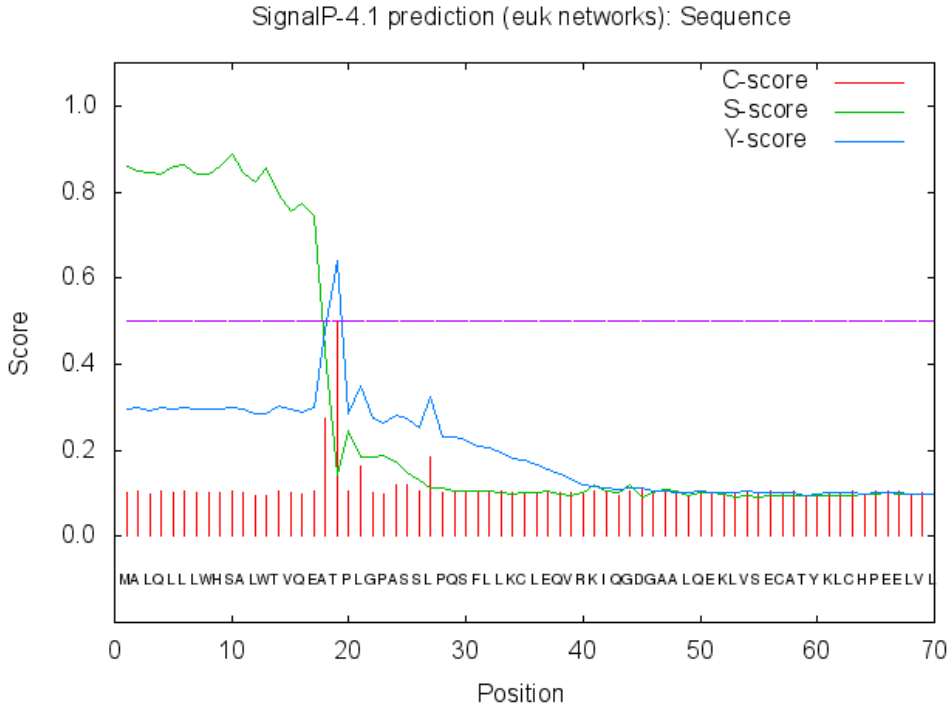
```
Query       MALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATY
GCSF        MALQLLLWHSALWTVQEATPLGPASSLPQSFLLKCLEQVRKIQGDGAALQEKLVSECATY
            ************************************************************

Query       KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPEL
GCSF        KLCHPEELVLLGHSLGIPWAPLSSCPSQALQLAGCLSQLHSGLFLYQGLLQALEGISPEL
            ************************************************************

Query       GPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQS
GCSF        GPTLDTLQLDVADFATTIWQQMEELGMAPALQPTQGAMPAFASAFQRRAGGVLVASHLQS
            ************************************************************

Query       FLEVSYRVLRHLAQP
GCSF        FLEVSYRVLRHLAQP
            ***************
```

الشكل 42. تراصف ناتج الترجمة الافتراضية للتتالي النكليوتيدي المؤشب مع تتالي الحموض الأمينية لبروتين GCSF (GenBank: NP_000750.1). ويظهر التطابق الكامل في تتالي الحموض الأمينية مع ملاحظة وجود تتالي الببتيد الإشاري الضروري لإفراز البروتين في الخلايا حقيقيات النوى (بالخط الغامق). أجري التراصف باستخدام برمجية EMBOSS Needle لمقارنة تتاليين بروتينيين والمحتضنة في قاعدة البيانات الأوروبية للمعلوماتية الحيوية EMBL–EBI.



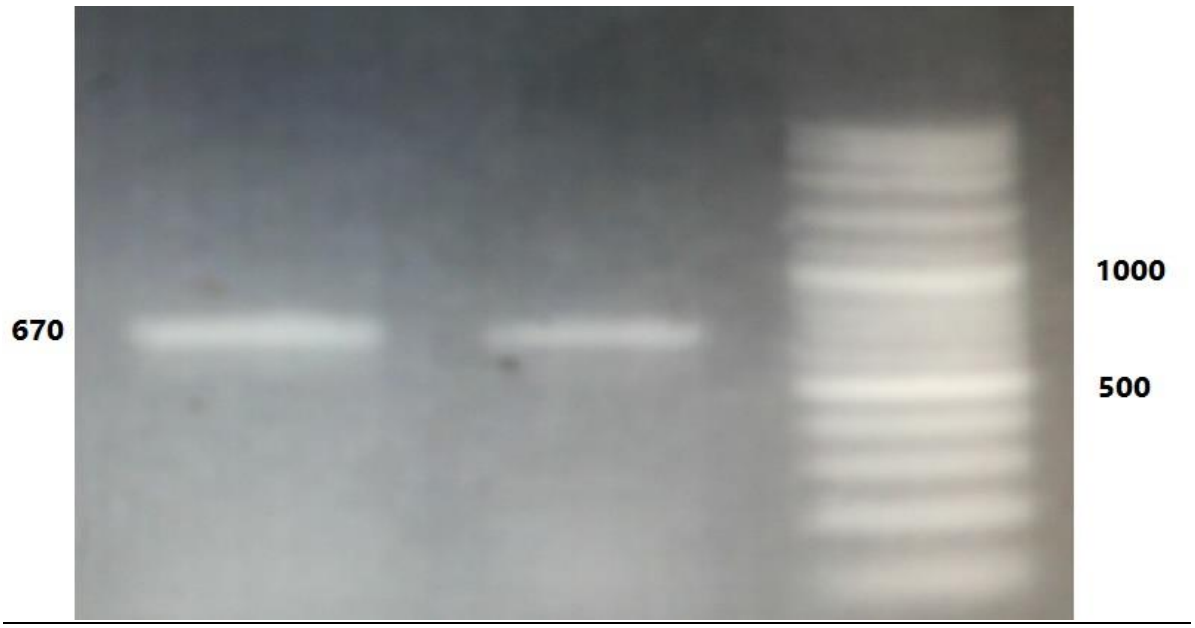
الشكل 43. يُوضّح القطع الإنزيمي الإفتراضي للبروتين المأشوب في دراستنا بين الحمضين الأمينين الألانين 18 و الثريونين 19.

8. التعبير البروتيني: Protein Expression

أعيد تنسيل البلاسميد المأشوب بالمورثة داخل جراثيم التعبير البروتيني *E. coli BL21* عبر الصدمة الحرارية، وزعت الجراثيم على أطباق البتري (الشكل 44). استفردت نسيلتان وتم تضخيم المورثة بداخلهما عبر تفاعل ال PCR لتحري نجاح عملية التنسيل (الشكل 45). أخضعت النسيلتان لعمليات تكثير في الوسط السائل ثم لعملية تحريض التعبير البروتيني بداخلهما واستخدمت درجات حرارة وأوقات حضن متفاوتة لتحري الشروط المثلى لعملية التعبير البروتيني. رُحلت بعدها نواتج التعبير البروتيني على هلامة الأكريلاميد 15% وتم تحري التبصيم البروتيني للبروتين GCSF (الشكلان 46 و 47).



الشكل 44. .نمو الجراثيم *E. coli* BL21 المستحالة بالبلاسميد المأشوب pET-15b GCSF بعد الحضن لمدة 48 ساعة بالدرجة 37 °.



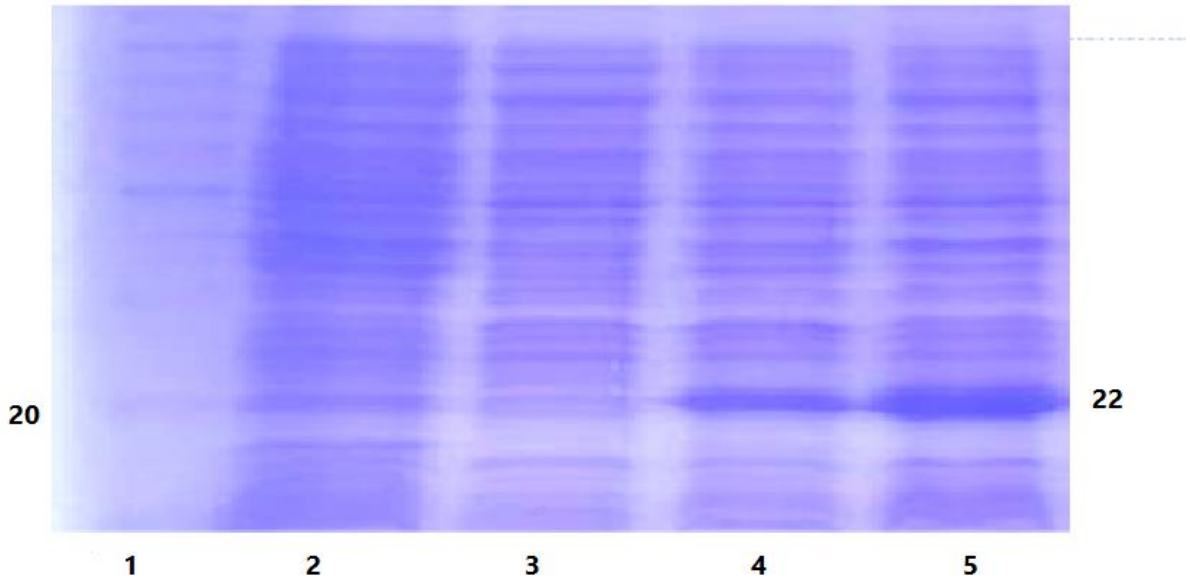
الشكل 45. الرحلان الكهربائي على هلامة الأغاروز لنواتج تضاعف المورثة GCSF داخل نسيلتين مستفردتين من جراثيم التعبير البروتيني المستحالة *E. coli* BI21.



الشكل 46. الرحلان الكهربائي العامودي على هلامة الأكريل أميد 15% SDS-PAGE ،لنواتج التعبير عن البروتين GCSF داخل جراثيم *E. coli* BL21.

المسار (1): ترحيل البروتينات بدون إضافة IPTG بعد الحضن لمدة 16 ساعة، المسار (2): ترحيل البروتينات بعد 16 ساعة حضن بالدرجة 37 مئوية،المسار (3): ترحيل البروتينات بعد ساعتين من الحضن بالدرجة 37 مئوية، المسار (4): سلم البروتينات الجزيئية المعياري MARKER ،المسار (6): ترحيل البروتينات بعد 4 ساعات من الحضن بالدرجة 16 مئوية،المسار (7): ترحيل البروتينات بعد 16 ساعة من الحضن بالدرجة 16 مئوية.

تظهر نتائج الترحيل البروتيني في كافة المسارات وجود عصابة متماثلة الطول دالة على وزن جزيئي يزيد عن 20 كيلو دالتون وهو الوزن الموافق تقريباً لطول جزيئة البروتين المؤشب GCSF (18.8 كيلودالتون) بعد إضافة الوزن الجزيئي لذيل الهستيدين المؤلف من ستة أحماض أمينية والوزن الجزيئي للتسلسل الجزئي لببتيد الإشارة والبالغ ثمانية عشر حمض أميني.



الشكل 47. الرحلان الكهربائي العامودي على هلامة الأكريل أميد 15% SDS-PAGE ، لنواتج التعبير عن البروتين GCSF داخل جراثيم *E coli* BL21.

المسار (1): سلم البروتينات الجزيئية المعياري MARKE ، المسار (2) ترحيل البروتينات بدون إضافة IPTG بعد الحضن لمدة 16 ساعة بالدرجة 37 مئوية ، المسار (3): شاهد سلبي للجراثيم BL21 غير الحاوية على البلاسميد المأشوب،المسار (4):ترحيل البروتينات بعد الحضن لمدة 4 ساعات بالدرجة37 مئوية ،المسار (5):ترحيل البروتينات بعد الحضن لمدة 4ساعات بالدرجة 16 مئوية.

أظهرت عملية إعادة الرحلان بوجود شاهد سلبي وجود عصابة موافقة بالوزن الجزيئي للبروتين GCSF.

المناقشة: Discussion

يُشكّل بروتين GCSF أحد أهم الإضافات لبروتوكولات العلاج لدى العديد من مرضى السرطان بأنماطه المختلفة نظراً لشيوع انخفاض نسبة العدلات في الدم المحيطي لديهم نتيجة المعالجة الكيميائية. إضافةً لذلك، يلعب GCSF دوراً هاماً في علاج بعض اضطرابات الجملة العصبية المركزية مثل الإقفار المخي Cerebral Ischemia والسكتات الدماغية Strokes وفي تجديد النسج الكبدية(Bendal and Bradstock.,2014). وقد تلقى 7.1 مليون شخص العلاج بالبروتين المؤشب (Filgrastim) أو أحد مشتقاته منذ العام 1991، بينما بلغت تكاليف العلاج به ما يقارب 20 مليار دولار منذ ذلك التاريخ [44] .

ولذلك، وإضافةً لغلاء ثمنه، تعمل العديد من الشركات ومراكز البحث اليوم على إنتاج هذا البروتين المؤشب وصياغة أشكال صيدلانية عديدة مشابهة حيوياً Biosimilar منتظرين انتهاء الامتياز قريباً للشركات الصانعة الأم.

عملنا في هذا البحث أولاً على تحديد الخلايا المناسبة التي تعبّر عن مورثة GCSF. وبعد مراجعة الأدبيات الطبية تبيّن أن مورثة GCSF قد عُزل لأول مرة من خط خلوي ورمي حرشفي Squamous Carcinoma Cell Line من النمط CHU-2 مأخوذ من جوف الفم من قبل (Nagata et al.,1986)، بينما قام (Watari et al.,1994) بعزله من خلايا جذعية معزولة من دم حبل سري، وقام (Fallah et al.,2003) بعزله من خلايا دموية بيضاء وحيدة النوى تمايزت إلى بالعات كبيرة. وأصبح هذا المورثة متوفراً حديثاً كتسلسل نكلوتيدي صنعي مطابق للشكل البشري، يستخدم بشكل مباشر في العديد من الأبحاث(Alrokayan.,2011).

وقد أجرينا في البداية عدة محاولات لعزل الرنا المرسال من الخلايا الجذعية الميزنشيمية المشتقة من الحبل السري، كما أجري سابقاً (Watari et al.,1994)، والخلايا السدوية المعزولة من نقي العظم

وخلايا كريات بيض معزولة من الدم المحيطي من المفترض أنها تعبر عن مورثة GCSF، إلا أن جميع تلك المحاولات باءت بالفشل، ربما بسبب التراكيز المنخفضة للرنا الكلي الذي استخلص من هذه الخلايا، حيث لم تتجاوز تراكيزه في مختلف الأنماط السابقة 45 ميكروغرام/مل في أحسن الأحوال. لاحقاً ، طبقنا بروتوكول لعزل الكريات البيض من طبقة الغلالة البيضاء المستحصل عليها من بنك الدم وحرّضنا تمايزها مخبرياً إلى بالعات كبيرة من المفروض أنها تعبّر أيضاً عن البروتين GCSF (Fallah et al.,2003)، حيث عُزلت كريات الدم البيضاء وحيدة النوى (MNCs) على مدروج الفيكول من طبقة الغلالة البيضاء Buffy Coat المستحصل عليها من بنك الدم. زرعت هذه الخلايا في فلاسكات الزرع في وسط RPMI المدعم بمصل البقر الجنيني تبعاً لبروتوكولات عيارية(Davaid and Sally,2007). أظهرت الخلايا المتمايزة بعد الزرع مورفولوجية مشابهة للبالعات الكبيرة واستخلص منها الرنا الكلي وأجريت عليه خطوات لاحقة متسلسلة اعتمدت على تنسيل الدنا المتمم للرنا المرسال لمورثة GCSF في أحد البلاسميدات العيارية المستخدمة في التعبير عن المورثة المؤشب داخل سلالات جرثومية خاصة.

جاءت نتائج التضخيم إيجابيةً باستخدام تفاعل PCR بوجود مرئسات نوعية لمورثة GCSF، حيث ظهرت عصابتان بالطول المتوقع وباستخدام زوجين مختلفين من المرئسات قمنا بتصميمهما بوسائل معلوماتية حيوية وليس اعتماداً على تسلسلات منشورة سابقاً. استُخدم الزوج الأول من المرئسات النوعية في تضخيم الدنا المتمم لمورثة GCSF، واعتمدنا على تنسيل القطعة المضخمة في بلاسميدpTz57R/T بطريقة التنسيل TA (TA cloning) عبر ارتباط نكليوتيد الأدنين على طرفي `3 للقطعة المضخمة مع نكليوتيديT الحرّين في البلاسميد المقطوع والمتوفر تجارياً، متبوعاً بربط القطعة المضخمة بالبلاسميد بإنزيم ligase T4. كان الهدف من ذلك التأكد من تسلسل المورثة المؤشب بعد إجراء تفاعل السلسلة. لكننا وبعد محاولات عدة لم نحصل على التسلسل النكليوتيدي للقطعة المضخمة

بل كان هنالك تشويش واضح في نتائج السلسلة التي لم تمكننا من التعرف على التسلسل النكليوتيدي. وقد يُعزى ذلك إلى التراكيز المنخفضة لقِطَع البلاسميد المُنقّاة من هلامة الآغاروز أو إلى تعرف وارتباط غير نوعي للمرئسات النوعية لـ GCSF بمواقع متممة لها على البلاسميد pTZ57R/T.

ولما كان الهدف الأساس هو التعبير المورثي لمنتَسَخ Transcript مورثة GCSF، فقد حصلنا لاحقاً على بلاسميد آخر يستخدم في التعبير المورثي للبروتينات المؤشبة هو pET-15b حيث أنه يحتوي على محضض T7 يساهم في التعبير عن المورثة المؤشب في جراثيم إشريكيا قولونية BL21(DE3) معدّلة مورثياً وتحتوي على مورثة إنزيم T7 RNA Polymerase الضروري للارتباط بمحضضه النوعي على البلاسميد ليفعّل بذلك التعبير عن المورثة المؤشب(Duppendrof et al.,1991).

قمنا بالتنسيل الموجّه Directional Cloning لمنتسخ مورثة GCSF باستخدام زوج من المرئسات النوعية للمورثة، وبحيث احتوت إحدى المرئستين على موقع تعرف لإنزيم قطع BamHI بينما احتوت الأخرى على موقع تعرف لإنزيم قطع NdeI. جرى بعد ذلك قطع ناتج التضخيم بكلا الإنزيمين بالتوازي مع قطع البلاسميد pET-15b بكلا الإنزيمين ومن ثم ربط ناتج التضخيم المقطوع مع البلاسميد المقطوع بتواسط إنزيم الليغاز T4. تأكدنا من نجاح استحالة الجراثيم بالبلاسميد المؤشب عبر استفراد عدد من المستعمرات الجرثومية التي مكّنها البلاسميد المحتوى ضمنها من النمو على وسط حاوٍ على الأمبيسيللين بسبب احتواء البلاسميد على مورثة مقاومة الصاد الحيوي. وبعد غربلة عدد من المستعمرات تبيّن نجاح عملية تنسيل الدنا المضخم بنسبة قاربت 70% (11 من أصل 16)، بينما بدا أن 30% من المستعمرات النامية على الوسط احتوت فقط البلاسميد غير المؤشب بسبب غياب عصابة المورثة بعد التضخيم، إما بسبب عدم نجاح القطع الإنزيمي للبلاسميد الأصلي أو بسبب عودة التحام البلاسميد مع نفسه دون انغراس دنا GCSF داخله(Lodish et al.,2000).

وبعد نجاح تنسيل منتج التضخيم الأولي تم استفراد إحدى المستعمرات إيجابية التنسيل وعُزل البلاسميد منها وأجريت سَلسَلة التتالي النكليوتيدي لها باستخدام المرئستين النوعيتين لمورثة البروتين GCSF (GCR1. GCF1).

بيّنت الترجمة الافتراضية لناتج السَلسَلة وإجراء تراصف بين التتالي المترجم افتراضياً وبين تتالي الحموض الأمينية لبروتين GCSF المخزن في قاعدة GenBank برقم NP_000750.1 وجود تطابق كلي بين التتالي البروتيني لكلّ منهما، فيما عدا أن التتالي المؤشب احتوى على جزء فقط من التتالي المقابل لببتيد الإشارة بلغ 18 حمضاً أمينياً، وهو الضروري لإفراز بروتين GCSF خارج الخلايا البشرية المنتجة له. وهذا كان متوقعاً نظراً لأن المرئسة الأمامية التي استخدمت في تفاعل التنسيل صُمّمت بحيث يحتوي الناتج البروتيني النهائي على جزء من ببتيد الإشارة، حيث أن الهدف المستقبلي هو أن يتم التعبير المورثي لبروتين GCSF في كل من جراثيم الإشريكيا القولونية والخلايا حقيقيات النوى.

في الواقع، لا تمتلك خلايا طلائعيات النوى الآلية المناسبة لقطع ببتيد الإشارة وإفراز بروتين GCSF المؤشب، وهو الأمر الذي يتم فقط في لمعة الشبكة الإندوبلاسمية في خلايا حقيقيات النوى(Miller et al.,1998). وقد أُنتج بالفعل بروتين GCSF في خلايا طلائعيات النوى دون فقدانه لفعاليته المحفزة لنسائل المحببات عن طريق حل الخلايا الجرثومية وتنقية البروتين المؤشب من حلالة الخلايا (Lee and Geong,2009) .مع ذلك، فإن وجود 18 حمضاً أمينياً في النهاية الأمينية للبروتين GCSF الناضج قد لا يؤثر على الفعالية الحيوية للبروتين حيث أن النهاية الأمينية لا تتداخل في ارتباط البروتين بمستقبله كما يبيّن (الشكل. 10) أعلاه. وفي نفس الوقت، فإن وجود 18 حمضاً أمينياً في تتالي الإشارة كافٍ نظرياً لإنتاج البروتين الناضج في خلايا حقيقيات النوى كما بين ذلك القطع الافتراضي للبروتين المؤشب في بحثنا من خلال برمجية Signal P (الشكل 43). وهكذا، فمن

المتوقع ألا يفقد البروتين المؤشب في هذا البحث فعاليته الحيوية سواءً أنتج في طلائعيات أم حقيقيات النوى. ويبقى أن تقاس الفعالية الحيوية للبروتين GCSF المؤشب في هذا البحث في تجارب لاحقة بعد إنتاجه في كل من طلائعيات وحقيقيات النوى ومقارنة الفعالية في كل من منظومتي التعبير المورثي.

في الواقع، تمتاز منظومات التعبير المورثي في طلائعيات النوى باعتمادها على مصدر تغذية كربوني رخيص، وبتراكم سريع ومباشر للمنتج البروتيني مع إمكانية قياس هذا المنتج كماً ونوعاً بطرق بسيطة منخفضة التكلفة، بالإضافة لعدم التدرك السريع للخلايا المنتجة مرتفعة الكثافة(Placheviski,2006). في المقابل، نجحت العديد من الأبحاث الحديثة في تأشيب مورثة GCSF في خلايا حقيقيات النوى، كدراسة (Cheine.2010) التي أشّبت البروتين في خميرة *Pichia pastoris*، ودراسة (Samadi et al.,2016) التي أعطت مردوداً عالياً من البروتين المؤشب في *Hansenula polymorpha* مع تكاليف منخفضة بسبب اعتماد هذه الخميرة على الميتانول فقط كوارد استقلابي، ودراسة (Milunovic and Krasevenc.2014) التي استخدمت فطر *Aspergillus niger* سريع التكاثر والذي يعطي بروتيناً أكثر انحلالية.

ويعطي التأشيب في أنظمة حقيقيات النوى الكثير من المزايا، فهو يختصر مرحلة التعديلات اللاحقة للترجمة التي تحتاجها البروتينات المؤشبة في طلائعيات النوى، كما أن الشكل المؤشب في حقيقيات النوى أقرب من حيث التركيب للشكل البشري المفرز داخلياً(Watari et al,1994). لكن وبالمقابل، فإن ضعف الدراسات السريرية على هذه النماذج وعدم حيازتها على موافقة إنتاج أشكال تجارية من هيئات مختصة كـ FDA حتى الأن ، وعدم توفر هذه المنظومات بشكل واسع واحتياجها لشروط نمو وتغذية خاصة كإضافة اللبيدات والسكريات بشكل مستمر ، كل ذلك جعل العمل على حقيقيات النوى صعب المراس [35].

وبهدف قياس التعبير البروتيني عن مورثة GCSF، حرضنا جراثيم سلالة BL21 المستحالة بالبلاسميد المأشوب pET-15b GCSF بإضافة IPTG (Lodish et al,2000)، حيث أظهر الرحلان الكهربائي للبروتين ظهور عصابة بروتينية متوافقة مع الوزن الجزيئي المتوقع للبروتين المؤشب، أعلى من 20 كيلو دالتون بسبب زيادة الحموض الأمينية الـ 18 في النهاية الأمينية إضافةً إلى اندماج البروتين GCSF مع 6 ثمالات من الهيستيدين ستستخدم لاحقاً للتنقية الأولية للبروتين وقياس فعاليته.

أعطى التعبير البروتيني بغياب IPTG عصابةً ضعيفة تعكس تعبيراً مورثياً منخفضاً. وهذا يختلف مع ما أشير إليه سابقاً من إمكانية خفض تكاليف التعبير البروتيني بعدم إضافة الـ IPTG (Vanz and Renard,2008)، حيث بدا بدراستنا أن ذلك انعكس على مردود التعبير المورثي في الجراثيم المستحالة. من جهة أخرى، أعطى التعبير البروتيني بوجود التحريض بـ IPTG عصابة أكثر وضوحاً مع الراسب البروتيني الناتج عن الحضن بالدرجة 16° ولمدة 4 ساعات من حضنه بالدرجة 37°، في حين أن (Provost et al .,1998) وجد أن أفضل شروط التعبير عن البروتين GCSF هي بالدرجة 37° ولمدة 4 ساعات من الحضن على هزازة الإكثار .

وفي الخلاصة، تم في هذا البحث تنسيل مُنتسخ مورثة GCSF في بلاسميد يُمكّن من التعبير المورثي عن بروتين GCSF في سلالة مناسبة من الإشريكيا القولونية.

إن البدء بإنتاج البروتينات البيولوجية المؤشبة ذات التطبيقات الدوائية هو ضرورة ملحّة خاصة في ضوء التكلفة الباهظة لهذه البروتينات وصعوبة الحصول عليها لأسباب مختلفة وقرب انتهاء الامتيازات للعديد منها، الأمر الذي حَذا بالعديد من دول المنطقة بالبدء بإنتاجها وتطويرها، واستخدمت لذلك العديد من منظومات التعبير المورثي في طلائعيات وحقيقيات النوى على حدّ سواء. وتعدّ هذه الدراسة خطوة ضرورية لامتلاك المعرفة الضرورية والتوسع الأفقي للخبرات في مجال إنتاج هذه البروتينات الدوائية.

الاستنتاجات:Conclusions

- أعطت طريقة عزل الرنا المرسال من كريات الدم البيضاء وحيدة النوى عبر التثفيل على وسط الـ Ficol أفضل مردود وأعلى تركيز للرنا المرسال.
- تمكنا من تضخيم منتسخ مورثة GCSF باستخدام مرئسات نوعية صممت بوسائل المعلوماتية الحيوية واعتمدت الدرجة 57° كأفضل درجة لضبط حرارة الالتحام في جهاز المدور الحراري للحصول على أفضل نتيجة تضخيم وتضاعف للبروتين GCSF سواء في عمليات العزل، أو في عمليات التقصي التالي لتأشيب المورثة . تأكدنا من نجاح التضخيم بعد إجراء تفاعل السلسلة.
- أعطى تنسيل البلاسميد داخل الجراثيم بطريقة الصدمة الحرارية نتائج جيدة، حيث وصلت إيجابية استحالة الجراثيم إلى حوالي 70 %
- أعطت عملية التعبير البروتيني بعد أربع ساعات من التحريض بـ IPTG في الدرجة 16° أفضل مردود من التعبير البروتيني بعد الترحيل على هلامةالأكريلاميد.

التوصيات :Recommendations

- تنقية البروتين GCSF بالاستشراب بالإلفة، إما باستخدام عمود النيكل عالي الإلفة لثمالات الهيستيدين المدمجة مع بروتين GCSF المؤشب أو باستخدام أضداد نوعية لبروتين GCSF نفسه.
- التعبير عن البروتين في إحدى منظومات حقيقيات النوى المناسبة.
- قياس الفعالية الحيوية للبروتين المؤشب والمعبر عنه في كل من طلائعيات وحقيقيات النوى باستخدام بروتوكولات مناسبة لذلك.
- إنتاج البروتين المؤشب مخبرياً بشكل نقي تمهيداً لاستخدامه كشكل صيدلاني يعطى للاستطبابات السريرية العديدة الموصوفة في مقدمة هذه الأطروحة.

الملاحق

Appendix

1. المواد المستخدمة:

استخدمت العتائد Kits التالية من مصادرها المبينة في الجدول 1:

الجدول (15).العتائد المستخدمة ومصدرها	
العتيدة Kit	**المصدر Source**
Rneasy mini	Qiagen,USA,
Genejet RNA purification	Thermo,USA
Complementary Revertaid First Strand CDNA Synthesis	Thermo,USA
PCR Cloning Clone Jet	Fermentas ,Germany
Silica bead DNA gel Extraction	Thermo,USA
Genejet plasmid miniprep	Thermo,USA
Quick PCR purification	InvitrogenUSA,
Ins Ta clone PCR cloning	Fermantas, Germany
Nucleic Acid Extraction	Vivantes, Germany

2. الأدوات: Tools

الجدول(16).الأدوات المستخدمة ومصدرها	
Type	**المصدر Source**
EDTA blood collecting tubes أنابيب جمع الدم مزودة بمانع تخثر	Becton Dickinson
Micropipettesممصات مكروية	Eppendorf, Germany
Pipette ممصات	Thermo Scientific , Lithuania
Eppendorf tube 1.5 mlأنابيب إبندروف	Eppendorf , Germany
Tubes 15 ml أنابيب سعة 15مل	Euroclone, Italy
PCR tubes 0.2 mlأنابيب خاصة بجهاز PCR	Eppendorf, Germany

3. التجهيزات :Equipments

الجدول(17).التجهيزات المستخدمة ومصدرها	
Equipment	**Source المصدر**
Thermo cycle	Euroclone, Italy,
حاضنة مع هزاز الاكثار Shaker	Heidoiph,Germany
مقياس الطيف الضوئي Spectrophotometer	Human reader,USA
جهاز الرحلان الكهربائي الأفقي Horizontal electrophoreses	Cleaver,USA
جهاز الرحلان الكهربائي الشاقولي electrophoresis Poly acrylamide gel	BIO-RAD,USA
جهاز توثيق الهلامة Gel Documentation Device	Cleaver,USA
خيمة تعقيم Hood	Cleaver,USA
مثقلة كهربائية الكترونية Centrifuge	Hettich,USA
رجاجة مزج Vortex Mixture	Thermolyner,USA
جهاز ضبط الpH pH meter	Hanna,USA
جهاز التعقيم الجاف (صاد موصد) Auto Clave	J S A C,Japan
حمام مائي Laboratory Water bath	Jubalo,USA
حمام جاف Dry bath	QBT4,UK
جهاز تصنيع الجليد Ice Maker	J S A C,Japan
جهاز خلط العينات Spin	Thermolyne,USA

4. المواد الكيميائية :CHEMICALS

الجدول(18).المواد الكيميائية المستخدمة في البحث ومصدرها	
المواد الكيميائية CHEMICALS	**المصدر Source**
Nitrogen Liquid الآزوت السائل	Sigma,USA
Trisol	Promega,USA
Isopropanol ايزوبروبانول	PDH,UK
Ethanol الايتانول المطلق	PDH,UK
B- mercabto Ethanol	Roth,USA
Agarose	Promega,USA
Tris Acetate EDTA Buffer	Plus one,Sweden
Ethedium Bromide	Roth,USA
Ladder (2s-20000) pb Gene Ruler 1 KP plus DNA	Vivantes,Germany
Ladder Gene Ruler 1 KP DNA	Vivantes,Germany
LB - Broth	Sigma,USA
LB - Agar	Biorad,USA
TE	Promega,USA
$Cacl_2$	Plus one,Sweden
Glycerol	PDH,UK
Ampicillin	PDH,UK
NaOH	Sigma,USA
SDS	PDH,UK
Protein Leader	Vivantes,Germany
Bromophenol blue	Roth,USA
Tris - base	Plus one,Sweden
TEMED	Roth,USA
Acrylamide	Thermo,USA
IPTG	Roth,USA
Ammonium per sulfate	Roth,USA

5. البرمجيات :Software

الجدول(19).البرمجيات المستخدمة	
Type	**Source**
Primers	Primer 3
Sequence Analysis	Geneious
Signal Peptide Analysis	Signal P

SYRIAN ARAB REPUBLIC
DAMASCUS UNIVERSITY
Damascus University Journal
For The Agricultural Seiences
ISSN 1999-7310

الجمهورية العربية السورية
جامعة دمشق
مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية

الرقم : /1325/ ص
التاريخ :2017/8/29

السيد الأستاذ الدكتور نائب رئيس جامعة دمشق لشؤون البحث العلمي والدراسات العليا

تقدم السيد أكرم جمال الأحمر (طالب ماجستير) في كلية الزراعة بجامعة دمشق ببحث للنشر في مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية بعنوان:

" تنسيل العامل المحفز لنمو المحببات البشري GCSF
والتعبير عنه في جراثيم الإشريكية القولونية "

بإشراف الأستاذ الدكتور مجد الجمالي وقد تم تحكيمه وقبوله للنشر.

رئيس تحرير مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية

الأستاذ الدكتور محمد سعيد الشاطر

سورية – دمشق – ص.ب 5735 – هاتف : 33923507 – فاكس : 2129807 / إميل damagricj@gmail.com

References:المراجع العلمية

1. **Abas, H.; Mofid, M.; Khanchezar, S. (2015).** Efficient process development of human Granulocyte colony – stimulating factor production in E. coli. Iranian Biomedical Journal . (24): 310-319.

2. **Alrokayan, S. (2011).** Chemical Synthesis and improved expression of recombinant human Granulocyte colony – stimulating factor cDNA. King abdullah Institute for Nantechnolgy. 10(4): 2671-2678.

3. **Babaeipour, V.; Khanchezar, S.; Mofid, M.R.; PesaranHagi Abbas, M.(2015).** Efficient process development of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor (rh-GCSF) production in Escherichiacoli. Iranian Biomedical Journal. 19(2): 102-110.

4. **Bae, C.S.; Yang, D,S.; Chang, K.R.; Seong, B.L.; Lee, J. (1998).** Enhanced secretion of human granulocyte colony-stimulating factor directed by a novel hybrid fusion peptide from recombinant Saccharomyces cerevisiae at high cell concentration. Biotechnol. Bioeng. (57): 600-609.

5. **Bashir, S.; Sadaf, S.; AKhtar, M. (2015).** Enhanced and secretory expression of human Granulocyte colony stimulating factor by Bacillus subtillis SCK6. Univrsity of the Panjab in Pakistan. (53): 96-102.

6. **Bendall, L.J.; Bradstock, K.F. (2014).** GCSF: from granulopoietic stimulant to bone marrow stem cell mobilizing agent.Cytokine and Growth Factor Reviews. vol. 25, no. 4: 355–367.

7. **Beveridge, R.A.; Miller, J.A.; Kales, A.N. (1998).** A comparison of efficacy of sargramostim (yeast-derived RhuGM-CSF) and filgrastim (bacteria-derived RhuG-CSF) in the therapeutic setting of chemotherapy-induced myelosuppression. Cancer Invest. 16(6): 366–373.

8. **Cheien, s.f.(2010).** Cloning and expression of Bioactive human Granulocyte colony - stimulating factor in PichiaPastoris. Journal of the Chinese chemical Society. (57): 850-856.

9. **Chomczynki, K.; Sacchi, N. (1987).** Single-Step method of RNA Isolation by Acid guanidiniumthiocyanate phenol-Chloroform extraction. Anal biochem. (9): 159-162.

10. **Chris J.(2008).** Drug benefits and risks: international textbook of clinical pharmacology. New York Wiley health. 55: 22-30.

11. **Devlin, P.E.; Drummond, R.J.; Toy, P.; Mark, D.F.; Watt, K.W.; Devlin, J,J. (1988).** Alteration of amino-terminal codons of human granulocyte-colony-stimulating factor increases expression levels and allows efficient processing by methionine aminopeptidase in Escherichia coli. Gene. (65): 13-22.

12. **Dubendorff, J.W.; Studier, F.W. (1991).** Controlling basal expression in an inducible T7 expression system by blocking the target T7 promoter with lac repressor. J. Mol. Biol. (219): 45-59.

13. **Fallah, m.; Akbar, B.; Saeedinia, R, Karimi, M.; Vaez, M.; Zeinoddini, M.; Soleimani, M.; Maghsoudi, N. (2003).** Overexpression of Recombinant human Granulocyte colony - stimulating factor in E. coli. Department of Genetic Engineering, Research Center for Science and Biotechnology. Iran. (46): 130-134.

14. **Finkel, K.; Elizabeth, T. (2005).** Stem cells: controversy on the frontiers of science. Crows Nest: ABC Books. (22): 22-29.

15. **Forger, A.; Hall, J. (2007).** Transformation of plasmid DNA into E. coli using the Heat Shock method. Journal of Visualized. (6): 253-257.

16. **Heit, B.; Jones, G.; Knight, D.; Antony, J.M.; Gill, M.J.; Brown, C.; Power, C.; Kubes, P.(2006).** HIV and other lentiviral infections cause defects in neutrophil chemotaxis, recruitment, and cell structure: immune restorative effects of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. J. Immunol. 177: 6405-6414.

17. **Jeong, K.J.; Lee, S,Y. (2001).** Secretory production of human granulocyte colony-stimulating factor in Escherichia coli. Protein Expr. Purif. (23): 311-318.

18. **Hejmadi, M. (2010).** Introduction to cancer Biology. ISBN. 55: 22-28.

19. **Kang, S.H.; Na, K.H.; Park, J.H.; Park, C.I.; Lee, S.Y.; Lee, Y.I. (1995).** high level expressionn and simple purification of recombinant human granulocyte colony stimulating factor in E. coli. Biotechnol. Lett. 17(7): 687-692.

20. **Khalal, M.; Samie, A.; Samadi, T.(2016).** Expression of granulocyte stimulating factor in HansenulaPolymorpha . Iranian Journal of Microbiolog. (555): 222-228.

21. **Lodish, H.; Berk, A.; Zipursky, S.L.; Matsudaira, P.; Baltimore, D.; Darnell, J. (2000).** Molecular Cell Biology. 4th e edition. New York: W. H. Freeman. (5): 55-56.

22. **Liongue, C.; Wright, C.; Russell, A.P.; Ward, A.C.(2009).** Granulocyte colony-stimulating factor receptor: stimulating granulopoiesis and much more. Int. J. Biochem. Cell Biol. (41): 2372-2375.

23. **Liu, X.X.; Jiang, Y.P. (2010).** Pharmacokinetic study of a novel recombinant human granulocyte colony-stimulating factor in rats. Chin. Med. Sci. 25: 13-19.

24. **Lybecker, K. (2008).** Revolution in The Production of drug. Fraser Institute. 57: 22-42.

25. **Milunovic, T.; Krasevec, N. (2014).** Expression of human Granulocyte colony – stimulating factor produced in Filamantous Fungus Aspergillusniger. Zandoz Company. (55): 33-46.

26. **Murphy, K. (2012).** Innate immunity: the first line of defense. IN: Immunobiology, 8th edition, Garland Science, NY, USA.

27. **Nagata, S.H. (1989).** Gene structure and function of granulocyte colony stimulating factor. Bio. Essays. 10(4): 113-117.

28. **Nagata. S.; Tsuchiya, M.; Asano, S.; Yamamoto, O.; Hirata, Y.; Kubota, N.; Oheda, M.; Nomura, H.; Yamazaki, T. (1986).** The chromosomal gene structure and two mRNAs for human granulocyte colony-stimulating factor. EMBO. J. (5): 575-581.

29. **Ozdogan, Y.; Yilmaz, S.; Anar, G. (2015).** Chemotherapy Associated Myelosupression. Eurasian Pulmonol. 17: 49-53.

30. **Plachevski, V.; Finkle, S. (2006).** Escherichia Coli Competence gene Homologs are Essential for competitive fitness and the use of DNA as a natrient. Journal of Bacteriology. (11): 3902-3910.

31. **Provos, T.J.; Wallert, S. (1998).** E. coli Culture for protein Expression . Inestigating the Biochemistry. (12): 390-395.

32. **Riccardi, A.(2010).**Principle of cancer treatment and chemotherapy.OncologiaMedica. 87:33-35.

33. **Sally, A.; David, H. (2007).** Isolation Of Human Blood Mononuclear Cell Using Ficol –Hypaque Density Gradient Centrifugation. Biotech. Group. (15): 55-62.

34. **Schneider, A.; Krüger, C.; Steigleder, T.; Weber, D.; Pitzer, C.; Laage, R.; Aronowski, J.; Maurer, M.H.; Gassler, N.; Mier, W.; Hasselblatt, M.; Kollmar, R.; Schwab, S.; Sommer, C.; Bach, A.; Kuhn, H.G.; Schäbitz, W.R. (2005).** The hematopoietic factor GCSF is a neuronal ligand that counteracts programmed cell death and drives neurogenesis. Journal of Clinical Investigation. 115(8): 2083–2098.

35. **Shuz, h.; Qinong, Y. (1998).** Expression of cDNA for rhuG-CSF in E. coli and characterization of the Protein. Chin. J. Cancer Res. (10): 256-259.

36. **Souza, L.M.; Boone, T.C.; Gabrilove, J.; Lai, P.H.; Zsebo, K.M.; Murdock, D.C.; Chazin, V.R.; Bruszewski, J.; Lu, H.; Chen, K.K.; Barendt, J.; Platzer, E.; Moore, M.A.S.; Mertelsmann, R.; Welte, K. (1986).** Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor: effects on normal and leukemic myeloid cells. Science. 232 (4746): 61–65.

37. **Talebkhan, Y.; Samadi, T.; Samie, A.; Barkhordari, F.; Azizi, M.; Khalaj, V.; Mirabzadeh, E.(2016).** Expression of granulocyte colony

stimulating factor (GCSF) in Hansenulapolymorpha. Iranian Journal of Microbiology, 8(1):21-28.

38. **Thomas, J.; Liu, F.; Link, D.C. (2002).** Mechanisms of mobilization of hematopoietic progenitors with granulocyte colony-stimulating factor. Curr. Opin. Hematol. 9(3): 183-189.

39. **van Boxtel, C.J.; Santoso, B.; Edwards, I.R. (2001).** Drug benefits and risks: international textbook of clinical pharmacology. Br. J. Clin. Pharmacol. 54(2): 186.

40. **Vanz, A.L.; Renard, G.; Palma, M.S.; Chies, J.M.; Dalmora, S.I.; Basso, L.A.; Santos, D.S. (2008).** Human granulocyte colony stimulating factor (hG-CSF): cloning, overexpression, purification and characterization. Microb. Cell Fact. (7): 8-13.

41. **Watari, K.; Ozawa, K.; Tajika, K. (1994).** Production of human granulocyte colony stimulating factor by various kinds of stromal cells in vitro detected by enzyme immunoassay and in situ hybridization. Stem Cells. 12(4): 416-423.

42. **Yamasaki, M.; Konishi, N.; Yamaguchi, K.; Itoh, S.; Yokoo, Y..(1998).** Purification and Characterization of recombinant human Granulocyte colony stimulating factor (rhG-CSF) derivatives: KW-2228 and other derivatives. Japan Biotechnology Journal. 9 (3): 183-189.

43. **Zhang, Y.; Wang, W.; Sun, Z.; Feng, D.; Deng, Y.; Liu, Y.; Zhao, G.; Wang, H.; Huang, Y.(2010).** Granulocyte colony-stimulating factor treatment prevents cognitive impairment following status epilepticus in rats. Biol. Pharm. Bull. (33): 572-579.

44. **National Cancer Institute.** Available from: http://www.cancer.gov/cancert opics/factsheet/Risk/BRCA Last accessed Feb 2017.

45. **AmericanCancerSociety**.http://www.cancer.org/Cancer/CancerCauses/OtherCarcinogens/MedicalTreatments/radiation exposure and cancer.Last accessed June 2017.

46. **Cancer Research UK.** Available from: http://www.cancerhelp.org.uk/about-cancer/causes-- symptoms/causes/what causes cancer viruses--. Last accessed January 2016.

47. **BCCancerAgency**.Availablefromhttp://www.bccancer.bc.ca/healthprofessionals/professionalresources/cancermanagement\guidelines/supportive-care/febrile-neutropenia. Last accessed September 2016.

48. **WorldHealthOrganisation**.Availablefrom:http://www.who.int/cancer/en/. Last accessed January 2017.

49. **WorldHealthOrganisation**.http://www.who.int/nmh/countries/syr_en.pdf.Last accessed August 2017.

50. **Syrian minisitaryhealth**.http://www.moh.gov.sy/Default.aspx.Last accessed August 2017.

51. **world life expectancy**.http://www.worldlifeexpectancy.com/country-health-profile/syria.Lastaccessed August 2017.

52. **The Balance**. Available from: https: /www.thebalance.com/top-biologic-drugs/ The Top 10 Biologic Drugs in the United States. Last accessed October 2016.

53. **Biotech**. Avaialabe from. https://pimeservices.roche.com/LifeScience/Document/6578b85d-93ed-e311-98a1-00215a9b0ba8. Last accessed August 2016.

54. **HealthWall**. Available from: http://ehealthwall.com/myelosuppression/ What is Myelosuppression . Last accessed. June 2016.

55. **Arizona university**. Available from. http://www.biology.arizona.edu/molecular_bio/problem_sets/mol_genetics_of_eukaryotes/eukaryotes.html. Last accessed November 2016.

56. **RX List**: The Internet Drug Index http://www.rxlist.com/Neupogen-drug.htm -Neupogen Prescription information provided by Amgen. Last accessed November 2016

57. **Market realist**. Available from: http://marketrealist.com/neulasta-expected-witness-modest-decline-revenues-2016/ Neulasta Is Expected to Witness a Modest Revenue Fall in 2016. Last accessed November 2016.

58. **Promega**. Available from. http://www.clontech.com/US/Products/PCR/High_Fidelity_PCR/Advantage_HD_DNA_Polymerase. Last accessed November 2016.

59. **Snapgen**. Available from. http://www.snapgene.com/resources/plasmid_files/ta_and_gc_cloning_vectors/pTZ57R/T. Last accessed March 2017.

60. **UK Sientest**. Available from. http://www.biodynamics.co.jp/images/prd_ds250/DS260BLysShp.pdf. Last accessed November 2016.