

Développement de vecteurs lentiviraux pour la suppression de facteurs de transcription impliqués dans la myogenèse



uOttawa

Marie-Hélène Paquet-Boulet, Yubing Liu, Dr. Alexandre Blais
Université d'Ottawa

Abstract

This study aims to reveal the specific implication of Six1, Six4 and MyoD, transcription factors, in embryonic development and regeneration of skeletal muscles. Precedent studies showed that gene silencing stops cellular proliferation. A new viral and inducible method is currently under development to resolve the cellular proliferation difficulties and promote mass cell production for experimentations. It consists in assuring the transcription of a short hairpin RNA (shRNA) directly in the cell, when in contact with the antibody doxycycline, leading to the knock-down of the target gene. To arrive at this point, the shRNA is first placed in pSM2c and cloned in E.coli Pirplus, competent cells. Then, the shRNA will be ligated to pTRIPZ, a plasmid with a lentiviral genome, which will be cloned in normal E.coli cells. The lentiviral particles will be obtained after co-transfection in human embryonic kidney cells (HEK293). These particles will be used to infect mouse muscle cells (immortal C2C12 or primary cells). By reverse-transcription, the viral genome will integrate in the host genome and remain stable allowing the analysis of the impact of the knock-down of Six1, Six4 and MyoD.

Introduction

Contexte

Afin d'étudier le rôle de diverses protéines dans le processus de différenciation des cellules musculaires, l'approche de perte de fonction par interférence à l'ARN est utilisée. Le facteur de transcription MyoD ainsi que les membres de la famille Six jouent un rôle critique durant le développement et la régénération des muscles squelettiques. Cette étude cherche à empêcher la production des protéines codant pour ces gènes dans les cellules musculaires afin d'observer leur effet respectif dans la différenciation de ces cellules.

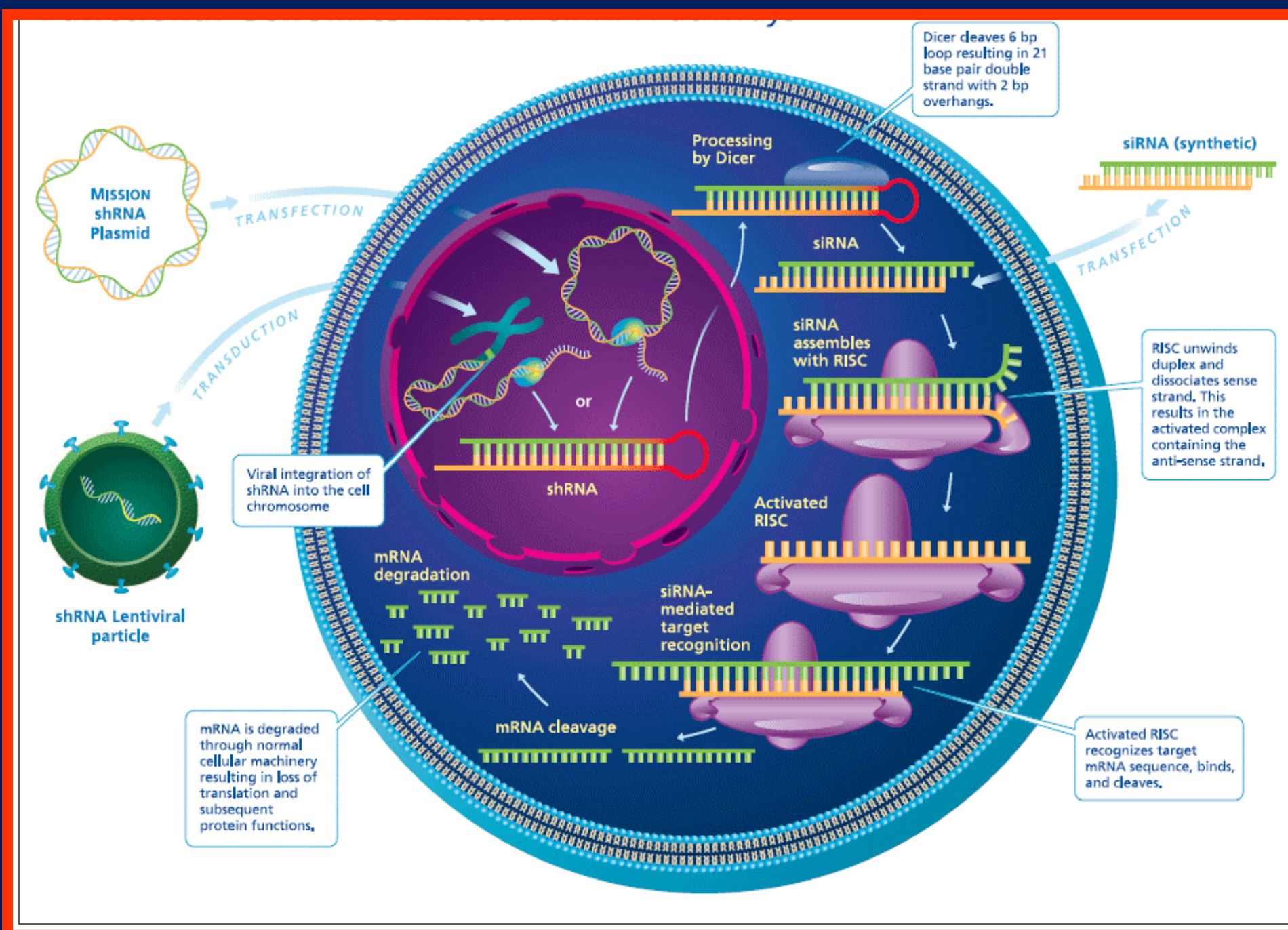
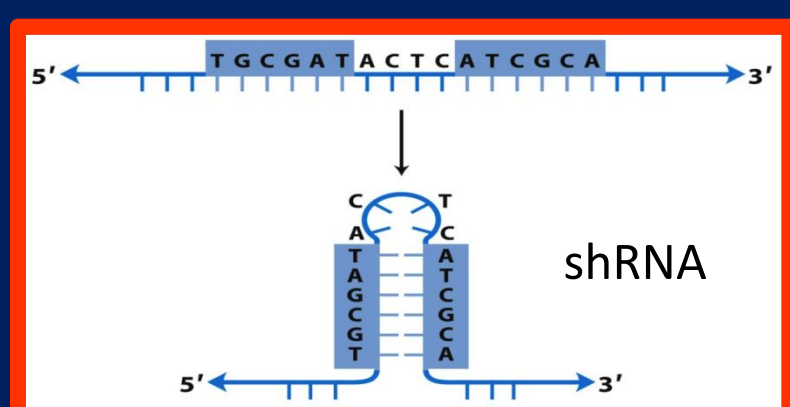


Figure 1. Transfection du génome viral dans la cellule hôte (myoblaste de souris) menant à l'expression du shRNA et à la suppression du gène d'intérêt.

Source : [Lentiviral shRNA Constructs for Gene Silencing Studies](http://www.ddmag.com/articles/2007/09/), <http://www.ddmag.com/articles/2007/09/>

Objectif

Mettre sur pied une méthode virale (le génome viral peut être intégré de façon stable dans l'ADN de l'hôte) et inducible (l'expression du gène est induite par un antibiotique) permettant d'assurer la prolifération des cellules tout en effectuant la suppression du gène ciblé. Suite à l'insertion d'un ARN en épingle à cheveux (short hairpin RNA, shRNA), la suppression du gène (« knock-down ») correspondant a bel et bien lieu mais est incomplète et restreint la prolifération des cellules requises pour certaines expériences. Ainsi, l'élaboration d'une méthode où l'expression du shRNA est inducible à l'intérieur même des cellules pourrait contourner cet obstacle et permettre l'observation des effets suivant la suppression de Six1, Six4 et MyoD.



Hypothèse

Le clonage des shRNA choisis dans pSM2c, suivi du clonage dans le vecteur lentiviral pTRIPZ mènera à l'obtention de particules lentivirales dont le génome contient le shRNA voulu. Celles-ci permettront d'infecter des cellules musculaires afin d'observer les effets respectifs de Six1, Six4 et MyoD durant la myogenèse.

Méthodologie

Des séquences putatives optimales pouvant causer la suppression des ARNm d'intérêt sont identifiées en utilisant deux algorithmes différents. Une liste de régions de l'ARNm, prédites comme représentant des cibles de choix pour la création de shRNA, est obtenue. Les trois séquences les mieux classées sont obtenues sous forme d'oligonucléotide d'ADN synthétique et les shRNA sont créés par PCR, puis clonés dans le vecteur de transit pSM2c (sites de restriction EcoRI et XhoI).

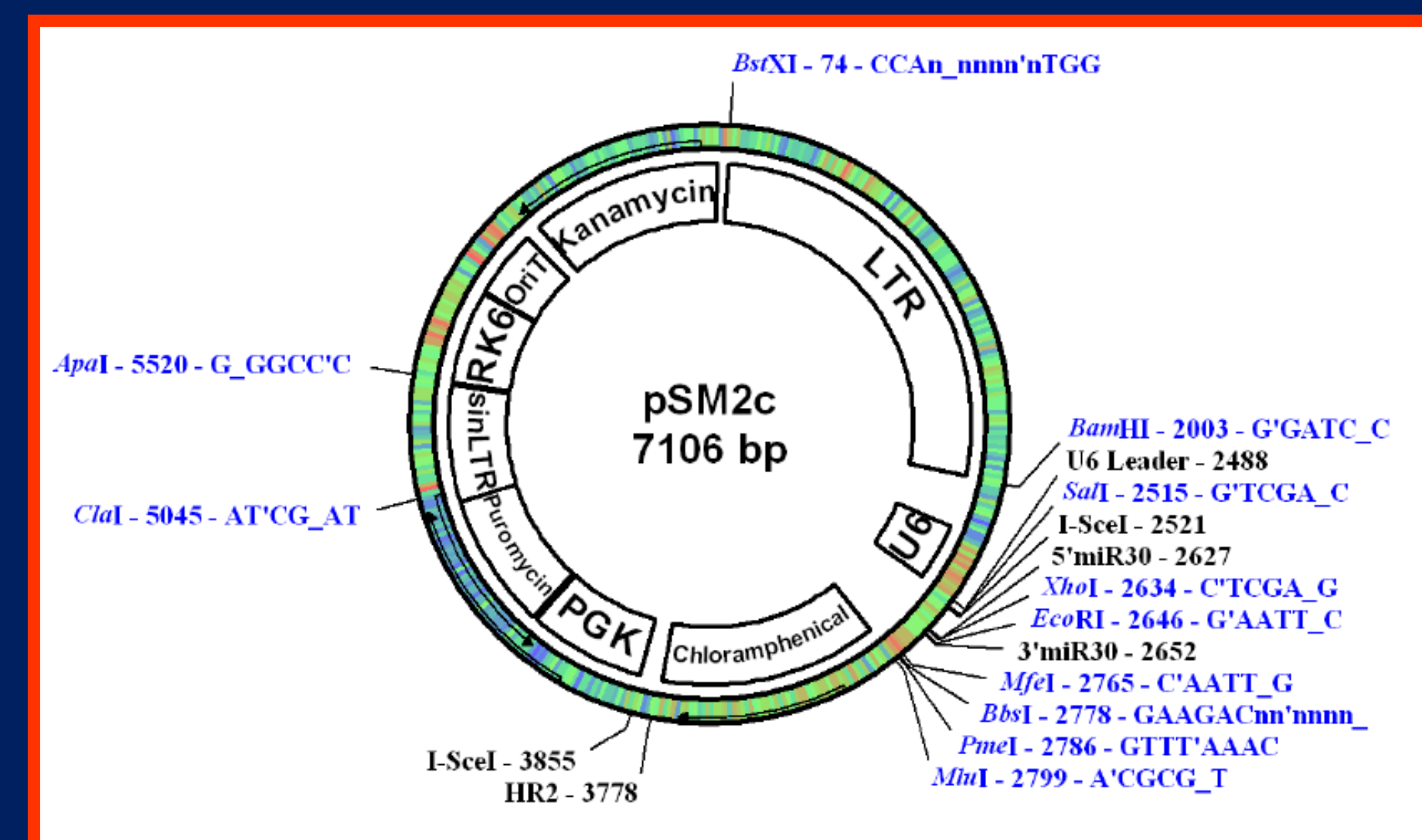


Figure 2. Carte du plasmide pSM2c identifiant les sites de restriction uniques.

Source : Open Biosystems, <http://www.pages.drexel.edu/~bio/cores/Documents/Protocols/%28Prot%205%29.pdf>

Le clonage dans le vecteur pSM2c nécessite la transformation dans les cellules E.coli, PirPlus, soit des cellules « compétentes » (i.e. habile à intégrer l'ADN extracellulaire de leur environnement). Afin de récolter uniquement les cultures bactériennes ayant internalisé le plasmide, celles-ci seront traitées avec chloramphenicol et kanamycine, deux antibiotiques pour lesquels le plasmide pSM2c confère une résistance.

Les shRNA seront ensuite excisés de pSM2c pour être clonés dans le vecteur de génome lentiviral pTRIPZ (sites de restriction MluI et XhoI) puis dans les cellules E.coli régulières. Les antibiotiques carbenicilline et zeocine sont utilisés afin de conserver uniquement les colonies bactériennes ayant internalisé le plasmide pTRIPZ.

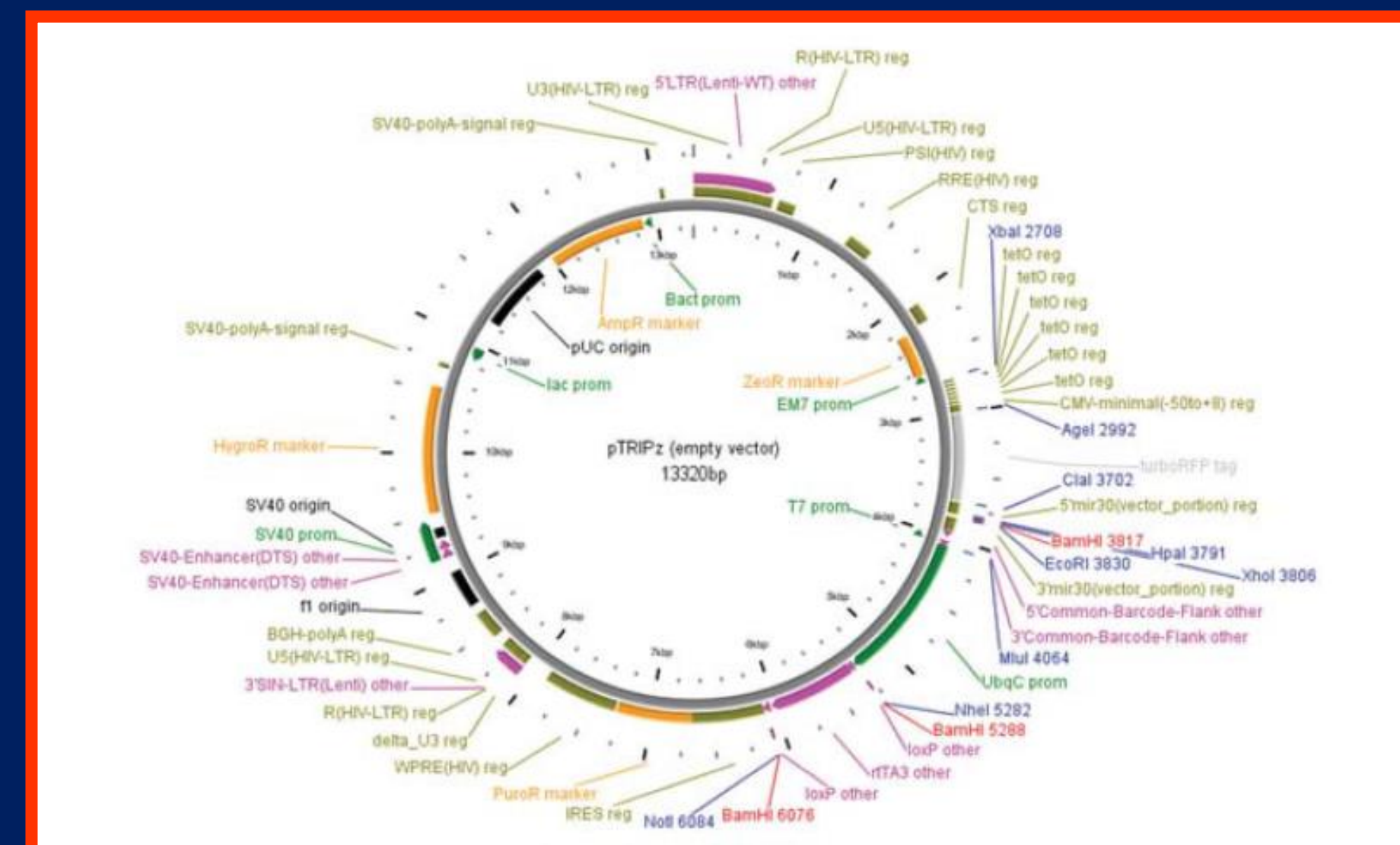


Figure 3. Carte du plasmide pTRIPZ identifiant les sites de restriction uniques.

Source : Kneubuehl, H.P., Expression Arrest **TRIPZ** Lentiviral shRNAmir, Technical manual, Thermo Scientific Open Biosystems.

Le génome viral sera empaqueté à l'intérieur de virion de même que les plasmides codant pour les autres composantes virales essentielles, par co-transfection dans les cellules HEK293. Des particules lentivirales produites sont utilisées pour infecter les cellules d'intérêt permettant ainsi d'étudier le rôle de Six1, Six4 et MyoD.

Résultats et discussion

Lors de la digestion de pSM2c avec EcoRI et XhoI, plus de 2 bandes furent obtenues et celle à 100pb demeurait inaperçue. La capacité des enzymes à digérer le plasmide fut questionnée. En comparant avec les enzymes d'une autre source, il fut clair que leur activité était encore bien présente. L'intégrité du plasmide fut donc mise en doute, mais lorsque digéré avec HindIII et XbaI, les bandes prévues étaient obtenues. Ainsi, peut-être est-ce les sites de restriction du plasmide qui ont subi une dénaturation? Ou bien le plasmide qui s'est recombiné? La ligation sera tentée en purifiant la bande dont la masse est la plus élevée. Via des digestions tests ainsi qu'un séquençage, il sera possible de savoir si le gène d'intérêt fut bel et bien inséré dans le plasmide.

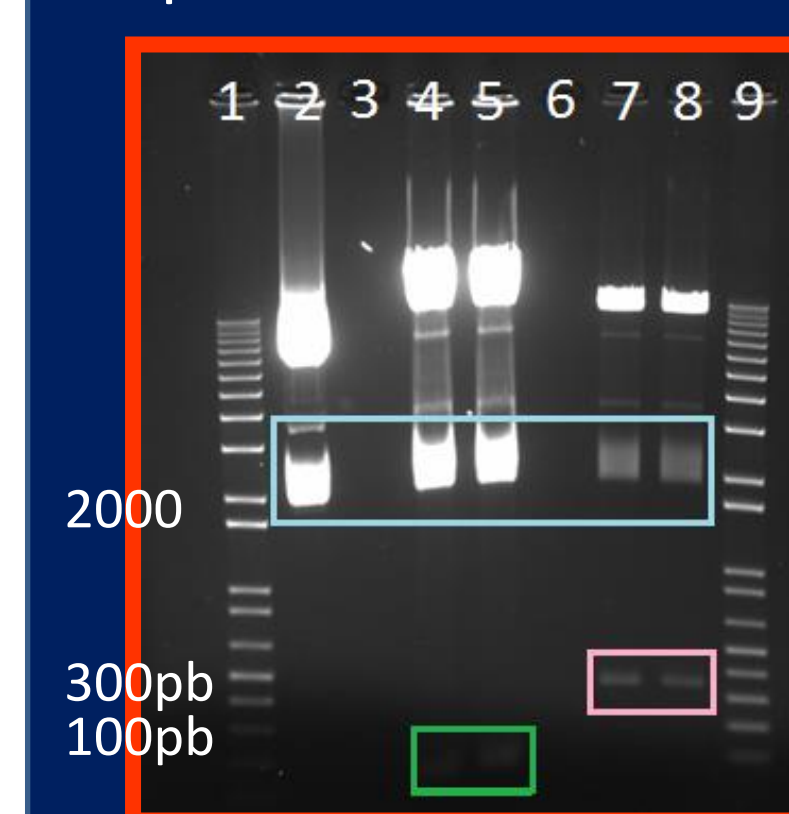


Figure 4. Résultats sur gel d'agarose 1% des digestions de pSM2c-Six1A. L'échelle 1kb plus, présente dans le puits 1 et 9, fut utilisée comme marqueur de poids moléculaire. Le puits 2 contient le plasmide non-digéré, les puits 4 et 5 digéré EcoRI-XhoI et les puits 7 et 8 digéré MluI-XhoI. Cette bande à 2000pb ne devrait pas être présente. Il serait attendu d'avoir une bande (100pb) à cet endroit. Belle bande représentant ce qui est attendu.

Puisque la digestion MluI-XhoI donne les résultats attendus, une autre techniques utilisant pGL3-basic comme vecteur de transit sera tentée. Ainsi le fragment résultant de la digestion MluI-XhoI de pSM2c sera cloné dans pGL3-basic et c'est ce dernier qui sera ensuite digéré (sites de restriction EcoRI et XhoI) afin d'internaliser le shRNA avant le transfert dans pTRIPZ. Ainsi, cela permet de contourner la digestion EcoRI-XhoI non concluante de pSM2c.

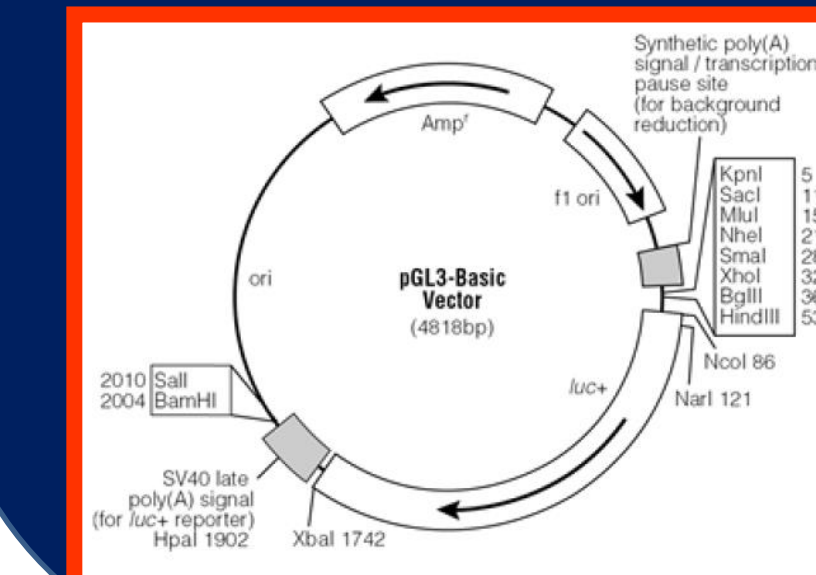


Figure 5. Carte du plasmide pGL3- basic identifiant les sites de restriction uniques.

Source : pGL3 Luciferase Reporter Vectors, Technical manuel, Promega corporation.

Expériences ultérieures

Les myoblastes de souris (lignée immortelle C2C12, ou myoblastes primaires de souris) seront infectés par les lentivirus. Le génome viral, sous forme d'ARN contenant notre shRNA d'intérêt, s'intégrera de façon stable dans le génome de l'hôte. Sous l'action de la doxycycline, l'expression du shRNA sera induite dans la cellule, ce qui mènera à la suppression de l'ARN messager du gène ciblé, permettant ainsi d'observer les rôles respectifs de Six1, Six4 et MyoD dans la myogenèse.

Conclusion

Il est actuellement impossible de confirmer ou infirmer l'hypothèse car la recherche demeure en cours. Une fois ce projet achevé, un système viral et inducible sera mis sur pied. Ainsi, il ne sera plus nécessaire de transfecter les cellules à chaque expérience. De plus, si tout se passe comme prévu, la prolifération cellulaire pourra avoir lieu avant d'induire l'expression du shRNA, ce qui permettra aux études nécessitant un plus grand nombre de cellules d'être effectuées.

Référence

Merci aux membres du laboratoire de Dr.Blais pour leur assistance et soutien tout au long du projet.

Stie web du laboratoire : <http://www.med.uottawa.ca/research/Blaislab>
Courriel : mpaqu080@uottawa.ca