بررسی و مقایسه میزان مهار ژن CERB با استفاده از دو siRNA اختصاصی آن در رده سلولی HeLa

زهرا دیلمی خیابانی[۱] ، مهدی بنان[۲] ، علی محمد اصغریان[۳] ،جلال قره سوران[۴] ،غلامرضا جوادی[۵] ،کیمیا کهریزی[۶] ، حسین نجم آبادی[۷]

چکیده

پروتئین CREB یک فاکتور مهم پایین دست بسیاری از مسیرهای سیگنالی به شمار می رود. با داشتن siRNA کارآمد برای ژن CREB می توان مسیر های سیگنالی بسیاری از داروها را در سلول های مختلف بررسی نمود. در این تحقیق میزان مهار بیان ژن CREB با بکارگیری دو siRNA مختلف برای این ژن در سلول های HeLa مورد بررسی قرار گرفت. جهت بررسی میزان مهاری دو CREB siRNA، سلول های HeLa با روش Lipofection ترانسفکت شدند. استخراج RNA وسنتز cDNA صورت گرفته، بررسی اثر مهاری بیان ژن CREB با استفاده از Relative Quantitative Real time PCR انجام گرفت طبق نتایج به دست آمده یکی از siRNA ها اثر مهاری بالایی برروی بیان CREB در سلول های HeLa نشان داد، و بیان ژن CREB، ٦٤/٥درصد در این سلول ها کاهش یافت. بر اساس نتایج این تحقیق، CREB siRNA با کارایی بالا توانست اثر مهاری را در سلول های HeLa نشان دهد.

با استفاده از siRNA کارآمدی که در این تحقیق جهت مهار ژن CREB طراحی و در سلول های HeLa استفاده گردید، می توان از CREB siRNA در سلول های دیگر جهت بررسی مسیر سیگنالی نیز استفاده نمود.

کلمات کلیدی: پروتئین CREB، siRNA، سلول های HeLa.

مقدمه

پروتئین CREB (Ca2+/cAMP response element binding protein) از فاکتورهای رونویسی است که فعالیت آن در پاسخ به بسیاری از محرک های سلولی مثل cAMP ، Ca2+ ، هیپوکسی ، نور UV و فاکتورهای رشد افزایش می یابد. مطالعات اخیر در موش های ترانس ژنیک نشان داده که CREB جهت بقا سلول ها ضروری است. از طرفی بیان بیش از اندازه آن آپوپتوزیس را در سلول های T القا می کند.[۱] با توجه به موارد گفته شده پروتئین CREB ممکن در مسیرهای سیگنالی اکثر فرایند های سلولی نقش داشته باشد. به این ترتیب جهت مطالعه عملکرد CREB در انواع مسیرهای سیگنالی سلول، می توان با طراحی siRNA (*small interfering molecules*) اختصاصی و وارد کردن آن به سلول، نقش آن را در انواع مسیر های سیگنالی بررسی نمود. ملکول های siRNA که از اجزای عملکردی مسیر RNAi (*RNA interference*) می باشند، یکی از مهم ترین و موثر ترین راه های خاموش سازی ژن های سلولهای جانوری می باشدجهت خاموش

۱- دانشجوی Ph.D سلولی مولکولی، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران.
۲- استادیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۳- گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تنکابن
٤- عضو هیئت علمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
٥- دانشیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم وتحقیقات
٦- دانشیار، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی
۷- استاد، مرکز تحقیقات ژنتیک، دانشگاه علوم بهزیستی و توانبخشی

Archive of SID
www.SID.ir

سازی ژن، siRNA ها با کمپلکس های خاموش کننده القا شده باRNA یا RISC(*RNA-induced silencing complex*) همراه شده و با اتصال به RNA هدف تجزیه آن را موجب می شوند[٦-٢]. مسیر RNAi به طور طبیعی در سلول ها ی یوکاریوتی وجو د داشته و در تنظیم بیان ژن ها در مرحله پس از رونویسی دخالت می کند . استفاده از سیستم siRNA یک روش جدید و مطمئن جهت مطالعه عملکرد ژن ها در سلول های جانوری می باشد[٤]. جهت مطالعه عملکرد ژن خاص، می توان siRNA اختصاصی ژن موردنظر را به صورت شیمیایی سنتز کرده و سپس به داخل سلول هدف وارد کرد یا اینکه ژن مربوط به siRNA مورد نظر را در وکتور های بیانی وارد کرده و سپس سلول ها را با وکتور نوترکیب ترانسفکت کرد، تا رونویسی siRNA در داخل سلول های هدف صورت گیرد[٢]. در این تحقیق طراحی CREB siRNA [٨] و بررسی دقیق میزان مهاری آن در سلول های HeLa با استفاده از تکنیک Relative quantitative real time PCR انجام گرفت. در صورت مشاهده اثر مهاری CREB siRNA در این سلول ها می توان از siRNA مربوطه جهت مطالعه عملکرد CREB در مسیر های سیگنالی در انواع سلول ها مثل سلول های سوسپانسیونی K562استفاده نمود. نتایج این تحقیق می تواند در مطالعاتی که در رابطه با شناسایی مسیر عملکردی بسیاری از داروها که احتمالا با فعال کردن CREB عمل می کنند، موثر باشد.

مواد و روش کار

کشت سلول ها

در این مطالعه بنیادی-کاربردی اثر مهاری CREB-siRNA در سلول های HeLa مورد بررسی قرار گرفت. سلول های HeLa در محیط DMEM (Biosera)، همراه با FBS ده درصد (Fetal bovine serum) (Biosera) در انکوباتوربا ٥ درصد CO2 و ٩٥ درصد رطوبت و دمای ٣٧ درجه سانتیگراد کشت داده شدند تا سلول ها به تعداد ١٠٦ در هر میلی لیتر رسیدند. یکی از راه های طراحی siRNA، استفاده از نرم افزار های موجود در اینترنت مثل نرم افزار های شرکت MWG می باشد. جهت مهار بیان ژن CREB دو نوع مختلف siRNA برای مکان های مختلف ژن CREB طراحی گردید[٨ و ٧]

	توالی CREB siRNA
First siRNA	5' AGCCAGUCCAUUUUCCACCtt 3'
Second siRNA	5' GGUGGAAAAUGGACUGGCUtt-3

هردو نوع توالی siRNA ژن CREB ، با استفاده روش Lipofection به داخل سلول های HeLa ترانسفکت شدند. جهت مطالعات siRNA علاوه بر siRNA هدف نیاز به siRNA منفی (Negative siRNA) نیز می باشد که این siRNA با هیچ mRNA رابطه مکملی نداشته و بنابراین برروی بیان هیچ ژنی را تاثیر نمی گذارد. برای هر نمونه کمپلکس لیپوفکتامین به شرح ذیل آماده گردید: مقدار ١٠٠ پیکو مولار از siRNA در ١٠٠ میکرولیتر DMEM بدون سرم رقیق شده و به آرامی چند بار mix می شود مقدار ٢ میکرولیتر از لیپوفکتامین (Lipofectamine TM 2000- Invitrogene) در ١٠٠ میکرولیتر محیط کشت DMEM بدون سرم مخلوط شده و ٥ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس ترکیب siRNA و لیپوفکتامین رقیق شده با یکدیگر مخلوط شده و٢٠ دقیقه در دمای آزمایشگاه قرار داده شد، تا کمپلکس Lipofectamin-DNA ایجاد شود. کمپلکس تشکیل شده به آرامی به محیط سلول ها اضافه شده و پلیت چند بار به آرامی تکان داده می شود تا کمپلکس در سطح پلیت کاملا پخش گردد. پلیت در انکوباتور با شرایط CO2 ٥ درصد ، رطوبت ٩٥ درصد ودمای ٣٧oC به مدت ٤٨ ساعت قرار داده شدند[٦]. جهت کنترل کارایی ترانسفکشن، در کنار

Archive of SID

www.SID.ir

سلول های ترانسفکت شده با CREB siRNA ، در چاهک های جداگانه با همان شرایط ترانسفکشن پلاسمید pSV-β-Galactosidase نیز به داخل سلول ها ترانسفکت شدند. در صورت وارد شدن پلاسمید به سلول ها، بیان β- گالاکتوزیداز صورت می گیرد که با رنگ آمیزی سلول ها به رنگ آبی نمایان می شوند.

رنگ آمیزی سلول های ترانسفکت شده با pSV-β-Galactosidase

رنگ آمیزی سلول های ترانسفکت شده با pSV- β-Gal با استفاده از کیت β-Gal staining set (Roche) انجام گرفت. این کیت متشکل از Iron buffer و X-Gal می باشد که با ترکیب این دو محلول با نسبت مشخص می توان بیان ژن lacZ باکتریایی را در هر سلول ترانسفکت شده، مطالعه نمود. به این ترتیب سلول های ترانسفکت شده و تعداد آنها با کمک میکروسکپ نوری به راحتی قابل تشخیص می باشند. جهت تهیه فیکساتیو (Fixative) مقدار ۵۴۰ میکرولیتر فرمالدهید ۳۷ درصد در ۹/۳۸ میلی لیتر PBS اضافه شده و در بن ماری دمای ۳۷درجه سانتیگراد گرم می شود. جهت تهیه محلول رنگ آمیزی(Staining) ، ۱ واحد از X-Gal در ۱۹ واحدIron buffer رقیق شده و به مدت ۱۰ دقیقه کاملا میکس گردید. جهت رنگ آمیزی ،ابتدا محیط از سطح سلول ها حذف شده و سلول ها یک بار بااستفاده از ۲-۱ میلی لیتر PBS شسته می شوند. سپس PBS را حذف کرده و ۲-۱ میلی لیتر فیکساتیو به سلول ها اضافه می شود و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵-۱۵ درجه سانتیگراد انکوبه می گردد. مقدار ۱ میلی لیتر محلول رنگ آمیزی به سلول ها اضافه کرده و به مدت ۳- ۵/. ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد انکوبه گردید تا سلول ها رنگ شوند.

استخراج RNA و سنتز cDNA

استخراج RNA ازسلول های ترانسفکت شده با siRNA های CREB و Negative با روش RNX انجام گردید. رسوب سلول ها در ۱ میلی لیتر از محلول RNX-Plus (CinnaGen) اضافه شد و مدت ۱۰-۵ دقیقه در دمای اتاق قرار داده شدند. سپس به هر نمونه مقدار ۲۰۰ میکرولیتر کلرفرم افزوده شد و بعد از ۵ دقیقه د دورrpm ۱۳۰۰۰به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. فاز رویی به آرامی برداشته شد و هم حجم آن ایزوپروپانول (Merck) اضافه و کاملا مخلوط گردید و سپس در دورrpm ۱۳۰۰۰ سانتریفوژ شدند. در انتها رسوب حاصل در ۵۰ میکرولیتر آب مقطر دیونیزه اتوکلاو شده حل گردید. جهت تعیین مقدار و کیفیت استخراج RNA علاوه بر اندازه گیری جذب نوری توسط فتومتر (Eppendorf)، در ژل الکتروفورز با آگارز ۱ درصد نیز بررسی شد. یک میکروگرم از RNA استخراج شده جهت سنتز cDNA با استفاده از کیت RT-PCR (Bioneer) به کار رفت.

۲-۶- بررسی اثر مهاری siRNA

به منظور بررسی میزان مهار ژن CREB از کیت QuantiFast SYBR Green (Qiagene) و دستگاه Real-time PCR (ABI-7500) استفاده گردید. واکنش ها از نوع Relative quantification انجام گردید که در آن بیان ژن هدف در مقایسه با بیان یک ژن خانه دار(House keeping) GAPDH (Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) به عنوان کنترل داخلی مقایسه گردید.

سپس از فرمول ذیل جهت محاسبه بیان ژن استفاده گردید[۱۰ و۹]:

$$\frac{\text{Sample 1}}{\text{Sample 2}} = \frac{2^{CT_{B1}-CT_{B2}}}{2^{CT_{A1}-CT_{A2}}} = 2^{(CT_{B1}-CT_{B2})-(CT_{A1}-CT_{A2})} = 2^{\Delta\Delta CT}$$

در آزمایشات این تحقیق فرمول فوق به این صورت خواهد بود:

$2\Delta\Delta CT = 2(\Delta CREB - \Delta GAPDH)$

Archive of SID
www.SID.ir

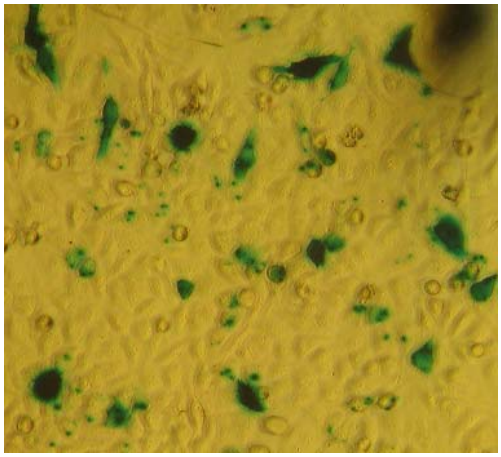
تـوالی پرایمـری ژن GAPDH و CREB کـه از سـایت اینترنتی Primer Bank طراحی شد، به صورت زیر است:

GAPDH_ Forward primer	5'-GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACA-3'
GAPDH_ Reverse primer	5'-GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT-3'
CREB _ Forward primer	5'-CACCTGCCATCACCACTGTAA-3'
CREB _ Reverse primer	5'-GCTGCATTGGTCATGGTTAATGT-3'

دما و شرایط انجام Real-time PCR به صورت زیر بـود: گرمادهی اولیه ۹۵ درجه سانیگراد به مدت ۵ دقیقـه کـه طـی این مرحلـه Hot start Taq polymerase فعـال مـی شود. در هر چرخه، دمای ۹۵ درجه سـانتیگراد بـه مـدت ۱۰ ثانیه، دمای ٦٠ درجه سانتیگراد به مدت ۳۰ ثانیه که طـی ٤٠– ۳۵ سیکل ادامه داشت.

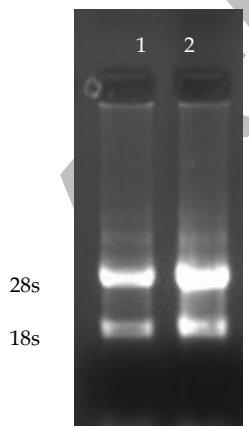
نتایج

تصویری از میزان ترانسفکشن سلول ها ی HeLa در شکل ۱ آمده است. با شـمارش سـلول هـای ترانـسفکت شـده بـا پلاسـمید pSV- β- Gal. ، میـزان کـارایی ترانسفکـشن بررسی گردید. تعداد سلول های آبـی رنـگ نمایـانگر میـزان ترانسفکشن می باشد. در رابطه با سلول هـای HeLa ٥٠–٤٠ درصد سلول ها آبی رنگ بودنـد. آزمایـشات سـه بـار تکـرار شدند و در هر سه مورد کارایی ترانسفکشن در همـین حـدود بود. در هر دو مورد، تعدادی سلول آبی کمرنگ هم مـشاهده گردید، که این حاکی از آن است ایـن سـلول هـا ترانـسفکت شده اند ودر مقایسه با سلول های پررنگ میزان بیـان ژن β – گالاکتوزیداز کم بوده است.



شکل ۱: سلول HELA ترانسفکت شده با پلاسمید PSV- B- GAL. سلول های آبی رنگ نشان دهنده ترانسفکت شدن سلول ها و بیان ژن B – گالاکتوزیداز می باشد.

مقـدار RNA هـای سـلول HeLa ترانـسفکت شـده بـا Negative siRNA و CREB siRNA بـه ترتیـب ۹۰۰ و ۱۱۰۰ میکروگرم در میلی لیتر بود. میزان جذب نوری در ۲٦۰/۲۸۰ در هر نمونه های RNA فوق ۱/۸ –۱/۹ بـود. میزان جذب نوری در OD260/280 و وجـود بانـد هـای 18s و 28s نشان می دهد که RNA های استخراج شـده از سلول ها از کیفیت مطلوبی برخوردار است(شکل۲).

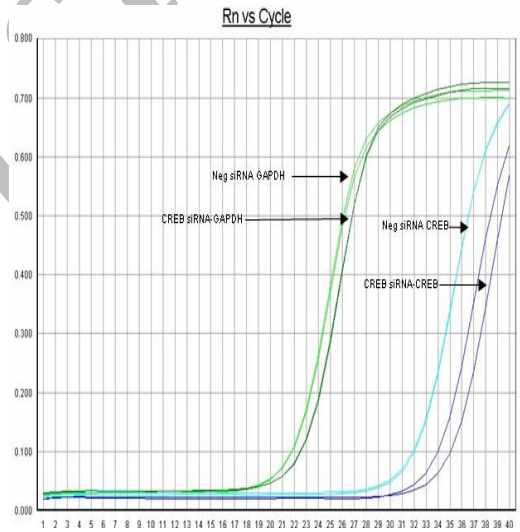


شکل ۲ : عکس ژل مربوط به RNA های استخراج شده ردیـف (۱): HELA ترانسفکت شـده بـا NEGATIVE SIRNA و ردیـف (۲): HELA ترانسفکت شده با CREB SIRNA. حضور باندهای 18S و 28S نشان دهنده سالم بودن و تجزیه نشدن RNA استخراج شده می باشد.

Archive of SID
www.SID.ir

نتایج مربوط به CREB siRNA اول، هیچ اثر بازدارندگی نشان نداده و CREB siRNA دوم اثر مهاری ٦٤/٤ درصد رادر سلول HeLa نشان داد.

شکل ٤ گراف های Real time PCR مربوط به مهار ژن های CREB با siRNA دوم استفاده شده در این تحقیق را در سلول های HeLa نشان می دهد. اندازه گیری مهار بیان CREB در کنار یک ژن آندوژنوس GAPDH به عنوان کنترل داخلی صورت گرفته است. همچنین آزمایشات به صورت دوتایی (Duplicate) انجام گردید.



شکل ۳- گراف های REAL TIME PCR مربوط مهار ژن CREB، در سلول های HELA می باشد. محور X مربوط به تعداد چرخه های PCR و محور Y مربوط به میزان افزایش فلورسانس SYBR GREEN می باشد. هرچه میزان DSDNA افزایش می یابد، اتصال SYBR GREEN و ساتع شدن فلورسانس نیز بالا می رود. ژن GAPDH به عنوان کنترل داخلی استفاده شده است. میزان مهاری ژن CREB با استفاده از فرمول ΔΔCT محاسبه گردید.

بحث

ملکول های siRNA رونویسی ژن را در مرحله پس از رونویسی مهار می کنند و به دلیل اختصاصیت و کارایی بالا جهت مهار بیان ژن و همچنین امکان انتقال آن به انواع سلول های جانوری، مورد توجه می باشند. در سال های اخیر جهت مطالعه مسیر سیگنالی NF-κB و p53 از سیستم siRNA استفاده شده است که به دنبال آن چندین ژن درگیر در این مسیرها نیزشناسایی شده اند[۱۳و۱۲].

با طراحی یک siRNA کارآمد و مطمئن برای یک ژن خاص مثل CREB، می توان نقش آن را در رابطه با بسیاری از مسیرهای سیگنالی مشخص ساخت. در این تحقیق دو siRNA جهت مهار بیان ژن CREB در سلول های HeLa ، به کار گرفته شد. با توجه به اینکه سلول های HeLa ازرده سلول های سرطانی هستند، دارای رشد سریع بوده و در تحقیقات سلولی به فراوانی از آنها استفاده می گردد. این سلول ها پس از کشت، به سطح پلیت چسبیده و ترانسفکشن آنها با ترکیبی مثل لیپو فکتامین یا CaPO4، به راحتی صورت می گیرد. به دلیل رشد سریع و قدرت ترانسفکشن بالای این سلول ها، در این تحقیق از سلول های HeLa جهت بررسی میزان مهاری دو CREB siRNA طراحی شده استفاده گردید.

با اینکه دو siRNA به کار رفته در این تحقیق بر اساس معیار های Reynolds و همکاران طراحی گردید[۸ و۷]، با این حال تنها یکی از آنها منجر به مهار بیان ژن CREB با کارایی بالا گردید. بعد از ترانسفکشن سلول ها با siRNA، کمپلکس RISC به یکی از دو انتهای ملکول siRNA، وصل شده، سپس با خاصیت هلیکازی موجب جدا شدن دو رشته سنس و آنتی سنس siRNA می گردد. پایداری کامل یا نسبی جفت بازهای انتهایی '5 دو رشته siRNA تعیین می کند که کدام یک از رشته های siRNA به عنوان آنتی سنس استفاده شده ودرخاموشی ژن دخالت داشته باشد[١٤]. در بین دو CREB siRNA که در این تحقیق استفاده گردید، siRNA با توالی

Archive of SID

www.SID.ir

(سنس) 5' UGACUUAUCUUCGAUGCA tt3' اثر مهاری از خود نشان نداد. این siRNA در هر دو انتها دارای جفت باز A=U بود. به این ترتیب امکان اتصال کمپلکس RISC به یکی از هر دو انتها ممکن است. در حالیکه در مورد CREB siRNA دوم با اثر مهاری بالا با توالی(سنس)

5' GGUGGAAAAUGGACUGGCU tt3'

، یکی از انتها ها دارای جفت باز G≡C و انتهای دیگر دارای جفت باز U=A می باشد و اتصال RISC با انتهای '5 رشته آنتی سنس صورت گرفته و این siRNA به طور کارآمد توانسته با CREB mRNA متصل شده و اثر مهاری را در بیان ژن CREB در مرحله قبل از ترجمه انجام دهد.

بر اساس نتایج حاصل از مهار siRNA در سلول های HeLa می توان از این siRNA جهت بررسی مسیر سیگنالی در سلول های مختلف که احتمالا CREB در آنها دخالت دارد، استفاده نمود.

منابع

1- Shi Y., venkataraman S L., Dodson G E., Mabb A M., LeBlanc S., Tibbetts R S. Direct regulation of CREB transcriptional activity by ATM in response to genotoxic stress. PNAS, 2004; 101: 5893-5903

2- Bantounas I, Phylactou L A, Uney J B. RNA interference and the use of small interfering RNA to study gene function in mammalian systems. Molecular Endocrinology. 2004; 33: 545-557.

3- Lee S.H., Sinko P. J.. siRNA-Getting the message out. PHASCI. 2006; Article in press.

4- Rahman M, Ali I, Husnain T, Riazuddin S. RNA interference: The story of gene silencing in plants and humans. Biothech. Advances. 2008; 26: 202-209.

5- Dorsett Y. and Tuschl T. siRNA: Application in functional genomics and potential as therapeutics. Nature. 2004; 3: 318-328.

6- Dallby B., Cates Sh., Harris A., Ohki E C., Tilkins L M., Price P J. Advanced transfection with Lipofectamine 2000 reagent: Primary neurons, siRNA, and high-throoughput applications. Methods. 2003; 33: 95-103

7- Schramm G., Ramey R. siRNA design including secondary structure target site production. MWG Biotech.

8- Reynolds A., Leake D., Boese Q., Scaringe S., Marshall W., Khvorova A. Rational siRNA design for RNA interference. Nature Biotech. 2004; Advance online publication.

9- Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25:169–193

10- Kubista, M., Andrade, J.M., Bengtsson, M., Forootan, A., Jona´k, J., Lind, K., Sindelka, R., Robert, Sjo¨back, R., and etal. The real-time polymerase chainreaction. Molecular Aspects of Medicine. 2006; xxx–xxx

11- Bustin, S.A. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. Journal of Molecular Endocrinology. 2000; 25:169–193

12- Zheng, L., Liu, J., Batalov, S., Zhou, D., Orth, A., Ding, S., Schultz, P.G.. An approach to genomewide screens of expressed small interfering RNAs in mammalian cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2004; 101: 135–140.

13- Berns, K., Hijmans, E.M., Mullenders, J., Brummelkamp, T.R., Velds, A., Heimerikx, M., Kerkhoven, R.M., Madiredjo, M., Nijkamp, W., Weigelt, B., Agami, R., Ge, W., Cavet, G., Linsley, P.S., Beijersbergen, R.L., Bernards, R., 2004. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. Nature 428, 431–437.

14- Khvorova A., Reynolds A., Jayasena S D. Functional siRNA and miRNA exhibit strand bias. Cell. 2003: 115; 209-216.

Archive of SID

www.SID.ir