

افزایش میزان بیان ژن Sox2 در سلول‌های فیبروبلاست گاوی با استفاده از TALE-TFs

یاسمن شمشیرگران^{۱*} - مجتبی طهمورث‌پور^۲ - حسام دهقانی^۳ - محمدرضا نصیری^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۴/۲۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰۸/۱۵

چکیده

ژن Sox2 کدکننده یک فاکتور رونویسی موثر در ایجاد و پایداری خاصیت چندتوانی سلول‌های بنیادین پستانداران می‌باشد. در این مطالعه توانایی سلول‌های فیبروبلاست گاوی مورد بررسی قرار گرفت. به این منظور در ابتدا ۳۲۰ جفت باز از منطقه پرموتری ژن Sox2 گاوی توالی‌یابی شد و در ادامه این توالی با اطلاعات ژنوم انسان موجود در بانک جهانی ژن مقایسه شد. هم‌ردیفی توالی‌های به دست آمده نشان داد که این منطقه دارای مشابهت ۹۳/۴۴ درصد با منطقه پرموتری ژن Sox2 انسانی است. لذا با توجه به شباهت موجود توالی‌ها، از یک Sox2-TALE-TF که قبلاً جهت افزایش بیان ژن Sox2 در سلول‌های انسانی استفاده شده بود برای تست فعالیت TALE-TF ها در سلول‌های فیبروبلاست گاوی استفاده گردید. جهت اندازه‌گیری میزان فعالیت TALE-TF ها در سلول‌های فیبروبلاست گاوی از آنالیز بیان ژن (qRT-PCR) و یک سیستم گزارشگر رنگ فلورسنت mCherry تحت کنترل پرموتر minCMV استفاده گردید. بررسی عکس‌های میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که پرموتر minCMV در سلول‌های فیبروبلاست گاوی به شکل کاملاً قوی عمل می‌کند و به عنوان یک گزارشگر برای فعالیت TALE-TF ها قابل استفاده نیست. آنالیز نتایج بیان ژن Sox2 گاوی با استفاده از تکنیک qRT-PCR نشان داد که بیان ژن Sox2 در سلول‌های فیبروبلاست گاوی ترانسفکت شده با Sox2-TALE-TF به میزان ۳/۵۲۹ برابر افزایش داشته است. نتایج این تحقیق نشان داد که TALE-TF ها به عنوان فاکتورهای رونویسی مصنوعی می‌توانند جهت افزایش بیان اندوژنوس ژن‌ها در سلول‌های گاوی به کار برده شوند.

واژه‌های کلیدی: پرموتر minCMV، ژن Sox2، فیبروبلاست گاوی، TALE-TFs

مقدمه

صورت تعدادی تکرار از یک توالی اسید آمینه‌ای به طول ۳۳-۳۴ اسید آمینه است که تمامی این اسیدهای آمینه به جز دو اسید آمینه ۱۲ و ۱۳ (RVD: Repeat Variable Di-residue) به صورت محافظت شده در تمام تکرارهای دامین مرکزی TALEs وجود دارند (۱). البته تکرار پایانی از تعداد کم‌تری اسید آمینه تشکیل می‌شود. هر یک تکرار از این توالی اسید آمینه‌ای در پروتئین TALE، یک جفت باز را در منطقه ژنومی هدف شناسایی می‌کند و بسته به این‌که کدام اسیدهای آمینه در موقعیت این دو اسید آمینه (RVD) قرار بگیرند می‌توان توالی مورد هدف TALEs را بر روی ژنوم پیش‌بینی کرد. ضمن اینکه TALEs به صورت ذاتی جهت باند شدن با منطقه هدف به یک باز تیمیدین نیز در فرادست 5' جایگاه شناسایی نیاز دارند. تاکنون با استفاده از فیوز کردن دامین‌های با عملکرد مختلفی مانند نوکلئازها (۴، ۲۳ و ۲۶) فعال‌کننده‌ها (۱۶ و ۳۱) و یا کاهنده‌های رونویسی (۵) به TALEs محققین توانسته‌اند پروتئین‌های جدیدی را برای کنترل فعالیت ژنوم در یک منطقه خاص هدف تولید کنند. همچنین در دو سال اخیر روش‌های متفاوتی برای تولید آسان و کم هزینه این پروتئین‌ها توسعه یافته‌اند (۴، ۲۳، ۲۴، ۲۶ و ۲۷).

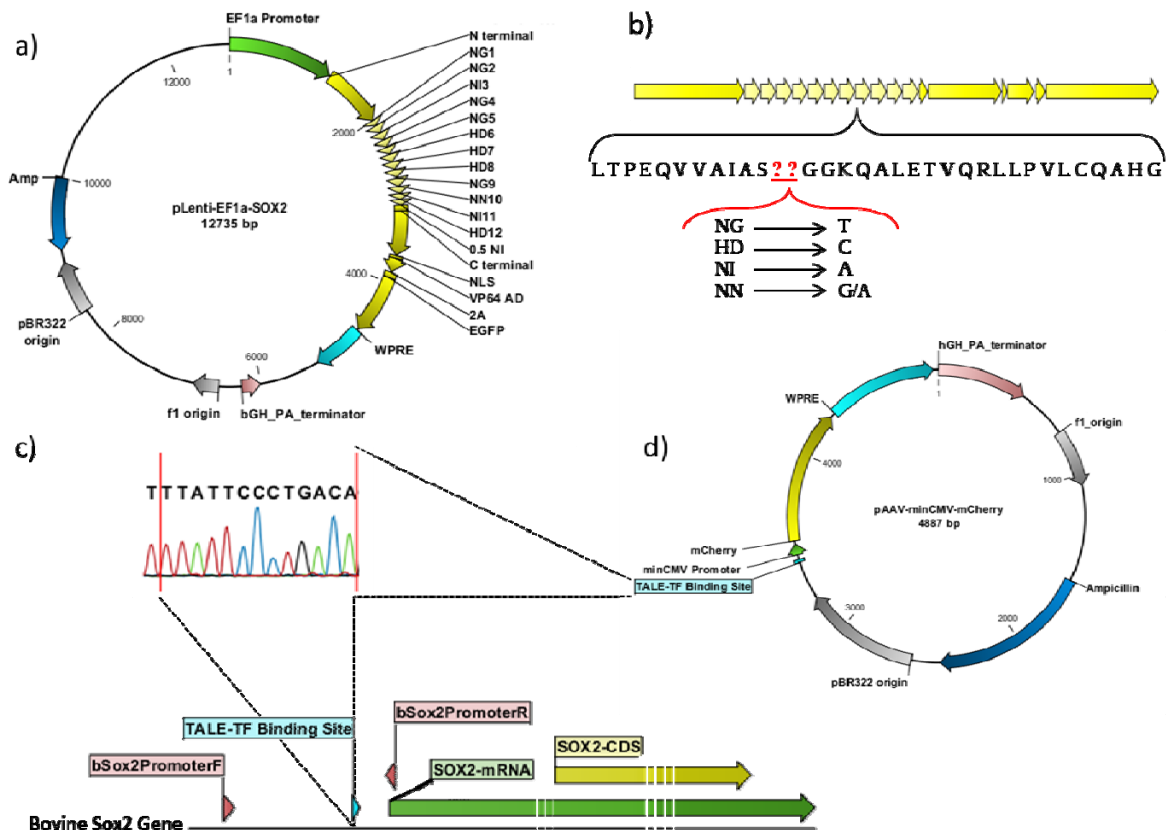
کشف اخیر در مورد نحوه عملکرد پروتئین‌هایی به نام Transcription Activator Like Effectors (TALEs)، که در انواع مختلفی از پاتوژن‌های گیاهی به نام *Xanthomonas* وجود دارند (۱)، موجب شده است تا به شکل کاملاً موثری از توانایی TALEs در زمینه‌های مختلفی مانند علوم پایه، زیست‌شناسی، پزشکی و کشاورزی استفاده گردد (۱۰). این پروتئین‌ها شامل قسمت‌های مختلفی هستند (شکل ۱) اما آنچه که باعث جذابیت آن‌ها به عنوان یک ابزار برای کنترل ژنوم شده است در واقع دامین مرکزی باندشونده به DNA این پروتئین‌هاست که به سهولت قابل مهندسی برای باندشدن با یک منطقه از ژنوم است. این دامین به

^۱ استادیار گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه بیرجند

^۲ استادان گروه علوم دامی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد

^۳ استاد دانشکده دامپزشکی، دانشگاه فردوسی مشهد

* - نویسنده مسئول: (Email: Yas.Shamshirgaran@birjand.ac.ir)

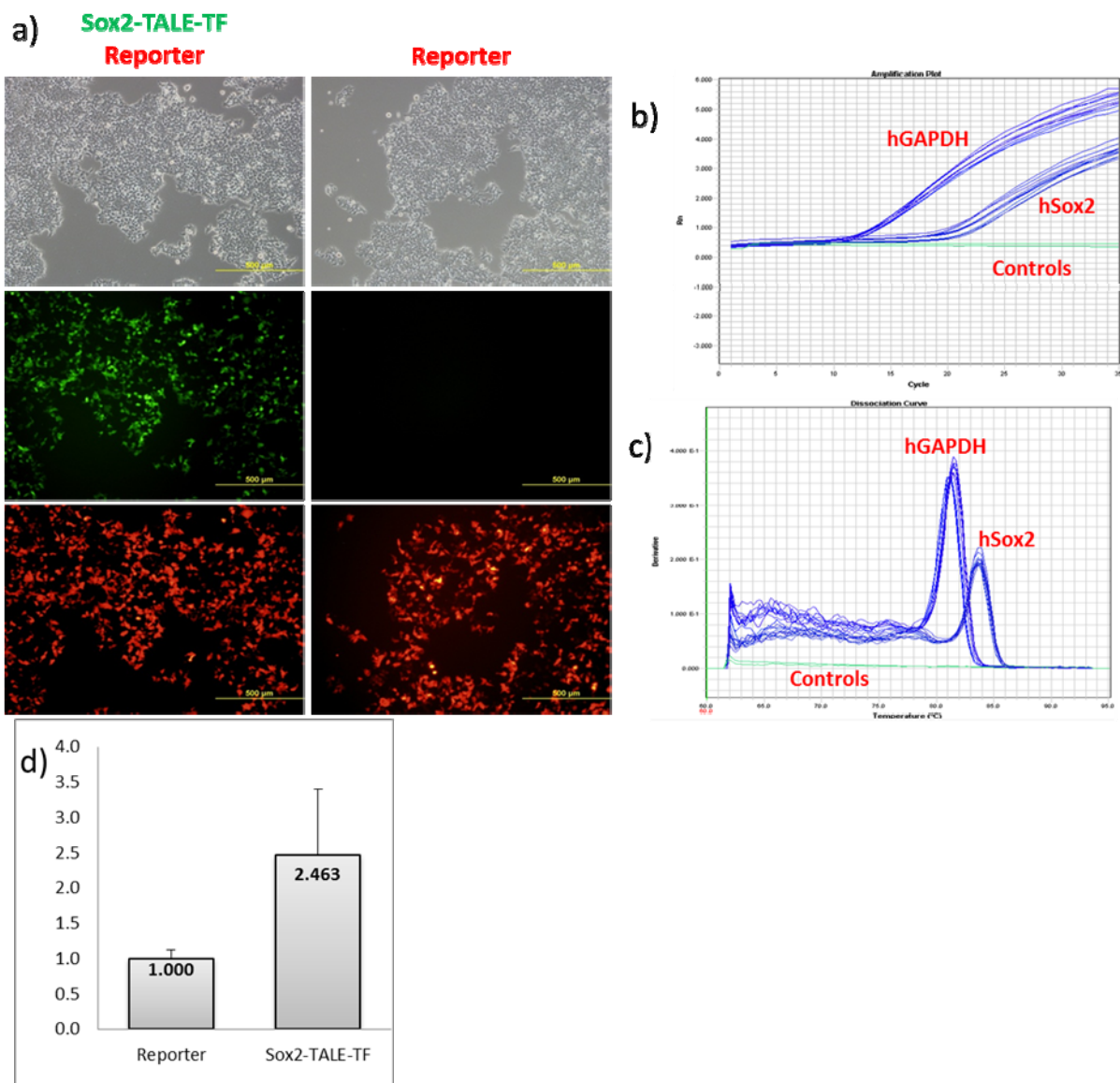


شکل ۱- الف) نقشه پلاسمید pLenti-EF1a-Sox2 کد کننده Sox2-TALE-TF. (ب) توالی اسیدهای آمینه در هر تکرار از دامین مرکزی پروتئین‌های TALEs و موقعیت RVDs که با دو علامت “??” مشخص شده است. (پ) جایگاه آغازگرها و اتصال Sox2-TALE-TF در منطقه پروموتری ژن Sox2 (کاوت) نقشه پلاسمید pAAV-minCMV-mCherry پس از کلونینگ جایگاه شناسایی Sox2-TALE-TF در منطقه فرادست پروموتری minCMV

Figure 1- a) pLenti-EF1a-Sox2 plasmid's map which encodes Sox2-TALE-TF b) Amino acid sequence of each repeat in central DNA binding domain of TALE proteins. The location of RVDs has been marked with “??” c) Schematic of bovine Sox2 gene, location of primers and TALE-TF binding site d) pAAV-minCMV-mCherry plasmid's map after cloning of Sox2-TALE-TF's binding site upstream of minCMV promoter

شامل: Zinc Finger-TFs (ZF-TFs) و TALE-TFs می‌باشند. هر چند استفاده موفقیت‌آمیز از ZF-TFs در سلول‌های انسانی و موشی گزارش شده است (۲۲ و ۲۸). اما عملاً به دلیل مشکل بودن ساخت آن‌ها و هزینه بالای آن‌ها مورد استفاده چندانی قرار نگرفته‌اند. این‌که همه توالی‌های ژنومی قابل هدف‌گیری با ZF‌ها نیستند (۱۷ و ۲۵). از طرفی هر چند TALE-TFs که به تازگی معرفی شده‌اند، ارزان و به راحتی قابل مهندسی هستند اما هنوز نیاز به انجام مطالعات بیشتر جهت اثبات قابلیت آن‌ها در افزایش بیان ژن‌ها، رده‌های سلولی مختلف و همچنین تشخیص پارامترهای موثر بر فعالیت آن‌ها وجود دارد. در جدول ۱ ژن‌های مورد مطالعه، میزان تأثیر TALE-TFs و روش‌های مورد استفاده برای ساخت TALE-TFs مطالعات قبلی لیست شده‌است.

پروتئین Sox2 یک فاکتور رونویسی است که تا کنون از بیان اجباری آن و تعدادی دیگر از فاکتورهای رونویسی جهت تولید سلول‌های پرتوان القا شده (iPSCs: induced Pluripotent Stem Cells) از سلول‌های بالغ موش (۲۹)، گاو (۸) و گوسفند (۱۴) در کنار دیگر فاکتورها (۲) استفاده شده است. در تمامی این روش‌ها از بیان این ژن به صورت اگزوژنوس استفاده شده است. هر چند بیان اگزوژنوس ژن‌ها یک روش متداول برای بیان اجباری ژن‌ها در سلول‌های هدف محسوب می‌شود اما بیان اندوژنوس ژن‌ها با استفاده از فاکتورهای رونویسی مصنوعی در مقایسه با بیان اگزوژنوس آن‌ها دارای مزایایی است (۲۲ و ۲۸) از جمله: تولید وارپته ویرایش شده صحیح (correct spliced version) از mRNA تولید همه محصولات ژنی و استفاده برای ژن‌های خیلی بزرگ که برای بیان اگزوژنوس آن‌ها با محدودیت اندازه ناقل مواجه باشیم. تا کنون دو نوع فاکتور رونویسی مصنوعی مورد استفاده قرار گرفته است که



شکل ۲- الف) عکس‌های میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده با گزارشگر ساخته شده به صورت تنها و یا کوترانسفکت با Sox2-TALE-TF. ب) منحنی تکثیر در مطالعه qRT-PCR برای دو ژن Sox2 و GAPDH. پ) منحنی ذوب آن‌ها. ت) افزایش بیان نسبی ژن Sox2 در سلول‌های HEK293 ترانسفکت شده

Figure 2- a) Florescent microscopy results for HEK293 cell (co-) transfected with Reporter and Sox2-TALE-TF. b) Amplification plot for human Sox2 and GAPDH genes in qRT-PCR and c) the melting curves of PCR products. d) Calculated fold induction of the Sox2 gene in transfected HEK293 cells

مواد و روش‌ها

تکثیر و توالی یابی منطقه پرموتری ژن Sox2 گاوی

استخراج DNA از سلول‌های فیبروبلاست گاوی با استفاده از کیت DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) انجام شد و کیفیت و کمیت آن به وسیله اسپکتروفتومتری NanoDrop 2000 تعیین شد.

هر چند نشان داده شده است که TALE-TFs در سلول‌های گیاهی و پستانداران دارای فعالیت هستند اما تا کنون مطالعه‌ای در مورد استفاده از این پروتئین‌ها در حیوانات مزرعه‌ای گزارش نشده است. هدف از این مطالعه استفاده از این پروتئین‌ها برای افزایش بیان اندوژنوس ژن Sox2 در سلول‌های فیبروبلاست گاوی بود.

جدول ۱- لیست مطالعات قبلی انجام شده در زمینه افزایش بیان اندوژنوس ژن‌ها با استفاده از TALE-TFs
Table 1- List of previously published TALE-TFs and their activities on endogenous genes

منبع Reference	رده سلولی Cell type	ژن هدف Gene targeted	دامین Domain	Fold Change	TALE length
(19)	Plants	Egl3, Bs4, Bs3 Knat1, UPA20	Native	n.d.	n.d.
(31)	HEK 293FT	Sox2	VP64	5.5	12.5
	HEK 293FT	Klf4	VP64	2.2	12.5
	HEK 293FT	cMyc	VP64	n.a.	12.5
(18)	HEK 293FT	Oct4	VP64	n.a.	12.5
	HEK293	NTF3	VP16	30	17.5
(7)	HEK293-Rex	PUMA	VP16	1.5	17.5
	HEK293-Rex	IFN a1	VP16	3	19.5
(4)	HEK293-Rex	IFN b1	VP16	3.5	17.5
	Plants	Bs3	Native	n.d.	13.5
(3)	Mouse ES cells	Oct4	VP16	4	17.5
(5)	Mouse neural SC	Oct4	VP16	30	17.5
	Human 293FT	CACNA1C	VP64	3-5	16.5
(30)	Human 293FT	FXN	VP64	3.1	13.5
(6)	Human U-2OS	OSGIN2	VP64	4.8	18.5
	Human U-2OS	ZC3H10	VP64	1.3	18.5
(21)	HEK293T	IL1RN	VP64	up to 17,183	vary
		KLK3	VP16		
		CEACAM5	p65		
		ERBB2	p65		
(16)	Human Flp-In-T-REx-HEK293 primary human BJ-fibroblasts	VEGFA	VP64	> 250	vary
		NTF3	p65		
		mir302/367 cluster			

n.a. Not Applicable, n.d. Not Determined

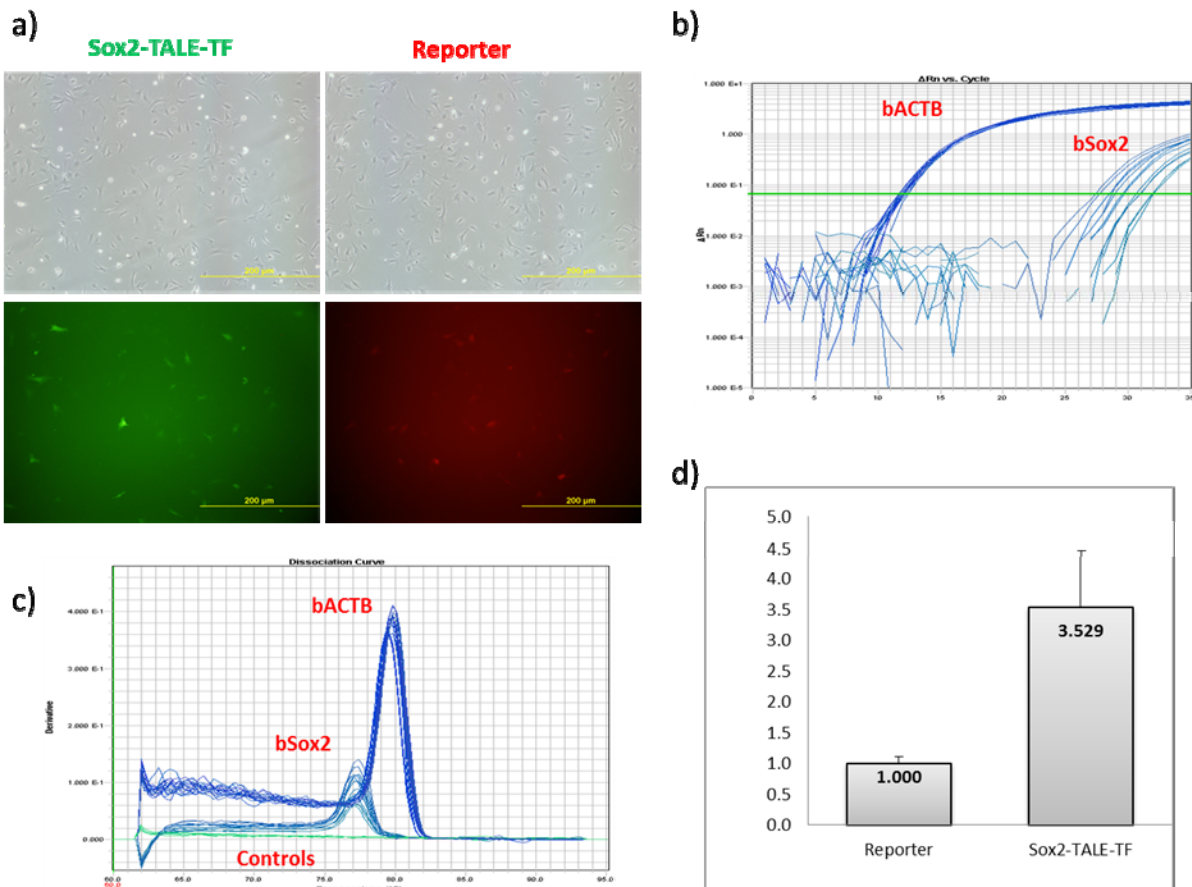
امکانات الکتروفورز کاپیلاری در The Gandal Charitable Center
 انستیتو تحقیقات پزشکی دانشگاه موناخ استرالیا استفاده شد.
 هم‌ردیفی توالی به دست آمده از منطقه پروموتوری ژن Sox2
 گاوی با توالی منطقه مشابه ژن Sox2 انسانی (CHM1_1.0)
 (Assembly, Chr3: 87,834,007- 87,834,320) با استفاده از ابزار
 CLC Main تجزیه و تحلیل داده‌های توالی‌یابی در نرم‌افزار
 Workbench نسخه ۵/۵ صورت گرفت.

پلاسمید کد کننده Sox2-TALE-TF و ساخت گزارشگر

mCherry

باکتری‌های ای.کولای حاوی پلاسمیدهای pLenti-EF1a-
 pAAV-minCMV-mCherry و SOX2 (Plasmid# 35388)
 (Plasmid# 27970) از کمپانی AddGene (کشور آمریکا) خریداری
 شدند و استخراج پلاسمید با استفاده از کیت QIAprep Spin
 Miniprep (QIAGEN) صورت گرفت (نقشه پلاسمیدها در شکل
 ۱ نشان داده شده است). پلاسمید pLenti-EF1a-SOX2 حاوی یک
 ژن کدکننده Sox2-TALE-TF تحت کنترل پروموتور EF1a
 می‌باشد که قبلاً قابلیت آن در افزایش بیان ژن Sox2 انسانی در
 سلول‌های HEK293FT نشان داده شده است (۳۱).

منطقه پروموتوری ژن Sox2 گاوی با استفاده از جفت آغازگر
 bSox2-Promoter-R و bSox2-Promoter-F به‌وسیله واکنش
 زنجیره‌ای پلیمرز (PCR) با استفاده از کیت Platinum® Taq
 (Invitrogen) DNA Polymerase High Fidelity تکثیر شد.
 توالی تمامی آغازگرهای استفاده شده در این تحقیق در جدول ۲
 ارائه شده است. واکنش PCR در حجم نهایی ۵۰ میلی‌لیتر و شامل
 ۵۰ نانوگرم DNA ژنومی، مخلوط ۰/۲ میلی‌مولار از هر یک از
 dNTPs، سولفات منیزیم ۲ میلی‌مولار، ۰/۴ میکرومولار از هر یک
 از آغازگرها و یک واحد آنزیم در High Fidelity PCR Buffer 1X
 با شرایط دمایی واسرشت اولیه ۹۵ درجه‌سانتی‌گراد به مدت دو دقیقه، ۳۵
 چرخه تکثیر شامل ۹۴ درجه‌سانتی‌گراد ۱۵ ثانیه، ۵۵ درجه‌سانتی‌گراد
 ۳۰ ثانیه و ۶۸ درجه‌سانتی‌گراد ۳۰ ثانیه، نهایتاً یک بسط
 انتهایی به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۶۸ درجه‌سانتی‌گراد انجام
 شد. قطعه تکثیر شده در ناقل پلاسمیدی pGEM®-T Easy
 Vector System I (Promega) کلون و پلاسمید نوترکیب با
 استفاده از کیت استخراج پلاسمید QIAprep Spin Miniprep
 (QIAGEN) تخلیص و با استفاده از دو آغازگر عمومی T7
 (در مسیر رفت) و SP6 (در مسیر برگشت) در دو واکنش
 جداگانه توالی‌یابی شد. جهت توالی‌یابی از



شکل ۳- الف) عکس‌های میکروسکوپ فلورسنت از سلول‌های bAF ترانسفکت شده با گزارشگر ساخته شده به صورت تنها و یا کوترانسفکت با Sox2-TALE-TF. **ب)** منحنی تکثیر در مطالعه qRT-PCR برای دو ژن Sox2 و ACTB و **پ)** منحنی ذوب آن‌ها. **ت)** افزایش بیان نسبی ژن Sox2 در سلول‌های bAF ترانسفکت شده **Figure 3-** Florescent microscopy images for bAF cell (co-) transfected with Reporter and Sox2-TALE-TF. **b)** Amplification plot for bovine Sox2 and ACTB genes in qRT-PCR and **c)** the melting curves of PCR products. **d)** Calculated fold induction of the Sox2 gene in transfected bAF cells

NEBuffer4 در حجم نهایی ۲۰ میکرولیتر و در شرایط دمایی ۱۰ سیکل (هر سیکل شامل ۵ دقیقه هضم در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و ۵ دقیقه لیگاسیون در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد) صورت گرفت. پس از اتمام واکنش ۱۰ واحد آنزیم V Exonuclease به واکنش اضافه و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد. محصول هضم/لیگاسیون حاصل سپس با استفاده از شوک حرارتی به باکتری ای.کولای DH10beta ترانسفرم شد (تمامی مواد استفاده شده در این واکنش از کمپانی NewEngland Biolabs تهیه شده بودند). پس از استخراج پلاسمید نو ترکیب صحت توالی آن بوسیله توالی‌یابی با استفاده از آغازگر mCherry-SeqR مورد تأیید قرار گرفت.

جهت ساخت گزارشگر mCherry جایگاه مورد شناسایی Sox2-TALE-TF (TTTATTCCTGACA) با استفاده از جفت آغازگر BSSox2R و BSSox2F (ارایه شده در جدول ۲) در بین جایگاه آنزیم برشی XbaI در منطقه فرادست پروموتور minCMV کلون شد. به اختصار دایمر تولید شده به طول ۴۰ جفت باز از دو آغازگر ذکر شده پس از تولید بوسیله PCR به واکنش هضم/لیگاسیون اضافه شد. دایمر ایجاد شده در دو انتها دارای جایگاه برشی آنزیم NheI بود که مکمل جایگاه برشی آنزیم XbaI (واقع در فرادست پروموتور minCMV در پلاسمید pAAV-minCMV-mCherry) است. واکنش هضم/لیگاسیون شامل دو میکرولیتر محصول PCR حاوی دایمر آغازگرها، ۱۵۰ نانوگرم پلاسمید pAAV-minCMV-mCherry ۱۰ واحد از هر کدام از آنزیم‌های NheI و XbaI، ۱۰ واحد آنزیم T7 DNA Ligase، ۱ میلی‌مولار ATP در بافر

جدول ۲- لیست آغازگر های مورد استفاده در این مطالعه

Table 2- List of primers were used in this study

منبع Reference	شماره دستیابی Accession No.	طول محصول Product Length	توالی (5'...3') Sequence (5'...3')	آغازگر Primer
مطالعه حاضر	-	-	CCCCTAGCTTTATTCCCTGACAGC GGGGCTAGCACGGGGCTGTGACAGG	BSSox2F BSSox2R
مطالعه حاضر	AC_000158	320	TCCGAAAAGGCGTGTGGTGTGAC CTCTGCCTTGACAACCTCTG	bSox2-Promoter-F bSox2-Promoter-R
RTPrimerDB ID: 8590	NG_009080	110	TACAGCATGTCCTACTCGCAG GAGGAAGAGGTAACCACAGGG	hSox2-F hSox2-R
RTPrimerDB ID: 912	NC_000012	116	GGTCTCCTCTGACTTCAACA AGCCAAATTCGTTGTGATAC	hGAPDH-F hGAPDH-R
(8)	AC_000158	153	GTAGTTTGCTGCCTCTTTAAGAC CGCTTCCTCCTCTCTG	bSox2-F bSox2-R
(8)	AC_000182	102	GGCATCCTGACCCTCAAGTA CACACGGAGCTCGTTGTAGA	bACTB-F bACTB-R
مطالعه حاضر	-	-	GCGGTCTGGGTGCCCTCGTA	mCherrySeq-R

شد. به عنوان کنترل اندوژنوس در سلول‌های bAF و HEK293 (هر کدام سه تکرار) به ترتیب از بتا-اکتین (bACTB) و گلیسرآلدهید ۳-فسفیت دهیدروژناز (hGAPDH) استفاده شد. تمامی آغازگرهای مورد استفاده در این مطالعه در جدول ۲ لیست شده‌اند. جهت انجام qRT-PCR از Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر استفاده و با شرایط دمایی به ترتیب پس از دو دقیقه واسرشت ابتدایی تعداد ۴۰ سیکل در ۹۵ درجه سانتی گراد ۱۵ ثانیه، ۵۸ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه، ۷۲ درجه سانتی گراد ۳۰ ثانیه و نهایتاً یک سیکل ذوب در دستگاه 7900HT Fast Real-Time PCR system (Applied Biosystems) صورت گرفت. برای هر واکنش نیز سه تکرار در نظر گرفته شد. آنالیزهای آماری بوسیله نرم‌افزار SDS Version 2.4.1 بر مبنای روش $\Delta\Delta C_T$ انجام شد (۱۵).

نتایج و بحث

ژن Sox2 و توالی‌یابی منطقه پرموتری آن در گاو

در این مطالعه ژن Sox2 به علت شناخت کافی از ساختار پرموتری آن (۱۱ و ۱۳) و همچنین عدم متیله شدن منطقه پرموتری آن (۹ و ۱۲) برای ارزیابی میزان فعالیت TALE-TF ها در سلول‌های گاوی انتخاب شد. منطقه پرموتری ژن Sox2 گاوی به طول ۳۲۰ نوکلئوتید در فرادست نقطه شروع رونویسی تکثیر و توالی‌یابی شد. هم‌ردیفی این توالی با توالی پرموتری ژن Sox2 انسانی قابل دسترس در NCBI نشان‌دهنده یک مشابهت ۹۳/۴۴ درصدی بود. هدف از توالی‌یابی این منطقه حصول اطمینان از یکسان بودن جایگاه هدف Sox2-TALE-TF در پرموتری ژن Sox2 گاوی و

شرایط کشت و ترانسفکشن سلول‌ها و آنالیز بیان ژن

سلول‌های فیروبلاست بالغ گاوی (Bovine Adult Fibroblasts- bAF) و سلول‌های جنینی کلیوی انسان (Human Embryonic Kidney- HEK293) در محیط کشت حاوی Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ۵۰ میکروگرم در هر میکرولیتر Penicillin/Streptomycin (Invitrogen)، یک درصد اسیدهای آمینه غیرضروری و سرم جنینی گاو (Fetal Bovine Serum) ۱۰ درصد کشت داده شدند. یک روز قبل از انجام لیپوفکشن تعداد $10^6 \times 0.3$ سلول به ازای هر یک خانه در پلیت‌های شش خانه‌ای کشت داده شدند. جهت انجام لیپوفکشن از کیت Lipofectamine 2000 (Invitrogen) بر اساس دستورالعمل پیشنهادی شرکت سازنده استفاده گردید. مقدار DNA پلاسمیدی مورد استفاده برای pAAV- و pLenti-EF1a-SOX2 minCMV-mCherry به ترتیب ۴ و ۲ میکروگرم به ازای هر یک تکرار بود (به ازای هر چهار حالت ممکن سه تکرار در نظر گرفته شد). سلول‌ها ۱۲ ساعت پس از ترانسفکشن بوسیله میکروسکوپ فلورسنت مشاهده و عکس برداری شدند.

استخراج RNA پس از گذشت سه روز از زمان لیپوفکشن با استفاده از کیت RNeasy Mini Kit (QIAGEN) صورت گرفت. پاک‌سازی RNA استخراج شده از آلودگی DNA احتمالی با استفاده از کیت TURBO DNA-free (Ambion) بر اساس دستورالعمل شرکت سازنده صورت گرفت. نهایتاً cDNA با استفاده از کیت SuperScript First-Strand Synthesis System (Invitrogen) for RT-PCR تولید شد. در ادامه میزان تغییر بیان نسبی ژن Sox2 در هر دو گروه سلول‌های bAF و HEK293 با استفاده از آنالیز بیان ژن (qRT-PCR: quantitative Real-Time PCR) اندازه‌گیری

افزایش بیان ژن Sox2 در سلول‌های bAF و HEK293

نتایج qRT-PCR نشان داد که واکنش به درستی انجام شده بود (شکل‌های ۲ و ۳ قسمت‌های ب و پ). همچنین نشان داده شد که سلول‌های فیبروبلاست گاوی دارای یک سطح پایه‌ای از بیان ژن Sox2 هستند که البته این سطح از بیان در مطالعات قبلی نیز گزارش شده‌است (۲۰). هر چند بیان ژن Sox2 در سلول‌های فیبروبلاست در سطح mRNA به وسیله PCR قابل ردیابی است اما بیان آن در سطح پروتئین قابل ردیابی نیست (۲۰).

آنالیز آماری مقادیر C_T و همچنین اندازه‌گیری بیان نسبی ژن Sox2 به روش $\Delta\Delta C_T$ (۱۵) نشان داد که بیان این ژن در سلول‌های HEK293 که بوسیله پلاسمید کدکننده Sox2-TALE-TF ترانسفکت شده بودند نسبت به سلول‌های ترانسفکت شده با گزارشگر به میزان $2/463$ برابر بیش‌تر بود (شکل ۲-د). به همین ترتیب در مورد سلول‌های bAF ترانسفکت شده با Sox2-TALE-TF نسبت به سلول‌های ترانسفکت شده با گزارشگر میزان بیان ژن Sox2 معادل $3/529$ برابر بیش‌تر اندازه‌گیری شد (شکل ۳-د). متفاوت بودن افزایش بیان ژن در رده‌های مختلف سلولی می‌تواند ناشی از عوامل بسیاری باشد. از جمله این عوامل می‌توان به شرایط کروماتینی مخصوص هر سلول و به کارگیری مکانیسم‌های متفاوت تنظیم بیان ژن را نام برد (۳).

تعداد گزارشات مبنی بر استفاده از TALEs به عنوان یک دامین باند شونده به DNA که به سهولت نیز قابل مهندسی شدن است به سرعت در حال افزایش است. در این بین تاکنون دامین‌های متفاوتی به صورت فیوز شده به پایانه برکوسیلی TALEs، به عنوان دامین‌هایی با قدرت فعال یا خاموش کردن ژن‌ها گزارش شده‌اند (۵، ۱۶ و ۲۱). دامین استفاده شده در این مطالعه، VP64، نسبت به دیگر دامین‌های فعال‌کننده مانند VP16 و P65 از قدرت بیش‌تری برای فعال کردن ژن‌ها برخوردار است (۲۱).

افزایش بیان ژن Sox2 در سلول‌های HEK293 که با Sox2-TALE-TF ترانسفکت شده بودند (در این مطالعه به میزان $2/463$ برابر) در تأیید نتایج گزارش قبلی (افزایش بیان به میزان $5/5$ برابر در سلول‌های 293FT) می‌باشد (۳۱). متفاوت بودن میزان افزایش بیان ژن Sox2 در سلول‌های متفاوت در پاسخ به اثر یک Sox2-TALE-TF یکسان می‌تواند نشان‌دهنده نقش دیگر عوامل موثر بر بیان ژن که قبلاً به اختصار به آن‌ها اشاره شد باشد. دامنه افزایش بیان ژن در اثر فعالیت تنها یک TALE-TF با توجه به نتایج مطالعات قبلی (لیست شده در جدول ۱) بین صفر تا افزایش بیش از ۱۰۰ برابری گزارش شده‌است. البته با توجه به این که در این مطالعات از TALE-TF های با ساختار متفاوت، تعداد تکرار متفاوت و همچنین سلول‌های متفاوت استفاده شده است، نمی‌توان پیش‌بینی صحیحی در مورد

انسانی گزارش شده در (۳۱) بود و لذا با توجه به یکسانی این منطقه از پروموتور در ژن Sox2 در انسان و گاو جهت آزمایش فعالیت TALE-TF ها از همان Sox2-TALE-TF گزارش شده در این مطالعه استفاده گردید. چهارده جفت باز مورد شناسایی این TALE-TF در منطقه پروموتوری ژن Sox2 گاوی در فاصله ۶۹ الی ۵۵ نوکلئوتید قبل از نقطه شروع نسخه‌برداری واقع شده است.

سیستم گزارشگر فعالیت Sox2-TALE-TF در سلول‌های HEK293 و bAF

مشاهده سلول‌ها با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت نشان داد که حضور EGFP و mCherry در هر دوی سلول‌های bAF و HEK293 قابل تشخیص بود (شکل ۲ و ۳ قسمت الف). نتیجه مورد انتظار عدم مشاهده mCherry در سلول‌های bAF و HEK293 بود که تنها به وسیله گزارشگر ترانسفکت شده بودند اما در همه چهار گروه سلول‌ها در این مطالعه mCherry قابل مشاهده بود. وجود EGFP نشان‌دهنده بیان مناسب Sox2-TALE-TF در سلول‌ها بود.

جهت نشان دادن فعالیت TALE-TF ها تاکنون چند سیستم گزارشگر متفاوت شامل سیستم مورد استفاده در این مطالعه (۳۱) و استفاده از بیان نسبی آنزیم لوسیفراز تحت کنترل منطقه پروموتوری مشابه با پروموتور هدف (۲۱) گزارش شده است. سیستم مورد استفاده در این مطالعه بر اساس فرضیه ضعیف بودن نسبی پروموتور minCMV بنا نهاده شده است و طبق گزارش قبلی در این زمینه (۳۱) پس از این که TALE-TF مورد بررسی به جایگاه هدف خود که در فرادست پروموتور minCMV کلون شده است باند می‌شود، در اثر فعالیت دامین VP64 قدرت این پروموتور جهت بیان پروتئین فلورسنتی که تحت کنترل دارد بیشتر شده و لذا با استفاده از میکروسکوپ فلورسنت می‌توان در مورد واجد فعالیت بودن یا نبودن TALE-TF در آن رده سلولی نتیجه‌گیری کرد. به هر لحاظ یافته‌های مطالعه حاضر تأیید کننده گزارش قبلی (۳۱) مبنی بر مناسب بودن این سیستم گزارشگر جهت تشخیص فعالیت یا عدم فعالیت TALE-TF ها نمی‌تواند باشد چرا که این پروموتور به تنهایی و بدون ترکیب با TALE-TF ها نیز از قدرت مناسب برای بیان پروتئین فلورسنت تحت کنترل خود برخوردار است. پروموتور minCMV دارای طولی به اندازه ۶۱ جفت باز است و با توجه به یافته‌های مطالعه حاضر می‌توان از آن برای بیان مناسب ژن‌ها در سلول‌های bAF و HEK293 استفاده نمود. طبق اطلاعات مولفین تاکنون مطالعه‌ای مبنی بر مقایسه این پروموتور با پروموتورهای پرکاربرد دیگر گزارش نشده است.

نتیجه‌گیری کلی

این مطالعه اولین گزارش در مورد فعالیت TALE-TF ها در سلول‌های حیوانات مزرعه‌ای به صورت *in-vitro* می‌باشد. با استفاده از TALEs به عنوان یک دامین باند شونده به DNA می‌توان تغییرات کنترل شده را بر روی مناطق اختصاصی از ژنوم‌های پیچیده با سهولت بیشتری اعمال کرد. نهایتاً افزایش دانش کنترل ژنوم می‌تواند در زمینه‌های متفاوتی از کشاورزی و بیوتکنولوژی پیشرفت‌های فراوانی را به همراه داشته باشد.

میزان تأثیر احتمالی TALE-TF ها داشت و البته هنوز درک صحیحی از چگونگی تنظیم بیان ژن‌های متفاوت نیز وجود ندارد، اما نتایج مطالعاتی که اخیراً از TALE-TF ها به شکل گسترده‌تری برای کنترل بیان ژن‌ها استفاده کرده‌اند پیشنهاد کننده در نظر گرفتن چندین فاکتور به صورت همزمان جهت طراحی TALE-TF های جدید می‌باشند. با در نظر گرفتن این فاکتورها محققین توانسته‌اند بیان ژن‌ها را حتی تا میزان بیش از ۱۷ هزار برابر نیز در نتیجه استفاده از TALE-TF ها افزایش دهند (۱۶ و ۲۱).

منابع

- 1- Boch, J., H. Scholze, S. Schornack, A. Landgraf, S. Hahn, S. Kay, T. Lahaye, A. Nickstadt, and U. Bonas. 2009. Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326(5959):1509-1512.
- 2- Buganim, Y., D. A. Faddah, and R. Jaenisch. 2013. Mechanisms and models of somatic cell reprogramming. *Nature Review Genetics*, 14(6):427-439.
- 3- Bultmann, S., R. Morbitzer, C. S. Schmidt, K. Thanisch, F. Spada, J. Elsaesser, T. Lahaye, and H. Leonhardt. 2012. Targeted transcriptional activation of silent oct4 pluripotency gene by combining designer TALEs and inhibition of epigenetic modifiers. *Nucleic Acids Research*, 40(12):5368-5377.
- 4- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove, and D. F. Voytas. 2011. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. *Nucleic Acids Research*, 39(12):e82-e82.
- 5- Cong, L., R. Zhou, Y.-c. Kuo, M. Cunniff, and F. Zhang. 2012. Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional repressor domains. *Nature Communications*. 3:968.
- 6- Garg, A., J. J. Lohmueller, P. A. Silver, and T. Z. Armel. 2012. Engineering synthetic TAL effectors with orthogonal target sites. *Nucleic Acids Research*, 40(15):7584-7595.
- 7- Geißler, R., H. Scholze, S. Hahn, J. Streubel, U. Bonas, S.-E. Behrens, and J. Boch. 2011. Transcriptional activators of human genes with programmable DNA-specificity. *PLoS ONE*, 6(5):e19509.
- 8- Huang, B., T. Li, L. Alonso-Gonzalez, R. Gorre, S. Keatley, A. Green, P. Turner, P. K. Kallingappa, V. Verma, and B. Oback. 2011. A virus-free poly-promoter vector induces pluripotency in quiescent bovine cells under chemically defined conditions of dual kinase inhibition. *PLoS ONE*, 6(9):e24501.
- 9- Imamura, M., K. Miura, K. Iwabuchi, T. Ichisaka, M. Nakagawa, J. Lee, M. Kanatsu-Shinohara, T. Shinohara, and S. Yamanaka. 2006. Transcriptional repression and DNA hypermethylation of a small set of ES cell marker genes in male germline stem cells. *BMC Developmental Biology*, 6(1):34.
- 10- Joung, J. K. and J. D. Sander. 2012. TALENs: a widely applicable technology for targeted genome editing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(1):49-55.
- 11- Katoh, Y. and M. Katoh. 2005. Comparative genomics on SOX2 orthologs. *Oncology Reports*, 14(3):797.
- 12- Lan, J., S. Hua, H. Zhang, Y. Song, J. Liu, and Y. Zhang. 2010. Methylation patterns in 5' terminal regions of pluripotency-related genes in bovine in vitro fertilized and cloned embryos. *Journal of Genetics and Genomics*, 37(5):297-304.
- 13- Leis, O., A. Eguiara, E. Lopez-Arribillaga, M. Alberdi, S. Hernandez-Garcia, K. Elorriaga, A. Pandiella, R. Rezola, and A. Martin. 2012. Sox2 expression in breast tumours and activation in breast cancer stem cells. *Oncogene*, 31(11):1354-1365.
- 14- Li, Y., M. Cang, A. S. Lee, K. Zhang, and D. Liu. 2011. Reprogramming of sheep fibroblasts into pluripotency under a drug-inducible expression of mouse-derived defined factors. *PLoS ONE*, 6(1):e15947.
- 15- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen. 2001. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Nature Methods*, 25(4):402-408.
- 16- Maeder, M. L., S. J. Linder, D. Reyon, J. F. Angstman, Y. Fu, J. D. Sander, and J. K. Joung. 2013. Robust, synergistic regulation of human gene expression using TALE activators. *Nature Methods*, 10: 243-245.
- 17- Maeder, M. L., S. Thibodeau-Beganny, A. Osiak, D. A. Wright, R. M. Anthony, M. Eichinger, T. Jiang, J. E. Foley, R. J. Winfrey, and J. A. Townsend. 2008. Rapid "open-source" engineering of customized zinc-finger nucleases for highly efficient gene modification. *Molecular Cell*, 31(2):294-301.
- 18- Miller, J. C., S. Tan, G. Qiao, K. A. Barlow, J. Wang, D. F. Xia, X. Meng, D. E. Paschon, E. Leung, and S. J. Hinkley. 2010. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature Biotechnology*, 29(2):143-148.
- 19- Morbitzer, R., P. Römer, J. Boch, and T. Lahaye. 2010. Regulation of selected genome loci using de novo-

- engineered transcription activator-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(50):21617-21622.
- 20- Page, R. L., S. Ambady, W. F. Holmes, L. Vilner, D. Kole, O. Kashpur, V. Huntress, I. Vojtic, H. Whitton, and T. Dominko. 2009. Induction of stem cell gene expression in adult human fibroblasts without transgenes. *Cloning and Stem Cells*, 11(3):417-426.
- 21- Perez-Pinera, P., D. G. Ousterout, J. M. Brunger, A. M. Farin, K. A. Glass, F. Guilak, G. E. Crawford, A. J. Hartemink, and C. A. Gersbach. 2013. Synergistic and tunable human gene activation by combinations of synthetic transcription factors. *Nature Methods*, (10) 239–242.
- 22- Rebar, E. J., Y. Huang, R. Hickey, A. K. Nath, D. Meoli, S. Nath, B. Chen, L. Xu, Y. Liang, and A. C. Jamieson. 2002. Induction of angiogenesis in a mouse model using engineered transcription factors. *Nature Medicine*, 8(12):1427-1432.
- 23- Reyon, D., S. Q. Tsai, C. Khayter, J. A. Foden, J. D. Sander, and J. K. Joung. 2012. FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology*, 30(5):460-465.
- 24- Sander, J. D., L. Cade, C. Khayter, D. Reyon, R. T. Peterson, J. K. Joung, and J.-R. J. Yeh. 2011. Targeted gene disruption in somatic zebrafish cells using engineered TALENs. *Nature Biotechnology*, 29(8):697.
- 25- Sander, J. D., P. Zaback, J. K. Joung, D. F. Voytas, and D. Dobbs. 2009. An affinity-based scoring scheme for predicting DNA-binding activities of modularly assembled zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Research*, 37(2):506-515.
- 26- Sanjana, N. E., L. Cong, Y. Zhou, M. M. Cunniff, G. Feng, and F. Zhang. 2012. A transcription activator-like effector toolbox for genome engineering. *Nature Protocols*, 7(1):171-192.
- 27- Schmid-Burgk, J. L., T. Schmidt, V. Kaiser, K. Höning, and V. Hornung. 2012. A ligation-independent cloning technique for high-throughput assembly of transcription activator-like effector genes. *Nature Biotechnology*, 31(1):76-81.
- 28- Snowden, A. W., L. Zhang, F. Urnov, C. Dent, Y. Jouvenot, X. Zhong, E. J. Rebar, A. C. Jamieson, H. S. Zhang, S. Tan, C. C. Case, C. O. Pabo, A. P. Wolffe, and P. D. Gregory. 2003. Repression of Vascular Endothelial Growth Factor A in Glioblastoma Cells Using Engineered Zinc Finger Transcription Factors. *Cancer Research*, 63(24):8968-8976.
- 29- Takahashi, K. and S. Yamanaka. 2006. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, 126(4):663-676.
- 30- Tremblay, J. P., P. Chapdelaine, Z. Coulombe, and J. Rousseau. 2012. Transcription Activator-Like Effector Proteins Induce the Expression of the Frataxin Gene. *Human Gene Therapy*, 23(8):883-890.
- 31- Zhang, F., L. Cong, S. Lodato, S. Kosuri, G. M. Church, and P. Arlotta. 2011. Efficient construction of sequence-specific TAL effectors for modulating mammalian transcription. *Nature Biotechnology*, 29(2):149-153.