مهندسی ژنتیک و ایمنی زیستی
ISSN 2588-5073 چاپی
ISSN 2588-5081 الکترونیکی
دوره ۹، شماره ۲، پاییز و زمستان ۹۹
صفحه ۲۴۷-۲۳۷

https://dorl.net/dor/20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0

DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

http://gebsj.ir/

https://ecc.isc.ac/showJournal/23064

خاموشی ژن bZIP14 با استفاده از CRISPR/Cas9 و بررسی موتانت ها در پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی در گیاه *Marchantia polymorpha*

Knocking out bzip14 gene using CRISPR/Cas9 and analyzing the mutant line in response to induced ER stress in *Marchantia polymorpha*

آزاده محسنی، محمد فارسی*، علیرضا سیفی
Azadeh Mohseni, Mohammad Farsi*, Alireza Seifi

گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهی، دانشگاه فردوسی مشهد
Department of crop biotechnology and breeding, Ferdowsi University of Mashhad

* نویسنده مسئول مکاتبات، پست الکترونیکی: farsi@um.ac.ir

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۲/۱ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۳/۷)

چکیده

انباشته شدن پروتئین‌های تانخورده و بد-تاخورده سبب تنش شبکه آندوپلاسمی می‌شود. در پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی، پاسخ به پروتئین تانخورده (UPR) توسط حس‌گرهای تراغشایی شبکه آندوپلاسمی راه‌اندازی می‌شود. این مسیر مجموعه‌ای از سیگنال‌های پیام‌رسان یکپارچه است که برای بازگرداندن پایداری شبکه آندوپلاسمی طراحی شده است. دو فاکتور رونویسی bZIP به نام‌های bZIP14 و bZIP7 مسیر UPR را در گیاه *Marchantia polymorpha* تنظیم می‌کنند. در این مطالعه لاین‌های موتانت *bzip14* با استفاده از فناوری CRISPR/Cas9 در گیاه مارکانتیا جمع‌آوری شده است. بدین منظور توالی DNA ژن bZIP14 در پایگاه اطلاعاتی Marchantia.info به کمک Blastp برای گیاه مارکانتیا شناسایی شد. بدین منظور، توالی DNAی ژن bZIP14 با انجام بلاست پروتئینی در وبگاه Marchantia.info شناسایی شد. توالی اگزون به منظور شناسایی sgRNAها در پایگاه http://crispor.tefor.net/ وارد و از میان sgRNAهای پیشنهادی، سه کاندید انتخاب شدند. sgRNAها درون سازهٔ اختصاصی CRISPR/Cas9 برای گیاه مارکانتیا به نام pMpGE013 وارد و پس از انتقال به اگروباکتری سویهٔ GWB303+pSOUP به گیاه انتقال داده شد. از گیاهان باززا شده در محیط انتخابی دارای هایگرومایسین، استخراج DNA انجام و پس از تکثیر با پرایمرهای اختصاصی، برای توالی‌یابی ارسال شد. هشت لاین از ۱۱ لاین با توالی صحیح، تغییرات نوکلئوتیدی حذف و اضافه در توالی DNA نشان دادند. یک لاین موتانت انتخاب و برای ارزیابی فنوتیپی و آزمون زنده‌مانی به محیط حاوی ترکیب تونیکامایسین، مادهٔ شیمیایی القا کنندهٔ تنش شبکه آندوپلاسمی انتقال یافت. بررسی‌ها نشان داد که bZIP14 تنها هومولوگ ژن‌های bZIP17 و bZIP28 در گیاه آرابیدوپسیس است. همچنین تحت تنش شبکه آندوپلاسمی، گیاهان موتانت در مقایسه با گیاهان وحشی تفاوت معناداری در سطح ۵ درصد نشان داده‌اند.

واژه‌های کلیدی

پروتئین تانخورده،
تنش شبکه آندوپلاسمی،
bZIP14،
CRISPR/Cas9،
Marchantia polymorpha

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

مقدمه

از آنجا که گیاهان در جای خود ثابت هستند، ضروری است که به تغییرات و تنش‌های محیطی پاسخ مناسب دهند و خود را با آنها سازگار کنند(Henriquez-Valencia *et al*,. 2018). پاسخ به پروتئین‌های تانخورده (UPR: Unfolded Protein Response)، پاسخ حفاظت شده‌ای است که گیاه را در مقابل تنش شبکه آندوپلاسمی محافظت می‌کند(Ruberti *et al*., 2018). تنش شبکه آندوپلاسمی هنگامی رخ می‌دهد که شرایط محیطی یا فیزیولوژیکی در تاخوردگی مناسب پروتئین تداخل ایجاد می‌کند و پروتئین‌های تانخورده یا با تاخوردگی نامناسب در شبکه آندوپلاسمی انباشته می‌شوند. این تغییرات از طریق سیستم کنترل کیفی شبکه آندوپلاسمی رصد و در نهایت منجر به راه اندازی UPR می‌شود. مسیر UPR سبب افزایش بیان فاکتورهایی می‌شود که در تاخوردگی پروتئین یا در تخریب پروتئین‌های ثانویه‌ای که به طور نامناسب تاخوردگی پیدا کرده‌اند، نقش دارد (Humbert *et al*., 2012). در گیاهان، فاکتورهای رونویسی اختصاصی که مرتبط با غشا هستند، نقش اصلی را در این پاسخ دارند. این فاکتورها شامل اعضای خانوادهٔ فاکتورهای رونویسی bZIP است که در آرابیدوپسیس شامل سه نوع است: bZIP60، bZIP17 و bZIP28. این سه فاکتور رونویسی در تعدیل فعالیت UPR در گیاهان نقش دارند (Kim *et al*., 2018).

در شرایطی که تنش وجود ندارد، این سه فاکتور رونویسی به غشای شبکه آندوپلاسمی متصل هستند، اما در شرایط تنش شبکه آندوپلاسمی، فاکتورهای رونویسی از طریق دو مسیر متفاوت فعال و به هسته منتقل می‌شوند تا ژن‌های پایین دست خود را فعال کنند. این دو مسیر به طور کلی به عنوان دو بازوی مسیر UPRاز شبکه آندوپلاسمی شناخته می‌شوند (Bao *et al*., 2019; Bao and Howell., 2017; Howell., 2013). بازوی اول در فعال‌سازی bZIP17 و/یا bZIP28 نقش دارد و این عمل را از طریق مکانیسم پسا-ترجمه‌ای انجام می‌دهد. bZIP17/28 فاکتور رونویسی متصل شونده به غشای نوع ۲ است که در انتهای N-ترمینال خود دمین اتصال به DNA دارد. در شرایطی که تنش وجود ندارد، ابتدا به صورت پیش-ماده ترجمه می‌شود و به واسطهٔ دمین تراغشایی، در غشای شبکه آندوپلاسمی قرار می‌گیرد (Iwata *et al*. 2017). اما در شرایط تنش، این دو فاکتور رونویسی به دستگاه گلژی انتقال داده می‌شوند. در آنجا توسط پروتئازهای موجود در دستگاه گلژی به نام پروتئاز جایگاه ۱ (S1P:Site 1 protease) و جایگاه ۲ (S2P) پردازش می‌شوند (Bao *et al*. 2019). پس از حذف دمین تراغشایی به هسته منتقل می‌شوند تا بیان ژن های پایین دست را فعال کنند.

در گیاه آرابیدوپسیس خاموشی کامل ژن *bzip17* تاثیر چندانی بر روی فنوتیپ گیاه نداشته است (Liu *et al*., 2007). با این حال در شرایط تنش شوری حساسیت بسیار کمی در گیاهان موتانت مشاهده شد و تنها ژن فعال شدهٔ *bZIP17* که دمین تراغشایی در آن حذف شده، قادر به جبران فعالیت bZIP17 در گیاه موتانت بوده است(Liu *et al*. 2008) . بازوی دیگر مسیر UPR در فعال سازی bZIP60 نقش دارد. در این مسیر، پردازش نامتوازن mRNA توسط آنزیم نیازمند به اینوزیتول ۱ (IRE1: Inositol Required Enzyme 1) در سیتوپلاسم صورت می‌گیرد. IRE1 دارای سه ایزوفرم IRE1A، IRE1B و IRE1C در آرابیدوپسیس و یک ایزوفرم در مارکانتیا است. تحت شرایط تنش شبکه آندوپلاسمی، IRE1 فعال می‌شود و فاکتور رونویسی bZIP60 را در سطح mRNA در دو جایگاه برش می‌دهد. در این برش ۲۳ نوکلئوتید حذف می‌شود. با اتصال مجدد دو جایگاه برش یافته، چارچوب خوانش کدون bZIP60 تغییر می‌کند. این تغییر سبب فعال‌سازی آن، انتقال به هسته و فعال‌سازی ژن‌های پایین دست خواهد شد(Pu *et al*., 2019; Pastor-Cantizano *et al*., 2019).

M. polymorpha گیاهی دو پایه از گونهٔ liverwort، یکی از قدیمی‌ترین ساکنان زمین است. جنس نر و مادهٔ آن به ترتیب Takaragaike-1 با نام اختصاری TAK1 و Takaragaike-2 با نام اختصاری TAK2 نامیده می‌شود. این گیاه دارای هر دو چرخهٔ هاپلوئیدی و دیپلوئیدی است، اما چرخهٔ زندگی غالب در این گیاه هاپلوئیدی است که مزایایی را نسبت به گیاهان دیپلوئیدی برای آنالیزهای ژنتیکی فراهم کرده و امکان گسترش سریع آن را با ایجاد زیست-تودهٔ ایزوژنیک برای مطالعات مولکولی و بیوشیمیایی ایجاد می‌نماید (Godinez-Vidal *et al*., 2020;

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

(Ishizaki *et al.*, 2013) *M. polymorpha* هم به وسیلهٔ اسپور که از طریق تولید مثل جنسی ایجاد می‌شود و هم از طریق جمای (gemmae) که بذر-مانند و حاصل تولید مثل غیرجنسی است، می‌تواند تکثیر شود. در مدت یک هفته، هم اسپور و هم جمای می‌توانند گیاهچه‌های کوچک با ساختار سپر مانندی ایجاد کنند که به آن تالوس (thallus) گفته می‌شود. ساختار مورفولوژیکی سادهٔ این گیاه با اندازهٔ ژنوم کوچک آن (۲۲۰ Mb) کاملا سازگار است (Sauret-Güeto *et al.* 2020). همچنین این گیاه شناخت اساس مولکولی و فیزیولوژیکی خصوصیات کلیدی را که به واسطهٔ این خصوصیات، گیاهان می‌توانند تکامل پیدا کرده و خود را با شرایط محیطی سازگار کنند، امکان‌پذیر می‌سازد (Ishizaki *et al.*, 2013). به دلیل این خصوصیات، در سال‌های اخیر مارکانتیا تبدیل به یک مدل بسیار جذاب برای مطالعات ژنتیکی شده است که می‌تواند هدایت‌گر شناسایی مسیرها و عملکرد ژن‌های ناشناخته یا کمتر شناخته شده در گیاهان عالی‌تر باشد.

در پژوهش حاضر، هدف ما بهره‌گیری از روش CRISPR/Cas9 برای بررسی اثر خاموشی ژن *bzip17/28* در پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی در گیاه *M. polymorpha* است.

مواد و روش‌ها

مواد گیاهی و شرایط رشد: جنس نر گیاه *M. polymorpha*، TAK1، از طریق انتقال جمای به محیط 1/2 Gamborg's B5 (1/2GB5) حاوی ۱ درصد آگار در شرایط استریل تکثیر شد. اتاقک‌های رشد دارای نور سفید دائمی ۵۰ تا ۶۰ mmol فوتون $m^{-2}s^{-1}$ و دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد شرایط بهینه برای رشد این گیاه است (Kubota *et al.*, 2013).

طراحی sgRNA: به منظور شناسایی توالی bZIP17/28 در گیاه مارکانتیا، ابتدا ژن‌های bZIP17 و bZIP28 از وبگاه https://www.arabidopsis.org/ برای گیاه *Arabidopsis thaliana* شناسایی شدند. سپس با مراجعه به پایگاه اطلاع‌رسانی https://marchantia.info/، با انجام بلاست پروتئینی، ژن همولوگ در مارکانتیا به نام bZIP14 شناسایی شد. برای بررسی sgRNAهای احتمالی، توالی اگزون این ژن به وبگاه http://crispor.tefor.net/ وارد شد. sgRNAهای پیشنهادی درکنار توالی آرایهٔ کریسپر

(CRISPR array:
GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTTAAAATAAGG
CTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGA
GTCGGTGCTTTT)

قرار داده شد و در وبگاه RNA Folding Form (unafold.org) از نظر ساختار ثانویه مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. بهترین sgRNAها با ساختار ثانویه مناسب، انتخاب شدند (جدول ۱).

آماده سازی سازهٔ CRISPR/Cas9: در این مطالعه از سازهٔ pMpGE013 دارای ژن‌های انتخابگر هایگرومایسین و اسپکتینومایسین برای اتصال تک-sgRNA استفاده شده است (شکل ۱). این سازه ابتدا در جایگاه برشی آنزیم *Aar*I هضم و محصول هضم به صورت مستقیم خالص‌سازی شد. sgRNAهای رفت و برگشت، دارای جایگاه اتصال به جایگاه برشی سازه در ابتدای ´۵ خود، بعد از جفت شدن، توسط آنزیم T_4 ligase وارد سازه شدند (Sugano *et al.* 2018). پلاسمیدهای حاوی سازهٔ CRISPR/Cas9 و sgRNA از باکتری E.coli، در محیط انتخابی حاوی آنتی‌بیوتیک اسپکتنومایسین استخراج و برای تأیید نهایی توسط آغازگرهای عمومی M13 به توالی‌یابی ارسال شد. پس از تایید، با استفاده از روش الکتروپوریشن به *Agrobacterium tumefaciens* سویهٔ GV3101+pSoup انتقال داده شد.

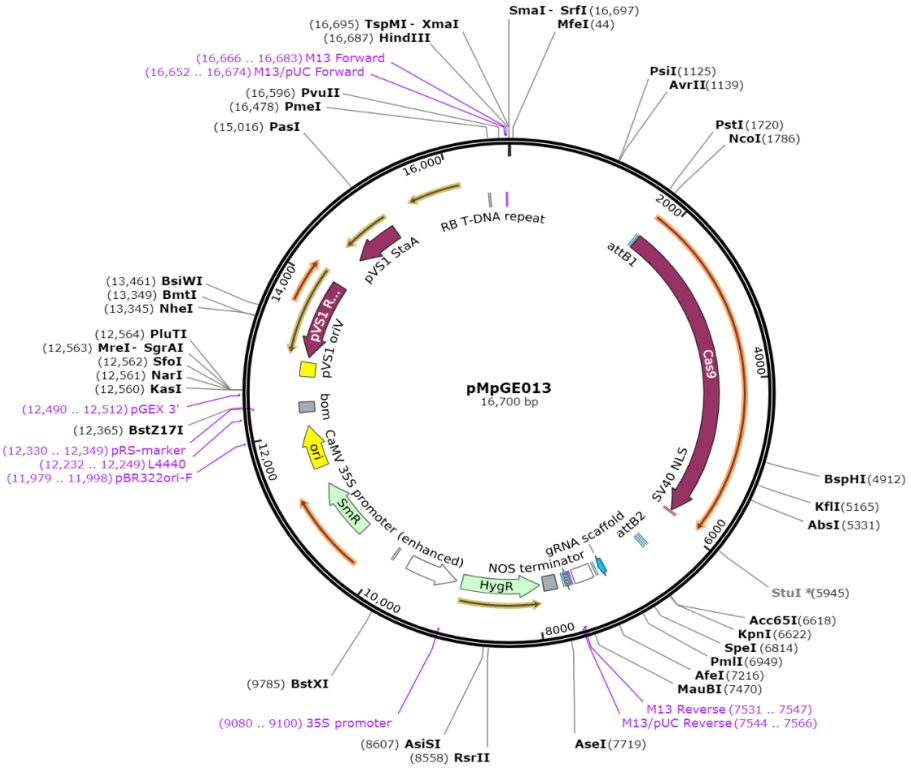
تراریختی و باززایی: جنس نر گیاه مارکانتیا، TAK1، در محیط 1/2GB5 به مدت دو هفته کشت داده شد. از روش تراریختی تالوس برای تلقیح گیاهان استفاده شد (Kubota *et al.*, 2013). در این روش گیاهان بالغ در نواحی اپیکال برش داده شدند و به محیط 1/2GB5 انتقال داده شده و سپس در اتاقک کشت قرار داده شدند. همزمان، یک کلونی از کلونی‌های اگروباکتری رشد یافته در محیط کشت جامد انتخاب ودر کشت مایع تلقیح شد. پس از دو شب، ۱ mL از اگروباکتری رشد یافته، به ۵ mL محیط مخصوص به نام 0M51C انتقال داده شده و به مدت ۶ ساعت در دمای ۲۸ درجه با دور rpm۱۲۸ قرار داده شد تا رشد کند.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

جدول ۱–توالی نوکلئوتیدی sgRNA برای ایجاد لاین موتانت (ناحیه خط کشی در توالی، زائده اتصالی به سازهٔ مقصد).

Table 1. List of sgRNAs for making mutant line

sgRNA	توالی نوکلئوتیدی	درصد GC	دمای ذوب C °
sg1RNA رفت	5´CTCGCTCTGCATTACCATGCTGTT 3´	٤٥	٦٣
sg1RNA برگشت	5´AAACAACAGCATGGTAATGCAGAG 3´	٤٥	٦٣
sg2RNA رفت	5´CTCGACTTGAGGAACATGACCCCC 3´	٥٥	٦٧
sg2RNA برگشت	5´AAACGGGGGTCATGTTCCTCAAGT 3´	٥٥	٦٧
sg3RNA رفت	5´CTCGCATGACCCCCAGGGAACCCT 3´	٦٥	٧٢
sg3RNA برگشت	5´ AAACAGGGTTCCCTGGGGGTCATG 3´	٦٥	٧٢



شکل ۱– نقشهٔ سازهٔ CRISPR/Cas9 برای ورود تک–sgRNA. جایگاه برشی آنزیم *AarI* در نقشه نشان داده نشده است.

Figure 1. CRISPR/Cas9 vector map for single-gRNA. Recognition site of AarI is not shown in the map.

جدول ۲–توالی نوکلئوتیدی آغازگرها در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز برای **تأیید** لاین‌های موتانت

Table 2. List of primers for mutant line confirmation

آغازگر	توالی نوکلئوتیدی
آغازگر رفت	5´ ATGGAGGTGACAAACGAGCTTC 3´
آغازگر برگشت	5´ CTGTCTTTCCCCGACAACGA 3´

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

پس از ٦ ساعت، اگروباکتری همراه با گیاهان بریده شده به ارلن‌های حاوی ۵۰ mL محیط 0M51C حاوی ۱۰۰ µM استوسرینگون برای هم-کشتی انتقال داده شد. ارلن‌ها به درون اتاقک‌های رشد مارکانتیا انتقال داده شده و برای دو شب بر روی شیکر با سرعت ۱۲۸ rpm، قرار گرفتند. سپس گیاهان با آب استریل شسته شده و به محیط 1/2GB5 حاوی آنتی بیوتیک‌های هایگرومایسین و تیکارسیلین بدون هورمون منتقل شدند. بعد از بازهٔ زمانی دو الی سه هفته گیاهان باززا ظاهر شده و به طور تقریبی بعد از ٦ هفته، آمادهٔ ارزیابی از جهت تراریخته بودن شدند.

تأیید لاین‌های موتانت: استخراج DNA از گیاهان باززا شده با استفاده از روش استخراج خام (Crude extract) انجام شد (Kubota *et al*., 2013). DNA استخراج شده با استفاده از آغازگرهای اختصاصی برای ژن bZIP14 (جدول ۲) و آنزیم پلیمراز Q5، تکثیر و پس از خالص‌سازی برای توالی‌یابی ارسال شد. نتایج حاصل از توالی‌یابی در نرم افزار CLC workbench 9 با ژن مرجع مقایسه شد.

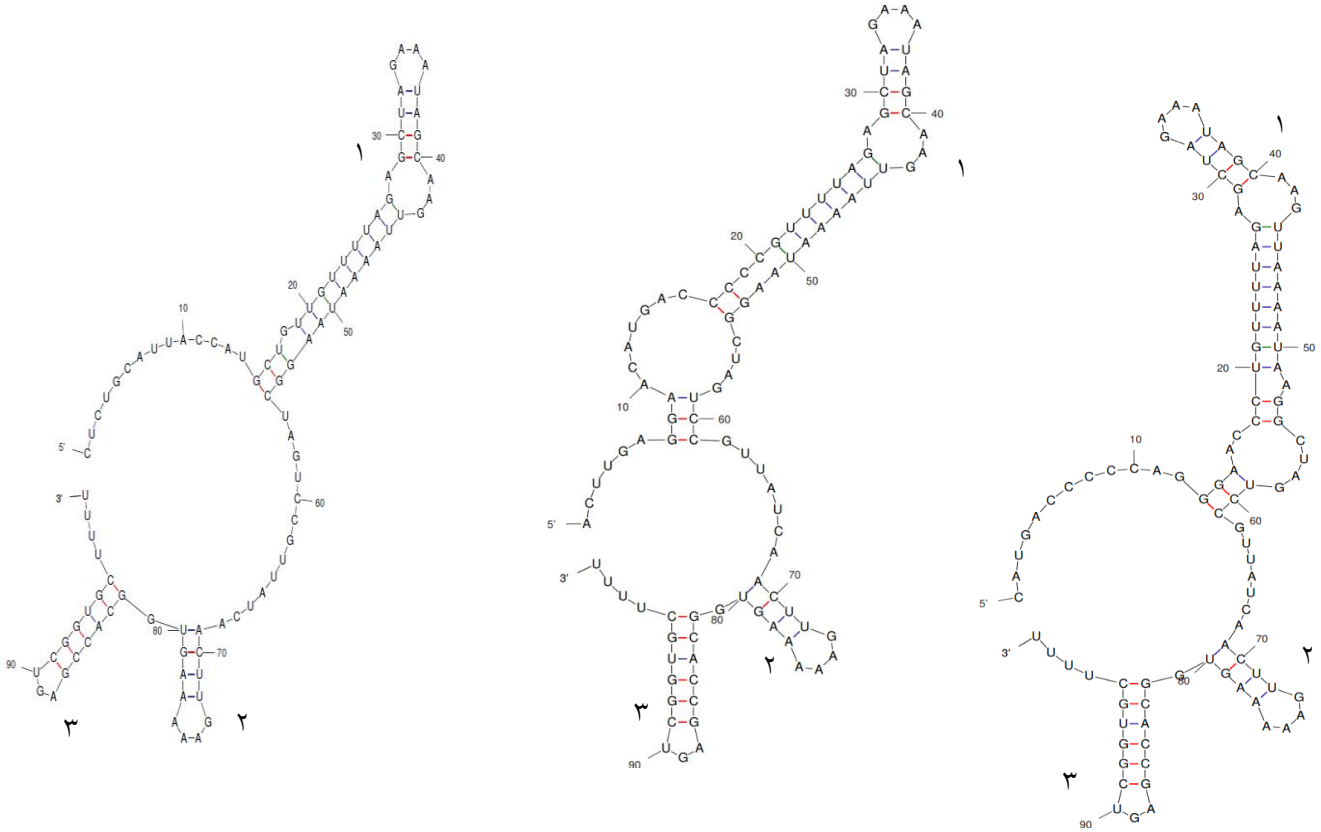
آزمون فنوتیپی: گیاهان ١٤ روزه به درون محیط 1/2GB5 کنترل و دارای ۲µg تونیکامایسین انتقال داده شدند و درون اتاقک‌های رشد با نور سفید دائم با دمای ۲۲ درجه سانتی‌گراد به مدت ۷ روز نگهداری شدند. سپس میزان زنده مانی آنها مورد بررسی قرار گرفت. سطح تالوس با نرم‌افزارImage J برای هر دو لاین موتانت و وحشی اندازه‌گیری شد. برای آنالیز آماری از نرم افزار GraphPad Prism 8 استفاده شد. داده‌ها با استفاده از آزمون t-student در دو سطح پنج و یک درصد آنالیز شدند.

نتایج و بحث

مطالعات بیوانفورماتیکی برای انتخاب sgRNAی کارآمد: با انجام بلاست پروتئینی معلوم شد که ژن‌های bZIP17 و bZIP28، فقط دارای یک ایزوفرم به نام bZIP14 در گیاه مارکانتیا هستند. این ژن دارای سه پارالوگ در گیاه مارکانتیا است که دو پارالوگ در سطح DNA در مکان‌های اینترونی و پارالوگ دیگر در سطح cDNA با ۲۹۱ نوکلئوتید کمتر، تفاوت دارند. اما با توجه به شباهت آنها در سطح پروتئین، بعید به نظر می‌رسد که در عملکرد متفاوت باشند. همچنین این تفاوت‌ها در طراحی sgRNAهای مشترک تداخلی ایجاد نمی‌کند. هرچند که وجود توالی PAM (5´NGG 3´) در انتهای ´۳ عامل ضروری برای شناسایی جایگاه برش توسط پروتئین CRISPR/Cas9 است، اما تنها وجود این سه نوکلئوتید برای عملکرد این پروتئین کافی نیست و نمی‌توان انتظار داشت که وجود این سه نوکلئوتید تضمین‌کنندهٔ برش DNA توسط پروتئین CAS9 باشد (Ma *et al*., 2015; Doench *et al*., 2014). از آنجا که توالی NGG می‌تواند در ده‌ها یا صدها جایگاه درون ژن هدف یا ژن‌های غیرهدف وجود داشته باشد، پیدا کردن sgRNAی کاملا اختصاصی برای ژن هدف و با بازدهی بالا از جمله چالش‌های موجود برای طراحی sgRNA مناسب است. همچنین می‌دانیم که فرایند ویرایش ژنومی در گیاهان نسبت به سلول‌های جانوری بسیار طولانی‌تر است. از این رو در نظر گرفتن معیارهایی که بتوان بر اساس آنها RNA هدایتگر موثر و غیرموثر را از هم تشخیص داد، بسیار حائز اهمیت است. Liang و همکارانش در سال ۲۰۱۵، sgRNAهایی را که به طور موثر در گیاهان لاین‌های کریسپر ایجاد کردند، مورد بررسی و تجزیه و تحلیل قرار دادند. بر اساس این بررسی‌ها چند اصل کلی برای طراحی sgRNA معرفی شده است. از این موارد، طول مناسب sgRNA است که بین ۱۸ تا ۲۰ نوکلئوتید بدون هیچ ترجیح نوکلئوتیدی است. از عوامل دیگر برای انتخاب sgRNAی مناسب، محتوای GC بین ۳۰ تا ۸۰ درصد است. از مهمترین عوامل، وجود چهار حلقه در ساختار ثانویهٔ sgRNA به همراه توالی آرایهٔ CRISPR است که می‌تواند ساختار کمپلکس پایداری را ایجاد کند و عملکرد آن را در موجود زنده بهبود ببخشد. (توالی آرایهٔ CRISPR متشکل از crRNA:tracrRNA، توالی ۸۰ نوکلئوتیدی است که با آرایش نوکلئوتیدی یکسان درون سازه‌های کریسپر به کار گرفته می‌شود (Mojica *et al*., 2009; Deltcheva *et al*., 2011). برای مشاهدهٔ توالی، به بخش مواد و روش‌ها، طراحی sgRNA مراجعه کنید.) از میان این چهار حلقه، وجود سه حلقه برای عملکرد مناسب sgRNA ضروری و یک حلقه اختیاری است. سه حلقهٔ ضروری با شماره‌های ۱ تا ۳ در شکل شمارهٔ ۲ نشان داده شده است (شکل ۲).

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]



شکل ۲- ساختار ثانویهٔ sgRNA در کنار توالی داربست. حلقه‌های ضروری برای افزایش کارایی CRISPR/Cas9 با شماره‌های ۱، ۲ و ۳ داخل حلقه‌ها نشان داده شده است.

Figure 2. Secondary structure of sgRNAs along with scaffold. The essential loops for efficient activity of CRISPR/Cas9 are numbered from 1 to 3 inside the loops.

جدول ۳- حذف و اضافهٔ نوکلئوتیدی ایجاد شده توسط sg3RNA. توالی sgRNA با رنگ آبی و PAM با رنگ سبز نشان داده شده است.

Figure 3. Nucleotide insertion and deletion caused by sg3RNA. sgRNA and PAM are shown in blue and green color respectively.

تعداد نوکلئوتیدهای حذف یا اضافه شده	موتاسیون bzip14 ایجاد شده با sg3RNA
لاین وحشی	5´GGAACATGACCCCCAGGGAACCCTGGGCCGA 3´
+٤	5´GGAACATGACCCCCAGGGAAcatgCCCTGGGCCGA 3´
+١	5´GGAACATGACCCCCAGGGAACtCCTGGGCCGA 3´
–١	5´GGAACATGACCCC – AGGGAACCCTGGGCCGA 3´
–٣	5´GGAACATGACCCCCAGGGAACC - - -GGCCGA 3´

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

عامل مهم دیگر تعداد جفت بازهای تشکیل شونده میان sgRNA با توالی آرایهٔ CRISPR است. همچنین جفت بازهای تشکیل شده درون ساختار خود sgRNA نیز دارای اهمیت است. در این بررسی نشان داده شده است که ۹۹ درصد sgRNAهایی که به طور کارآمد عمل کرده‌اند، جفت-بازهای تشکیل شده با توالی آرایهٔ CRISPR بیشتر از ۱۲ نبوده است و همچنین این جفت-بازها بیشتر از هفت بار پی در پی تکرار نشده‌اند. درون توالی sgRNA نیز بهتر است بیشتر از شش جفت-باز شکل نگیرد(Liang *et al*. 2016). با توجه به اصل‌های اشاره شده در بالا، اگزون‌های ژن bZIP14 به وبگاه http://crispor.tefor.net/ انتقال داده شد. از میان sgRNAهای پیشنهادی در این وبگاه، سه sgRNA با بهترین ساختار ثانویه و کمترین میزان جفت-باز به عنوان sgRNAهای کاندید انتخاب شدند (جدول ۱). لازم به ذکر است که توالی sgRNA در ساختارهای ثانویه از ابتدای ´۵ تا توالی شمارهٔ ۲۰ است (شکل ۲).

از عوامل دیگر موثر برای پیدا کردن لاین موتانت، سازهٔ مناسب است. وجود پیشبرهای سازگار با گیاه میزبان و همچنین پروتئین CRISPR/Cas9 با توالی بهینه شده برای گیاه سبب افزایش بازدهی Cas9 در گیاه میزبان می‌شود.

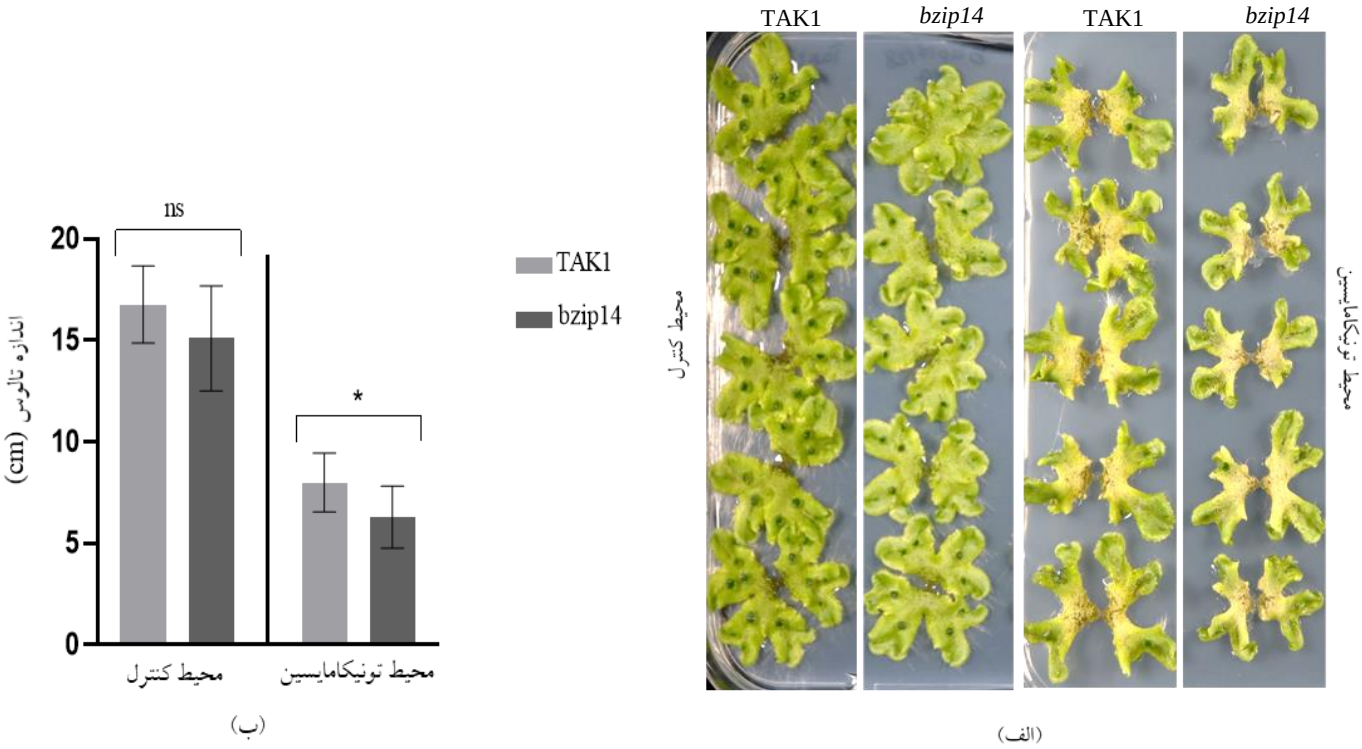
ارزیابی گیاهان تراریخت برای تایید لاین‌های موتانت: در این تحقیق ما از سازهٔ pMpGE013 که دارای پیشبر اختصاصی EF برای گیاه مارکانتیا و توالی بهینه شدهٔ پروتئین Cas9 برای گیاه آرابیدوپسیس است، بهره بردیم (Sugano et al. 2018). این سازه برای ورود sgRNA انفرادی (single gRNA) طراحی شده است. پس از انتقال سازه به درون گیاه، به طور متوسط ٦ تا ۱۵ گیاه باززا شده برای هر یک از sgRNAها با آغازگرهای مناسب در واکنش زنجیره‌ای پلیمراز تکثیر شده و پس از خالص‌سازی برای توالی‌یابی ارسال شدند. نتایج توالی‌یابی نشان داد که از میان سه sgRNA، sgRNA شمارهٔ ۳ به طور موثر عمل کرده و حذف و اضافه‌های نابجا را در توالی DNA ایجاد نموده است. برای sg3RNA، ۱۳ گیاه با پایهٔ مادری متفاوت برای توالی‌یابی ارسال شد، که ازاین میان، ۱۱ گیاه به درستی توالی‌یابی شدند. در مجموع هشت لاین تغییرات نوکلئوتیدی حذف و اضافه را در توالی DNA خود نشان دادند. از میان آنها دو لاین حذف یک نوکلئوتید، یک لاین حذف سه نوکلئوتید، یک لاین اضافه شدن یک نوکلئوتید و چهار لاین اضافه شدن چهار نوکلئوتید را نشان دادند (جدول ۳). بنابراین می‌توان اظهار داشت که درنظر گرفتن عوامل نامبرده برای افزایش کارآیی کریسپر، احتمال یافتن لاین موتانت را بسیار افزایش خواهد داد، اما با این حال نشان دهندهٔ ۱۰۰ درصد کارآیی sgRNA نخواهد بود، چرا که باید در نظر داشت عملکرد کارای sgRNA، نیازمند شکل‌گیری صحیح ساختار ثانویه در داخل سلول است که این امر همیشه محقق نمی‌شود.

آزمون فنوتیپی: از میان لاین‌های موتانت به دست آمده یک لاین برای انجام آزمایش‌های فنوتیپی انتخاب شد. گیاهان موتانت دو بار در سه تکرار به درون محیط 1/2GB5 حاوی ۲µg تونیکامایسین انتقال داده شدند تا فنوتیپ و میزان زنده‌مانی گیاه مورد بررسی قرار گیرد. تونیکامایسین یک ترکیب شیمیایی سمی است که از N -گلیکوزیلاسیون پروتئین‌ها در شبکه آندوپلاسمی ممانعت به عمل آورده و در نتیجه پروتئین‌ها به صورت بد-تاخورده یا تانخورده درون شبکه آندوپلاسمی انباشته می‌شوند(Bao and Howell. 2017). انباشته شدن پروتئین‌های تانخورده و یا بد-تاخورده درون شبکه آندوپلاسمی منجر به تنش شبکه آندوپلاسمی می‌شود. برای مبارزه با این تنش و کاهش آن، ژن‌های دخیل در مسیر تنش از جمله bZIP14 فعال می‌شوند. در بررسی‌های فنوتیپی، در محیط کنترل، گیاه موتانت *bzip14* و گیاه وحشی به خوبی رشد کرده و تفاوت قابل ملاحظه‌ای در اندازهٔ تالوس مشاهده نمی‌شود. چنانچه در داده‌های آماری نیز تفاوت بین گیاه موتانت و وحشی در محیط کنترل معنادار نشده است. اما در حضور تونیکامایسین، رشد طبیعی گیاهان موتانت *bzip14* و وحشی تحت تاثیر قرار گرفته که با توجه به ماهیت سمی تونیکامایسین دور از انتظار نبوده است. با این حال این میزان تاثیرپذیری یکسان نیست و با مقایسه میزان باززایی و اندازهٔ تالوس گیاه موتانت با گیاه وحشی می‌توان مشاهد کرد که گیاه موتانت، حساسیت بیشتری در محیط تونیکامایسین نشان داده است. این میزان حساسیت در داده‌های آماری نیز در سطح ۵ درصد معنادار شده است. با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

اظهار داشت که ژن bZIP14 در پاسخ گیاه به تنش شبکه آندوپلاسمی نقش دارد، اما از آنجا که از دست رفتن عملکرد ژن bZIP14، سبب مرگ گیاه نشده و گیاه موتانت در محیط تنش همچنان قابلیت زنده‌مانی دارد، می‌توان احتمال داد که ژن bZIP14 به تنهایی در گیاه مارکانتیا برای پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی حیاتی نیست.

در تحقیق حاضر به بررسی اثر موتاسیون ژن *bzip14* از اجزای مسیر پاسخ به پروتئین‌های تا نخورده (UPR) در گیاه *Marchantia polymorpha* پرداخته شد. مسیر UPR مجموعه‌ای از مسیرهای آبشاری پیام‌رسان حفاظت‌شده در یوکاریوت‌ها است که پایداری شبکه آندوپلاسمی را در شرایط فیزیولوژیکی طبیعی و همچنین در شرایط تنش شبکه آندوپلاسمی حفظ می‌کند. در طی تکامل، سویه‌های یوکاریوتی چندین افکتور UPR را کسب کرده‌اند که سبب افزایش انعطاف‌پذیری پاسخ‌های حفاظتی سیتوپلاسم به تنش‌های فیزیولوژیکی و محیطی شده است.



شکل ۳- زنده مانی گیاهان موتانت *bzip14* در شرایط کنترل و تنش تونیکامایسین. الف- بررسی‌های فنوتیپی در محیط تونیکامایسین. ب- مقایسهٔ اندازهٔ تالوس در گیاهان موتانت و وحشی با بکارگیری آزمون t-student. تفاوت معنادار بین گیاه موتانت و گیاه وحشی در محیط تونیکامایسین با ارزش $p \leq 5$ با * نشان داده شده است.

Figure 3. Surviving assay for *bzip14* mutant lines under control and Tunicamycin conditions. A. phenotypic assay in Tunicamycin media. B. comparing the size of mutant and wild types using t-student test. Significant difference between wild type and mutant lines is indicated with * when p value ≤ 5.

در مطالعهٔ ما ژن bZIP14 که همولوگ ژن bZIP17 و bZIP28 درگیاه آرابیدوپسیس است با استفاده از CRISPR/Cas9 موتانت شده و بعد از انتقال به محیط تونیکامایسین مورد بررسی‌های فنوتیپی قرار گرفت. در این بررسی نشان داده شد که موتانت ژن *bzip14* حساسیت بیشتری نسبت به گیاه وحشی دارد که این امر نشان‌دهنده نقش این ژن در پاسخ به تنش شبکه آندوپلاسمی

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

است. با این حال این ژن به تنهایی برای زنده‌مانی گیاه در شرایط تنش حیاتی نیست. این نتایج، با نتایج به دست آمده از گیاه آرابیدوپسیس نیز سازگار است. چرا که نشان داده شده است لاین‌های موتانت انفرادی bZIP17 یا bZIP28 تفاوت آشکاری با Col-0، لاین وحشی آرابیدوپسیس، نشان نداده‌اند. در حالیکه موتانت‌های دوتایی (Double mutant) در ژن‌های *bzip17-ire1b*، *bzip28-ire1b* و *bzip28-bzip60* در گیاه آرابیدوپسیس در یک تفاوت آشکار با لاین Col-0 به شدت به تونیکامایسین حساسیت نشان داده‌اند (Bao *et al*. 2019; Liu *et al*. 2007; Sun *et al*. 2013). اما این نتایج در تضاد با مطالعهٔ دیگری است که بر روی ژن موتانت *s2p* و *s1p* به منظور یافتن آنزیم فعال در پردازش bZIP28 صورت گرفته است. هدف از این مطالعه اثبات نقش فعال S2P و عدم نقش S1P در پردازش bZIP28 بوده است. در نتایج این مطالعه آمده است که در محیط حاوی تونیکامایسین، لاین موتانت *s2p* و نه *s1p* حساسیت بیشتری نسبت به لاین وحشی در یک تفاوت آشکار نشان داده است. از دلایل ذکر شده برای این نتیجه، وجود ژن‌های هدف دیگری به غیر از bZIP28 برای پردازش پروتئولیتیکی توسط آنزیم S2P بوده است (Iwata *et al*. 2017). لازم است اشاره شود که در شرایطی که تنش وجود ندارد مسیر UPR غیرفعال است که با توجه به هزینه‌های اضافی برای صرف انرژی درون گیاه منطقی به نظر می‌رسد. با این حال مدارکی وجود دارد که اثبات می‌کند مسیر UPR در شرایط غیر تنش نیز در سطح بسیار پایینی فعال است. به طوری که نشان داده شده است bZIP17 در گیاهچهٔ آرابیدوپسیس در شرایط غیر تنش نیز به گلژی منتقل شده و از آنجا به هسته فرستاده می‌شود (Che *et al*. 2010).

طبیعی است که در گیاه مارکانتیا به دلیل غالب بودن چرخهٔ زندگی هاپلوئیدی نیازی به صرف وقت برای رسیدن گیاه به نسل دوم نیست و می‌توان گیاه موتانت و یا تراریخت شده را در همان نسل اول مورد مطالعه قرار داد. ژن‌های هدف به آسانی از طریق واکنش زنجیره‌ای پلیمراز و در پاره‌ای از موارد از طریق آزمون‌های فنوتیپی قابل ردگیری هستند. روش به کار گرفته شده در این مطالعه قابل استفاده برای بسیاری از ژن‌ها خواهد بود، اما باید در نظر داشت خاموش کردن ژن‌های مهم با نقش اساسی در گیاه می تواند منجر به مرگ گیاه شود. بنابراین روش‌های دیگری که بر اساس سیستم نوترکیبی برای تغییر در یک جایگاه خاص ایجاد شده‌اند و همچنین قابلیت القا شدن دارند، می‌تواند برای تغییر ژن‌های هدف بدون تغییر در قابلیت زنده‌مانی گیاه سودمند باشند(Ishizaki *et al*. 2013). گیاه مارکانتیا به چند دلیل می‌تواند به عنوان گیاه مدل برای مطالعات مولکولی مورد توجه قرار گیرد. از جمله این دلایل می‌توان به جایگاه فیلوژنتیکی ویژهٔ این گیاه در تکامل گیاهان زمینی اشاره کرد. همچنین الگوی تکاملی ساده، پاسخ به فاکتورهای رشد و شرایط محیطی و چرخهٔ زندگی هاپلوئیدی از دیگر دلایلی است که می‌توان برشمرد. مهمترین ویژگی مارکانتیا که آن را به عنوان یک گیاه مدل مطلوب می‌سازد، پایین بودن اضافات ژنتیکی(genetic redundancy) است(Sauret-Güeto *et al*. 2020). برای مثال می‌توان به ژن‌های IRE1 و bZIP14 اشاره نمود که دارای یک ایزوفرم در گیاه مارکانتیا هستند، اما در گیاه آرابیدوپسیس به ترتیب دارای سه و دو ایزوفرم هستند.

منابع

Bao, Yan, Diane C. Bassham, and Stephen H. Howell. 2019. A Functional Unfolded Protein Response Is Required for Normal Vegetative Development. Plant Physiology 179(4): 1834–43.

Bao, Y. and Howell, S.H. 2017. The unfolded protein response supports plant development and defense as well as responses to abiotic stress. Frontiers in plant science, 8: 344.

Che, P., Bussell, J.D., Zhou, W., Estavillo, G.M., Pogson, B.J. and Smith, S.M. 2010. Signaling from the endoplasmic reticulum activates brassinosteroid signaling and promotes acclimation to stress in Arabidopsis. Science Signaling, 3(141): 69-ra69.

Deltcheva, E., Chylinski, K., Sharma, C.M., Gonzales, K., Chao, Y., Pirzada, Z.A., Eckert, M.R., Vogel, J.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]
[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

and Charpentier, E. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature, 471(7340): 602-607.

Doench, J.G., Hartenian, E., Graham, D.B., Tothova, Z., Hegde, M., Smith, I., Sullender, M., Ebert, B.L., Xavier, R.J. and Root, D.E. 2014. Rational design of highly active sgRNAs for CRISPR-Cas9–mediated gene inactivation. Nature biotechnology, 32(12): 1262-1267.

Godinez-Vidal, D., López-Leal, G., Covarrubias, A.A. and Reyes, J.L. 2020. Early events leading to water deficit responses in the liverwort Marchantia polymorpha. Environmental and Experimental Botany, 178: 104172.

Henriquez- Valencia, C., Moreno, A.A., Sandoval- Ibañez, O., Mitina, I., Blanco- Herrera, F., Cifuentes- Esquivel, N. and Orellana, A. 2015. bZIP17 and bZIP60 regulate the expression of BiP3 and other salt stress responsive genes in an UPR- independent manner in Arabidopsis thaliana. Journal of cellular biochemistry, 116(8): 1638-1645.

Humbert, S., Zhong, S., Deng, Y., Howell, S.H. and Rothstein, S.J. 2012. Alteration of the BZIP60/IRE1 Pathway Affects Plant Response to ER Stress in Arabidopsis Thaliana. PLoS ONE 7(6): 1–8.

Howell, S.H. 2013. Endoplasmic reticulum stress responses in plants. Annual review of plant biology, 64, pp.477-499.

Ishizaki, K., Johzuka-Hisatomi, Y., Ishida, S., Iida, S. and Kohchi, T. 2013. Homologous Recombination-Mediated Gene Targeting in the Liverwort Marchantia Polymorpha L. Scientific Reports 3: 1–6.

Iwata, Y., Ashida, M., Hasegawa, C., Tabara, K., Mishiba, K.I. and Koizumi, N. 2017. Activation of the Arabidopsis Membrane-Bound Transcription Factor BZIP28 Is Mediated by Site-2 Protease, but Not Site-1 Protease. Plant Journal 91(3): 408–15.

Kim, J.S., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. 2018. ER-Anchored Transcription Factors BZIP17 and BZIP28 Regulate Root Elongation. Plant Physiology 176(3): 2221–30.

Kubota, A., Ishizaki, K., Hosaka, M. and Kohchi, T. 2013. Efficient Agrobacterium-mediated transformation of the liverwort Marchantia polymorpha using regenerating thalli. Bioscience, biotechnology, and biochemistry, 77(1): 167-172.

Liang, G., Zhang, H., Lou, D. and Yu, D. 2016. Selection of Highly Efficient SgRNAs for CRISPR/Cas9-Based Plant Genome Editing. Scientific Reports 6: 1–8.

Liu, J.X., Srivastava, R., Che, P. and Howell, S.H. 2007. Salt stress responses in Arabidopsis utilize a signal transduction pathway related to endoplasmic reticulum stress signaling. The Plant Journal, 51(5): 897-909.

Liu, J.X., Srivastava, R. and Howell, S.H. 2008. Stress- induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in Arabidopsis. Plant, cell & environment, 31(12): 1735-1743.

Ma, X., Zhang, Q., Zhu, Q., Liu, W., Chen, Y., Qiu, R., Wang, B., Yang, Z., Li, H., Lin, Y. and Xie, Y. 2015. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. Molecular plant, 8(8): 1274-1284.

Mojica, F.J., Díez-Villaseñor, C., García-Martínez, J. and Almendros, C. 2009. Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology, 155(3): 733-740.

Pastor-Cantizano, N., Ko, D.K., Angelos, E., Pu, Y. and Brandizzi, F. 2020. Functional diversification of ER stress responses in Arabidopsis. Trends in biochemical sciences, 45(2): 123-136.

Pu, Y., Ruberti, C., Angelos, E.R. and Brandizzi, F. 2019. AtIRE1C, an Unconventional Isoform of the UPR Master Regulator AtIRE1, Is Functionally Associated with AtIRE1B in Arabidopsis Gametogenesis. Plant Direct 3(11): 1–13.

Ruberti, C., Lai, Y. and Brandizzi, F. 2018. Recovery from Temporary Endoplasmic Reticulum Stress in Plants Relies on the Tissue-Specific and Largely Independent Roles of BZIP28 and BZIP60, as Well as an Antagonizing Function of BAX-Inhibitor 1 upon the pro-Adaptive Signaling Mediated by BZIP28. Plant Journal 93(1): 155–65.

Sauret-Gueto, S., Frangedakis, E., Silvestri, L., Rebmann, M., Tomaselli, M., Markel, K., Delmans, M., West, A., Patron, N.J. and Haseloff, J. 2020. Systematic Tools for Reprogramming Plant Gene Expression in a Simple Model, Marchantia Polymorpha. BioRxiv.

Sugano, S.S., Nishihama, R., Shirakawa, M., Takagi, J., Matsuda, Y., Ishida, S., Shimada, T., Hara-Nishimura, I., Osakabe, K. and Kohchi, T. 2018. Efficient CRISPR/Cas9-Based Genome Editing and Its Application to Conditional Genetic Analysis in Marchantia Polymorpha. PLoS ONE 13(10): 1–22.

Sun, L., Lu, S.J., Zhang, S.S., Zhou, S.F., Sun, L. and Liu, J.X., 2013. The lumen-facing domain is important for the biological function and organelle-to-organelle movement of bZIP28 during ER stress in Arabidopsis. Molecular plant, 6(5): 1605-1615.

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]

Genetic Engineering and Biosafety Journal
Volume 9, Number 2
2021

Knocking out bzip14 gene using CRISPR/Cas9 and analyzing the mutant line in response to induced ER stress in *Marchantia polymorpha*

Azadeh Mohseni, Mohammad Farsi*, Alireza Seifi

Department of crop biotechnology and breeding, Ferdowsi University of Mashhad
*Corresponding author, Email: farsi@um.ac.ir

Abstract

Accumulation of unfolded and mis-folded proteins cause ER stress. In response to ER stress, the unfolded protein response (UPR) is triggered by ER transmembrane sensor. UPR, a set of integrated signaling pathways, designed to restore ER homeostasis. Two bZIP transcriptional factors regulate the UPR pathway in *Marchantia Polymorpha*: bZIP14 and bZIP7. In this study, *bzip14* mutant lines were generated using CRISPR/Cas9. In this order, the bZIP14 DNA sequence was identified by Blastp in Marchantia.info, a database website for *M. polymorpha*. Exons are implied to find out the proper sgRNAs as candidates in http://crispor.tefor.net/. Among all suggested sgRNAs, three of them were selected as candidates. sgRNAs were introduced into pMpGE013, a specific CRISPR/Cas9 vector in *M. polymorpha*. After transformation to agrobacteria GWB303+pSOUP, it was transformed into the plants. DNA was extracted from plants regenerated in selective media containing hygromycin, amplified using PCR by specific primers, and sent to sequencing. Eight out of 11 lines that were sequenced properly showed deletion and insertion in the DNA sequence. One mutant line was chosen for phenotypic assay and a survival test in the media containing tunicamycin, ER stress inducer. Our result showed that there are two isoforms of bZIP17 and bZIP28 *in Arabidopsis thaliana*, as homologs with bZIP14 in *M. polymorpha*. Also, a significant difference (p-value ≤ 0.05) was observed between *bzip14* mutant and wild type under ER stress conditions.

Key words: bZIP14, CRISPR/Cas9, ER stress, *Marchantia polymorpha*, unfolded protein response

[Downloaded from gebsj.ir on 2024-12-03]

[DOR: 20.1001.1.25885073.1399.9.2.15.0]