الجمهورية
العربية
السورية

تنسيل مورثة عامل التخثر التاسع والتعبير عنها في خلايا الثدييات

دراسة أعدت لنيل درجة الماجستير في العلوم الزراعية

ماجستير التقانات الحيوية

إعداد

أسامة محمد علي النجار

المشرف المشارك

أ.د. هدى القواص

أستاذ في قسم وقاية النبات

كلية الزراعة – جامعة دمشق

المشرف

أ.م.د مجد الجمالي

قسم الكيمياء الحيوية و الأحياء الدقيقة

كلية الصيدلة – جامعة دمشق

2023

الملخص

يعد الناعور ب، أو ما يسمى الهيموفيليا ب، من الأمراض الوراثية ذات الأهمية الكبرى والتي تؤدي إلى حدوث إضطرابات في تخثر الدم وتوقف النزف، حيث يشخّص المرض بنقص في كمية وفعالية عامل التخثر التاسع البشري مما يؤدي إلى تثبيط تشكل الخثرات الضرورية لإيقاف النزوف التلقائية أو المحرَّضة بالآفات المختلفة. لقد ساهم حديثاً اصطناع الأدوية البيولوجية المتضمنة للعامل التاسع المأشوب rFIX في التدبير الجيد لمرضى الناعور ب وتحسين جودة حياتهم. مع ذلك، يشكل ارتفاع ثمن هذه الأدوية البيولوجية أحد المحددات الأساسية في تلقي شريحة كبيرة من المرضى للجرعات المناسبة والكافية لمعاكسة النزوف لديهم.

هدَفْنا في هذا البحث إلى تنسيل مورثة العامل التاسع البشري وإنتاجه في منظومات تعبير جيني لحقيقيات النوى، مع الأخذ بعين الاعتبار التعديلات اللاحقة للترجمة التي تطرأ على العامل التاسع البشري في خلايا الكبد، والضرورية للقيام بوظيفته في تحريض تشكل الخثرات وإيقاف النزف. إلا أن العديد من التحديات واجهتنا، بدءاً من الصعوبة الكبيرة في الحصول على عينات كبد بشرية ملائمة، وانتهاءً بظروف البنية التحتية في المختبرات والتي حالت دون تحقيق أهداف هذا البحث. إذ، وعلى الرغم من قيامنا بكافة الخطوات العملية المطلوبة، من عزل الرنا من عينات الخزعات الكبدية التي حصلنا عليها، واصطناع الدنا المتمم، وتضخيمه باستخدام بادئات نوعية لعامل التخثر التاسع البشري تم التأكد منها عبر وسائل المعلوماتية الحيوية، وتنسيله في البلازميد المناسب للتعبير، وتحوير خلايا الجراثيم به، جاءت نتيجة السَلسَلة النهائية لمنتج التضخيم سلبية ولم نتمكن من الحصول على تسلسل عامل التخثر التاسع للانتقال إلى الخطوات اللازمة للتعبير عنه. وتشير النتائج السلبية لبحثنا إلى ضرورة عزل الرنا المرسال الخاص بعامل التخثر التاسع البشري من خطوط خلوية كبدية بشرية لم نتمكن من الحصول عليها خلال فترة إجراء البحث.

Abstract

Hemophilia B, is considered one of the genetic diseases of great importance that leads to disorders in blood clotting and bleeding cessation. The disease is diagnosed with a deficiency in the amount and effectiveness of human coagulation factor IX, which leads to inhibition of clot formation necessary to stop spontaneous or lesion-induced bleedings. The recent manufacturing of biologic drugs containing recombinant factor IX, rFIX, has contributed to proper management of haemophilia B patients and to the improvement of their quality of life (QoL). However, the high price of these biological drugs constitutes one of the main determinants in receiving a large number of patients the appropriate and sufficient doses to reverse their bleeding.

In this research, we aimed to clone human factor IX gene and produce it in eukaryotic gene expression systems, taking into account the post-translational modifications that occur to human factor IX in hepatocytes, which are necessary to carry out its function in inducing clot formation and bleeding cessation. However, many challenges faced us, starting from the great difficulty in obtaining suitable human liver biopsy samples, and ending with the conditions of the infrastructure in the laboratories, which prevented the achievement of the goals of this research. Despite the fact that we have carried out all the required practical steps, from isolating RNA from liver biopsy samples that we obtained, synthesizing complementary DNA, and amplifying it using specific primers for human coagulation factor IX that have been verified through bioinformatics means, its cloning in a plasmid suitable for expression, and the transformation of bacterial cells with it, the result of the final sequence of the amplification product was negative and we were unable to obtain the sequence of coagulation factor IX to move into the steps necessary for its expression. The negative results of our research indicate the necessity of isolating the mRNA of human clotting factor IX from human liver cell lines that we could not obtain during the research period.

Syrian Arab Republic
Damascus University
Faculty of Agricultural
Master of Biotechnology

Cloning and Expression of Coagulation Factor Nine Gene In Mammalian Cells

by

Osama Mohammad Ali AL.Najjar

Thesis submitted to fulfillment of the requirements
Master degree In Agricultural Science
(Biotechnology)

Supervisors

Prof.Dr. Houda Kwuas

Department of Plant Protection
Faculty of Agricultural
Damascus University

Dr. Majd AL.jamali

Department of Biochemistry and Microbiology
Faculty of Pharmacy
Damascus University

2023