مجله بیوتکنولوژی کشاورزی (دوره ۵، شماره ۳، پاییز ۱۳۹۲)

پروتئین اتصالی CTCF و تنظیمات اپیژنتیکی ژنوم

محمدرضا محمدآبادی*[۱]، محمود امیری رودبار[۲]، حمیده عادل دوست[۳]

[۱] دانشیار گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۲] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشگاه شهید باهنر کرمان
[۳] دانشجوی دکتری گروه علوم دامی دانشگاه کردستان

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۱۳، تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۳/۲٤

چکیده

پروتئین CTCF یک پروتئین متصل شونده به مولکول DNA است، که توالی آن کاملا حفاظت شده می‌باشد و در تنظیمات بیان ژنی، جدا کننده‌های کروماتین، نقشه‌گذاری ژنومی، غیر فعال سازی کروموزوم X، ساختارهای سطح بالاتر کروماتینی و پردازش متفاوت mRNA نقش ایفا می‌کند. این خصوصیات چند کاره‌ای CTCF، موجب پیشنهاد نقش حیاتی آن در رشد و نمو و بیماری‌ها شده است. پروتئین CTCF تنها پروتئین شناخته شده‌ای در مهره‌داران است که در عملکرد جدا کننده‌ها دخیل می‌باشد. مطالعات اخیر نشان دادند که، CTCF می‌تواند به عنوان یک عامل وراثتی در تنظیمات اپیژنتیکی باشد، که ارتباطات بین متیلاسیون DNA، ساختارهای سطح بالاتر کروماتینی و بیان ژن طی فرایند نمو را تنظیم می‌کند. هدف این مطالعه مروری بر نقش CTCF در این منظرهای مهم تنظیم ژنومی می‌باشد. تمام یافته‌ها نشان می‌دهند که CTCF می‌تواند به عنوان یک استاد بافنده ژنوم پستانداران در نظر گرفته شود.

واژه‌های کلیدی: *CTCF، اپیژنتیک، غیر فعال سازی کروموزوم X، جداکننده‌ها، سرطان.*

* نویسنده مسئول: محمدرضا محمدآبادی تلفن: ۰۹۱۳۳۹۸۷۵۳٤ Email:mmohammadabadi@yahoo.ca

مقدمه

ژنوم یوکاریوت‌های عالی به طور پیچیده‌ای در چندین سطوح به صورت ساختارهای متفاوت فضایی بسته بندی شده اند. در داخل هر کروموزوم، DNA به دور هیستون‌ها پیچیده شده و ساختار فیبرهای نوکلئوزومی را تشکیل می‌دهد. حلقه‌ها و تاخوردگی‌های بعدی به طور ماهرانه‌ای داخل ساختارهای سطح بالاتر قرار گرفته‌اند. اگرچه ساختار هندسی دقیق کروموزوم مشخص نشده است، ولی شواهد نشان می‌دهد که ساختار کروماتین اثر مشخصی روی چگونگی رونوشت از DNA در تنظیم فرآیندهای سلولی دارد. این ارتباط پیچیده ساختار و عملکرد، در سطح فیبرهای ۱۰ nm بهتر شناخته شده‌اند، و در این سطح است، که دسترسی فاکتورهای تنظیمی به کروماتین با استفاده از ایجاد ساختارهای فضایی اپیژنتیکی قابل توارث (مانند تغییرات هیستونی و متیلاسیون DNA)، تنظیم می شوند. این ساختارهای فضایی بطور پویایی در سرتاسر طول عمر موجود زنده در طی نمو و یا پاسخ به عوامل محیطی، ایجاد شده‌اند (Bernstein *et al.*, 2007).

همچنین شواهد نشان می‌دهند که حالت‌های فضایی قطعات ژنومی در داخل فضای سه بعدی هسته، در عملکرد ژنوم نقشی اساسی دارد. در داخل هسته هر کروموزوم قلمروی فضایی خود را دارا می‌باشد. کروماتین‌ها به صورت الگوهای فشرده و یا غیر فشرده می‌باشند که با فعالیت رونویسی ارتباط دارند (Fraser and Bickmore, 2007). در سال‌های اخیر، با استفاده از تکنیک‌های تصویر برداری پیشرفته به همراه روش‌های ملکولی جدید، وجود شبکه‌های پیچیده و وسیعی از ساختارهای تنظیمی با ارتباطات حلقه‌های درون کروموزومی با دامنه‌ی بلند[1] و بین کروموزومی[2] که در گذشته چندان جدی گرفته نمی‌شدند را آشکار نمود. این نواحی تنظیمی با دامنه‌ی بلند با بسیاری از فرآیندهای بیولوژیکی مانند بیان ژن به صورت تک آللی (Apostolou and Thanos, 2008)، غیر فعال سازی کروموزوم X (Bacher *et al.*, 2006)، تنظیم بیان ژن‌ها طی فرآیند نمو (Spilianakis *et al.*, 2005) در ارتباط هستند. امروزه زمینه تحقیقات رونویسی از حالت مطالعه رونویسی در جایگاه ژن معین در یک الگوی خطی، به مدل های سه بعدی تنظیم بیان ژنی تغییر یافته‌اند. این پیچیدگی ارتباط ژنومی در داخل پستانداران که تحت عنوان کروماتین اینتراکتوم[3] بیان می‌شود، باعث افزایش احتمال حضور فاکتورهایی شده است که به‌عنوان یک میانجی در ارتباطات داخل و بین کروماتینی نقش دارند. پروتئین اتصالی (CCCTC-binding factor (CTCF)) می‌تواند کاندیدایی برای ایفای این نقش باشد. الگوهای توزیع منحصر به فرد جایگاه‌های اتصال و مکانیسم‌های تنظیمی این پروتئین که از طریق آنالیز کل ژنوم در بین انواع مختلفی از سلول‌ها مشخص شده، نشان از نقش سراسری و بسیار

[1] Long-range intrachromosomal loops
[2] Interchromosomal
[3] Chromatin interactomes

مهم و متفاوت از فاکتورهای تنظیمی ساده دارد. شواهد نشان می‌دهند که CTCF می‌تواند به عنوان عامل توارث تنظیمات اپیژنتیکی باشد، که ارتباطات پیچیده‌ی بین متیلاسیون DNA، ساختارهای کروماتینی سطح بالاتر و تنظیمات بیان ژنی که در طی نمو ایجاد شده‌اند را تنظیم کند (Phillips and Corces, 2009). با توجه به نقش بسیار مهم این پروتئین در بسیاری از فعالیت‌های تنظیمی مانند فعال و سرکوب رونویسی (Lobanenkov et al., 1990; Vostrov and Quitschke, 1997)، جداکننده‌ها (Bell *et al.*, 1999)، نقشه گذاری (Ohlsson *et al.*, 2001)، غیر فعال سازی کروموزوم X (Chao *et al.*, 2002) و پیرایش متفاوت mRNA (Shukla *et al.*, 2011) توجه به این پروتئین تنظیمی به خصوص طی ده سال گذشته بسیار افزایش یافته است. نقش بسیار مهم این پروتئین در ایجاد ساختارهای فضایی کروماتین باعث شده که از این پروتئین به عنوان استاد بافنده‌ی ژنوم یاد شود (Phillips and Corces, 2009).

پروتئین CTCF

این پروتئین توسط ژن CTCF کد می‌شود، که دارای یازده ناحیه‌ی انگشت روی[1] (ZFs) جهت اتصال به توالی DNA هستند. پروتئین اتصالی CTCF تقریبا در تمام سلول‌های بدنی بیان می‌شود و الگوی بیانی مشابه با ژن‌های خانه‌دار دارد. توالی ژن CTCF در یوکاریوت های عالی، به خوبی حفاظت شده است به طوری که در ناحیه ۱۱ ZFs آن بین گونه های انسان، موش و جوجه (مرغ اهلی) ٪ ۱۰۰همسانی مشاهده می‌گردد. در مقایسه بین CTCF جوجه و پستانداران، در پستانداران CTCF آنها دارای پنج اینترون تکامل یافته است، که انواع مختلفی از خانواده های توالی های تکراری Alu و LINE در آنها وجود دارد. این تفاوت ها باعث تغییر در قاب خواندن باز (ORF) نمی‌شود، این نشان دهنده آن است که طی ۳۰۰ میلیون سال تکامل بعد از جدایی این دو دسته، توالی ها به خوبی حفظ شده اند (Ohlsson *et al.*, 2001). پروتئین CTCF برای اولین بار با توجه به توانایی آن در اتصال به توالی ۵۰ تا ٦۰ جفت بازی در داخل ناحیه تنظیمی نزدیک پروموتور ژن c-myc جوجه جداسازی و کلون شد (Lobanenkov *et al.*, 1990). پس از مدت کوتاهی، این پروتئین در توالی پایین دست جایگاه شروع رونویسی[2] (TSS) ژن c-myc در انسان و موش شناسایی گردید (Filippova *et al.*, 1996). در این دو مطالعه، CTCF به عنوان بازدارنده رونویسی ژن c-myc معرفی گردید. در راستای این تحقیقات، پروتئین منفی۱[3] (NeP1) شناسایی گردید، که توانایی اتصال به عنصر خاموشی در فاصله ۲/٤ کیلو باز بالاتر از ژن لیزوزیم جوجه را دارا می‌باشد. تحقیقات بعدی بر روی این پروتئین مشخص کرد که NeP1 همان CTCF است که به طور اختصاصی به عنصر F1 خاموش کننده ژن

[1] Zinc fingers

[2] Transcription start site

[3] Negative protein 1

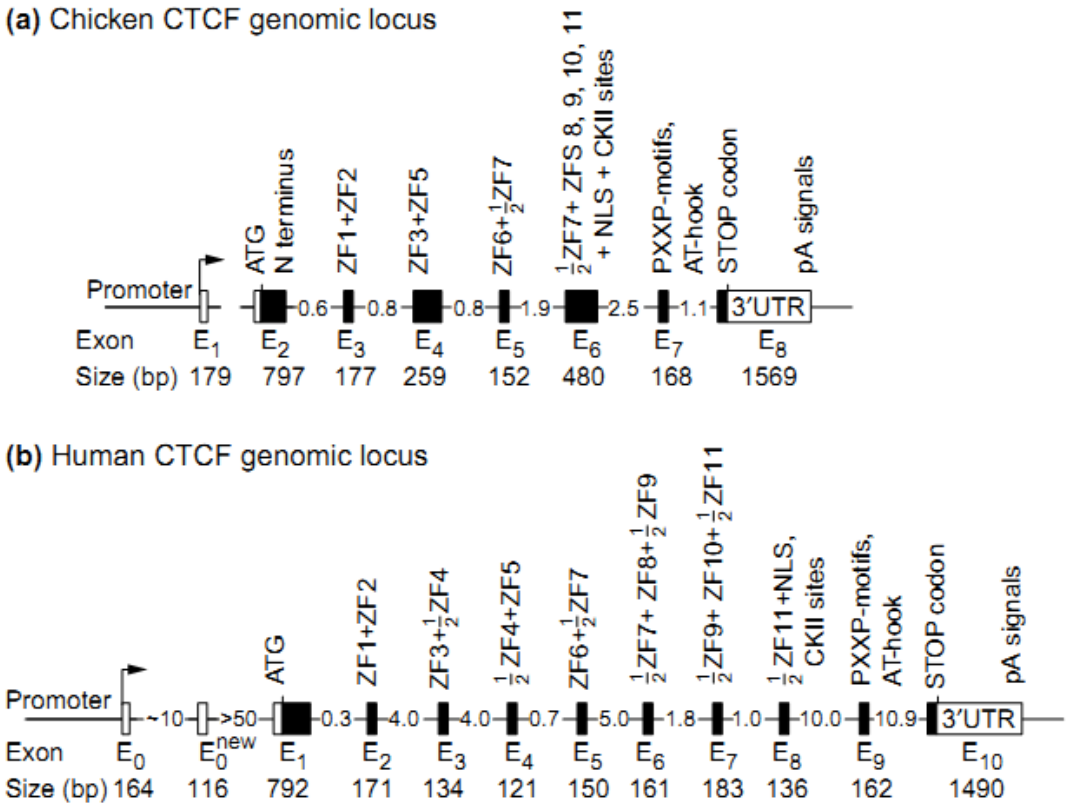
لیزوزیم جوجه متصل شده و با گیرنده هورمون تیروئید v-ERBA، در سرکوب بیان لیزوزیم اثر سینرژیستی نشان می‌دهد (Burcin *et al.*, 1997). همچنین، در مطالعات بعدی، CTCF همچنین از عصاره هسته سلول هلا (Hela) با توجه به توانایی اتصال به نواحی بالادستی TSS در β-پروتئین آمیلوئید[1] جداسازی گردید. در این تحقیقات مشخص گردید که CTCF قادر است به عنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی عمل کند (Vostrov and Quitschke, 1997). پس از آن، اولین ارتباط بین جداکننده‌ها و CTCF بر اساس کشفیات اتصال CTCF به جداکننده 5´HS4 در بالادست توالی ژن β-گلوبین جوجه مشخص گردید. در موازات با این کشفیات چهار جایگاه اتصال CTCF در ناحیه‌ی کنترلی نقشه‌گذاری[2] (ICR) بین Igf2 و H19 پستانداران شناسایی گردید (Bell *et al.*, 1999). این نتایج بر پایه آزمایشاتی که در آن اتصال CTCF به جایگاهش در ژن β-گلوبین دچار اختلال شده بود، بدست آمد. اما این اختلال تأثیری در عملکرد جداکننده مانع[3] در این ژن نداشت (Recillas-Targa *et al.*, 2002). ساختار ژن CTCF و جایگاه‌های انگشت روی‌ها در شکل ۱ نشان داده شده است.

جایگاه‌های اتصال CTCF

به دلیل اتصال به دامنه وسیعی از توالی های گوناگون که به خاطر استفاده ترکیبی از ZFs می‌باشد، از آن به عنوان فاکتور چند کاره[4] یاد می‌شود (Filippova *et al.*, 1996). جایگاه اتصال CTCF در پروموتورها، جداکننده‌ها و دیگر نواحی تنظیمی چندین ژن مشخص گردیده است، که دارای طولی حدود bp ۵۰ می باشند. با استفاده از روش ایمونوپرسیپیتاسیون کروماتینی[5] (Chip) در ژنوم انسان ۱۳۸۰٤ جایگاه اتصال CTCF در فیبروبلاستهای IMR90 انسانی مشاهده گردید. در این سلول الگوی توزیع سراسری آن به صورت ٤٦٪ اینترژنیکی، ۲۲٪ اینترونی، ۱۲٪ اگزونی، ۲۰٪ در داخل محدوده ۲/۵ کیلو بازی پروموتورها قرار داشتند (Kim *et al.*, 2007). در یک تحقیق دیگر، با استفاده از ترکیب تکنیک Chip با توالی یابی با توان عملیاتی بالا[6] (ChIP-Seq) تعداد ۲۰۲٦۲ جایگاه هدف CTCF در سلول‌های $CD4^+$ انسانی شناسایی گردید (Barski *et al.*, 2007).

با توجه به این داده‌ها، با استفاده از الگوریتم های جدید که قادر به تشخیص اتصالات با حساسیت بالا می باشند، تعداد جایگاه های اتصال به ۲٦۸۱٤ در ژنوم انسان افزایش یافت. که توزیع سراسر ژنوم آن به صورت ٤۵٪ اینترژنیکی، ۷٪ در 'UTR ۵، ۳٪ اگزونی، ۲۹٪ اینترونی، ۲٪ 'UTR ۳، ۱۳٪ در محدوده ۵ کیلو بازی TSS بود (Jothi *et al.*, 2008).

[1] Amyloid β-Protein
[2] imprinting control region
[3] Barrier
[4] Multivalent factor
[5] Chromatin immunoprecipitation
[6] High-throughput sequencing



شکل ۱- ساختار ژنی CTCF (a) جوجه (b) انسان. مربع‌های سیاه: توالی‌هایی هستند که ترجمه می‌شوند؛ مربع تو خالی: توالی‌هایی هستند که ترجمه نمی‌شوند؛ خط: توالی‌های شروع رونویسی هستند. اندازه‌ی فواصل بین اگزون‌ها با کیلو باز (kb) مشخص شده‌اند. در پستانداران یازده ZFs از اگزون‌های ۲ (E2) تا اگزون ۸ (E8) قرار گرفته است، که چندین ZFs به صورت خورد شده در دو اگزون مجاور قرار دارند (Ohlsson *et al.*, 2001).

Figure 1- Genomic organization of the chicken (a) and human (b) CTCF genes. Filled boxes, protein coding exons; open boxes, untranslated exons; arrow , transcription start sites. Estimated sizes of introns are in kilobases. The eleven ZFs of mammalian CTCF are distributed in exons E2 to E8, with several ZFs being split across neighboring exons15 (Ohlsson et al., 2001).

با استفاده از Chip-seq در سلول بنیادی رویانی موش ۳۹۶۰۹ جایگاه اتصال (Chen *et al.*, 2008)، و همچنین ۱۹۳۰۸ و ۱۹۵۷۲ به ترتیب در سلول‌های هلا[1] و جورکات[2] شناسایی گردید (Cuddapah *et al.*, 2009). با آنالیز اتصالات کروماتین[3] به وسیله‌ی توالی یابی انتهای جفت شده‌ی تگ[4] (PET) یا Chia-PET

[1] Hela

[2] Jurkat
[3] Chromatin interaction analysis
[4] Paired-end tag

اینتراکتوم CTCF و کروماتین در سلول‌های پلری پوتنت[1] بررسی شد، که در این آنالیز به ترتیب ۱۴۸۰ و ۳۳۶ جایگاه اتصالات *cis* و *trans* مشاهده گردید. این نواحی اتصالی با حالت‌های اپیژنتیکی، فعالیت‌های پروموتور، اتصال به افزاینده و اشغال غشا هسته‌ای همراه بودند (Handoko *et al.*, 2011). به طور کلی در پستانداران توالی‌های DNA اتصالی CTCF و نواحی کناری آنها به طور معنی‌داری حفاظت شده هستند. جایگاه‌های اتصال CTCF با توجه به میزان شبهات به توالی‌های بسیار شناخته شده-ی اتصالی CTCF به سه دسته‌ی با شباهت کم، متوسط و زیاد دسته بندی می‌شوند (Essien *et al.*, 2009).

قابلیت اتصال به توالی‌های متفاوت با بکارگیری از دیگر پروتئین‌های اتصالی منجر به ایجاد یک مدل کد-CTCF شده است، که موجب می‌شود تا CTCF با استفاده از ترکیبات متفاوتی از ZFs به جایگاه‌های متفاوتی متصل شده و باعث تشکیل ساختاری شده تا برای اتصال با الگوهای پروتئینی متفاوت مناسب باشد (Ohlsson *et al.*, 2010).

CTCF و سرطان

ZFs این پروتئین قابلیت اتصال به DNA و دیگر پروتئین‌ها را دارا می‌باشند اما در بررسی بر روی سرطان‌هایی که در آنها جهش در CTCF رخ داده است، مشاهده گردید که ZFs این پروتئین قادر هستند فقط به DNA و یا فقط به پروتئین های دیگر متصل شوند. این پروتئین احتمالا باعث تنظیم در بیان چندین ژن مانند، MYC، ARF، PIM1، PLK و Igf2 که در ایجاد سرطان نقش مستقیمی دارند، می‌شود. در سرطان های سینه، پروستات و ویلمز[2] در ناحیه انگشت روی، جهش های مشاهده گردیده است که باعث تغییر اسید آمینه می‌شوند (Filippova *et al.*, 2002). از CTCF به عنوان کاندید جدید از ژن باز دارنده سرطان (TSG) یاد می‌شود، چون مطالعات نشان داده است، که این ژن از سه طریق با سرطان در ارتباط است:

۱) جلوگیری از رشد سلول

۲) قرار گرفتن در ناحیه کروموزومی q2216 که باعث ازبین بردن هتروزیگوسیتی در تومورهای سینه می شود

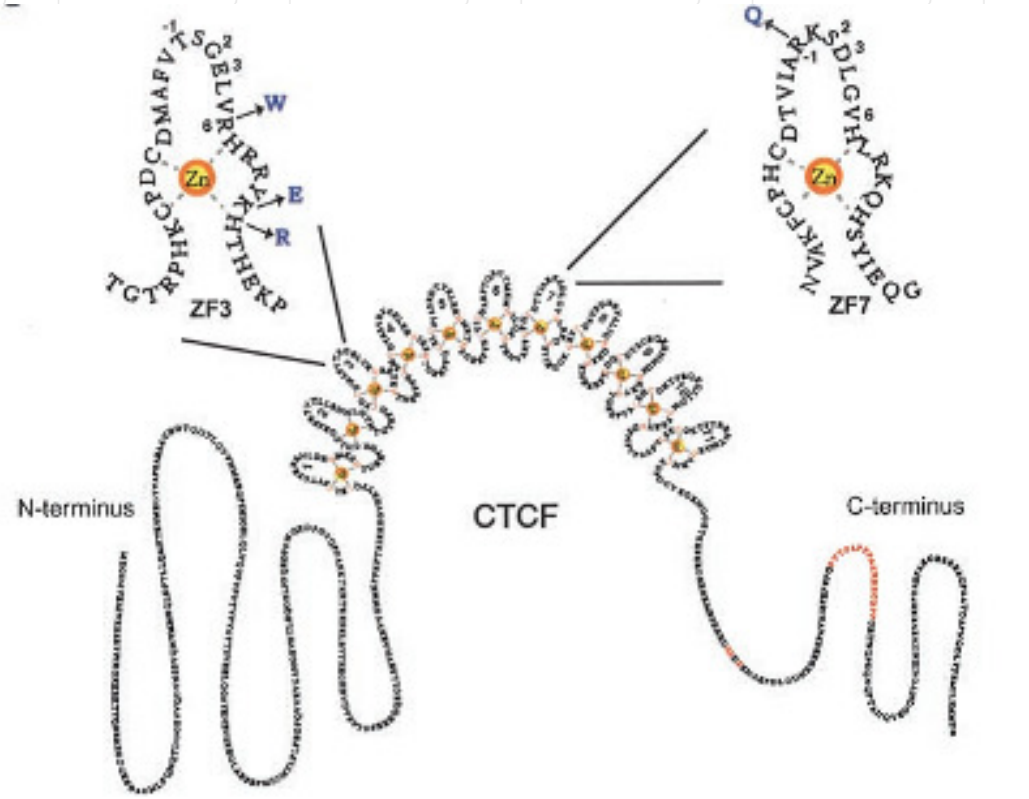
۳) جهش های ویژه‌ای در ژن CTCF که در ارتباط با سرطان های مشخص شده است (شکل ۲).

به‌طور کلی تشکیل تومورهای سرطانی یک فرآیند چند مرحله‌ای بوده که ابتدا عوامل سلولی پیش برنده‌ی سرطان، یا همان آنکوژن‌ها[3] فعال می‌گردند و سپس TSGs غیر فعال می‌شوند، و نتیجه‌ی آن معمولا با بیان بیش از حد آنکوژن‌ها و کاهش بیان TSGs همراه است.

[1] Pluripotent

[2] Wilms

[3] Oncogenes



شکل ۲- در این شکل ساختار طبیعی پروتئین CTCF و انتهای NH_2 و COOH و همچنین نواحی اتصالی CTCF که شامل ۱۰ ZFs کلاس C_2H_2 و یک ZFs کلاس C_2HC می‌باشند نشان داده شده است. بخش بزرگ شده‌ی جهش‌های بی‌معنی ایجاد کننده‌ی سرطان که باعث تغییر در توالی اسید آمینه‌ای ZF3 و ZF7 که جایگاه‌های حیاتی برای شناسایی باز DNA یا ساختار ZFs می‌باشند را نشان می‌دهد (Filippova *et al.*, 2002).

Figure 2- schematic drawing of the wild-type CTCF protein shows the NH2-terminal and COOH-terminal domains of CTCF and the DNA binding domain of CTCF composed of 10 C2H2-class and 1 C2HC-class ZFs. The enlarged diagrams indicate the tumor-specific CTCF missense mutations that result in amino acid substitutions within ZF3 and ZF7 at positions critical for DNA base recognition or ZF formation (Filippova et al., 2002).

با توجه به این که پیشرفت تومور ها با کاهش بیان TSG همراه است، ولی بطور باور نکردنی میزان CTCF در لاین سلول‌های سرطان سینه افزایش می‌یابد، که این افزایش باعث کاهش مرگ برنامه ریزی شده سلولی[1] می‌گردد (Docquier *et al.*, 2005). بیان نابجای CTCF در بسیاری از لاین‌های سلول‌های سرطانی و طبیعی موجب بازداشتن از تقسیم و تکسیر سلولی

[1] Apoptosis

می‌گردد (شکل ۳). به طور کلی مشخص شده که، CTCF به صورت مستقیم در تنظیمات بیان بسیاری از فاکتورهای مهم دخیل در رشد، مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی، توقف تقسیم سلولی[1]، پیری سلول‌ها[2] و تمایز نقش ایفا می‌کند. توضیح چگونگی عملکرد CTCF می‌تواند برای فهمیدن چگونگی توانایی CTCF در القاء توقف سیکل سلولی در بسیاری از سلول‌های سرطانی مفید واقع شود (Fiorentino and Giordano, 2012).

نقش CTCF در جداکننده‌ها

جداکننده‌ها قطعاتی از توالی‌های DNA هستند، که از تداخل نامناسب ناحیه‌های کروماتینی مجاور جلوگیری می‌کنند. به طور کلی جداکننده‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند:

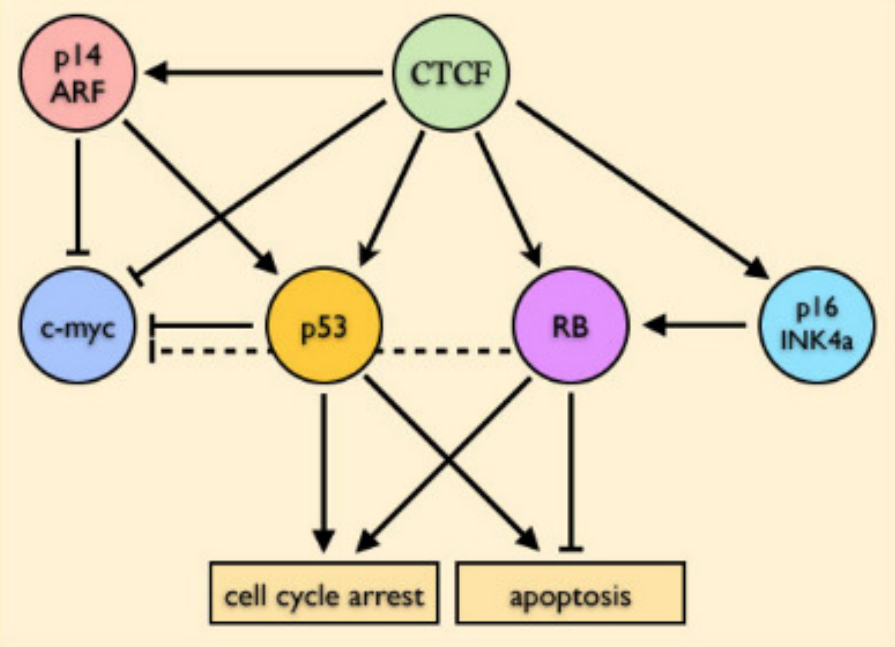
۱) جداکننده‌های بازدارنده‌ی توالی‌های افزاینده[3] (EB) ، که بین توالی افزاینده و پروموتور قرار گرفته و از تأثیر افزاینده‌ها بر پروموتور جلوگیری می‌کند.

۲) جداکننده‌های مانع[4]، از گسترش ساختارهای هتروکروماتینی به مناطق یوکروماتینی که در بین دو جداکننده‌ی مانع قرار دارند جلوگیری می‌کنند (شکل ٤).

از جداکننده‌ها به عنوان یک مکانیسم بسیار مهم برای کنترل اپیژنتیکی بیان ژن، به‌خصوص در نواحی نقشه گذاری شده، یاد می‌گردد (Gaszner and Felsenfeld, 2006). اولین جداکننده EB که در پستانداران شناسایی گردید، توالی cHS4 بود، که در انتهای ′۵ ناحیه‌ی β-گلوبین جوجه قرار دارد (Chung *et al.*, 1993). فعالیت EB در این جداکننده با اتصال محکم پروتئین CTCF همراه است (Bell *et al.*, 1999). تنظیم جایگاه β-گلوبین که به خوبی مطالعه شده است، یک مثال بسیار عالی از نقش CTCF در تنظیم بیان ژن‌ها در طی نمو می‌باشد. در اینجا چندین ناحیه‌ی اتصال برای CTCF وجود دارد که در نهایت باعث ایجاد ساختار فضایی ویژه‌ای شده که در سلول‌های مختلف متفاوت بوده، و بیان ژن‌های موجود در ناحیه‌ی β-گلوبین را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Phillips and Corces, 2009). این ساختار و تفاوت‌های آن در سلول‌های مختلف در شکل زیر به خوبی نشان داده شده است (شکل ۵).

همچنین، با بررسی‌هایی که برای یافتن جایگاه‌های اتصال CTCF انجام گرفت، مشخص گردید که این پروتئین در ناحیه‌ی نقشه گذاری شده‌ی تنظیمی ICR که بین دو ژن Igf2 و H19 قرار دارد، متصل شده و در اینجا نیز در ایجاد EB نقشی کلیدی دارند (Bell and Felsenfeld, 2000). در این ناحیه از ژنوم، CTCF نقش بسیار مهمی در برقراری و نگهداری نقشه‌گذاری و الگوی بیان ژن در طی نمو دارا می‌باشد.

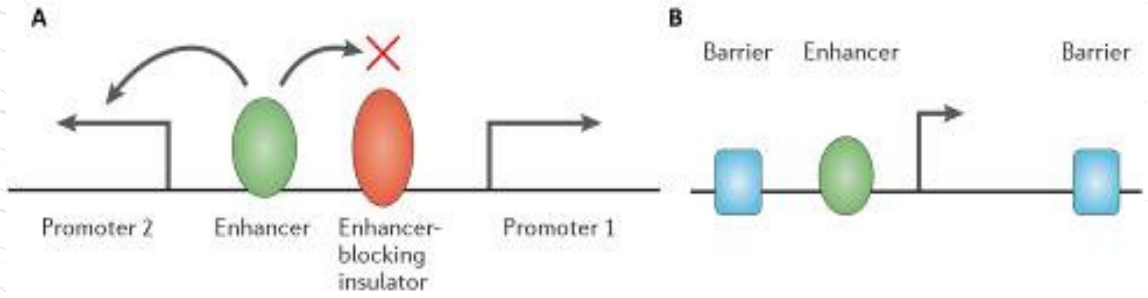
[1] Quiescence
[2] Senescence
[3] Enhancer-blocking
[4] Barrier insulation



شکل ۳- مکانیسم‌های ملکولی ایجاد شده به دلیل بیان بیش از حد CTCF در سلول‌های HeLa. بیان غیر معمول CTCF موجب توقف سیکل سلولی بدون مرگ سلولی برنامه ریزی شده در سلول‌های HeLa می‌شود. اتصال CTCF به cts1myc، cts2myc، ctsprb، ctsp16، ctsp14 و ctsp53 احتمالا بتواند دلیل ایجاد حالت شبه پیری‌سلولی[1] را توضیح دهد. در حقیقت CTCF به عنوان یک فاکتور مثبت برای بیان ژن‌های p14ARF، p16INK4a، TP53 و RB عمل کرده، که این‌ها از بیان c-myc را جلوگیری به عمل می‌آورند. افزایش تدریجی در پروتئین p53 به دلیل بیان p14ARF موجب مرگ برنامه‌ریزی شده‌ی سلولی و توقف تقسیم سلولی می‌شود. اما خانواده‌های پروتئین RB از مرگ برنامه ریزی شده‌ی سلولی به دلیل حضور p53 جلوگیری می‌نمایند. از p16INK4a و RB به عنوان فاکتورهای ایجاد کننده‌ی پیری سلولی یاد می‌شود. توقف سیکل سلولی به دلیل p53 می‌تواند به دلیل جلوگیری از بیان c-myc ایجاد شود (Fiorentino and Giordano, 2012).

Figure 3- Molecular mechanisms engaged by CTCF over-expression in HeLa cells. Ectopic expression of CTCF induces cell cycle arrest without apoptosis in HeLa cells. Enforced CTCF-binding to cts1myc, cts2myc, ctsprb, ctsp16, ctsp14 and ctsp53 may explain this senescent-like phenotype. Indeed CTCF would act as positive transcriptional modulator of p14ARF, p16INK4a, TP53 and RB genes, whereas it would repress transcription of c-myc. Accumulation of p53 protein, enforced by p14ARF expression, would lead to eventual cell cycle arrest and apoptosis. However, RB family proteins overcome the p53-mediated apoptosis induction. In particular, RB and p16INK4a are well known positive factors of cellular senescence. Finally, p53-mediated cell cycle arrest could be enforced by c-myc repression (Fiorentino and Giordano, 2012).

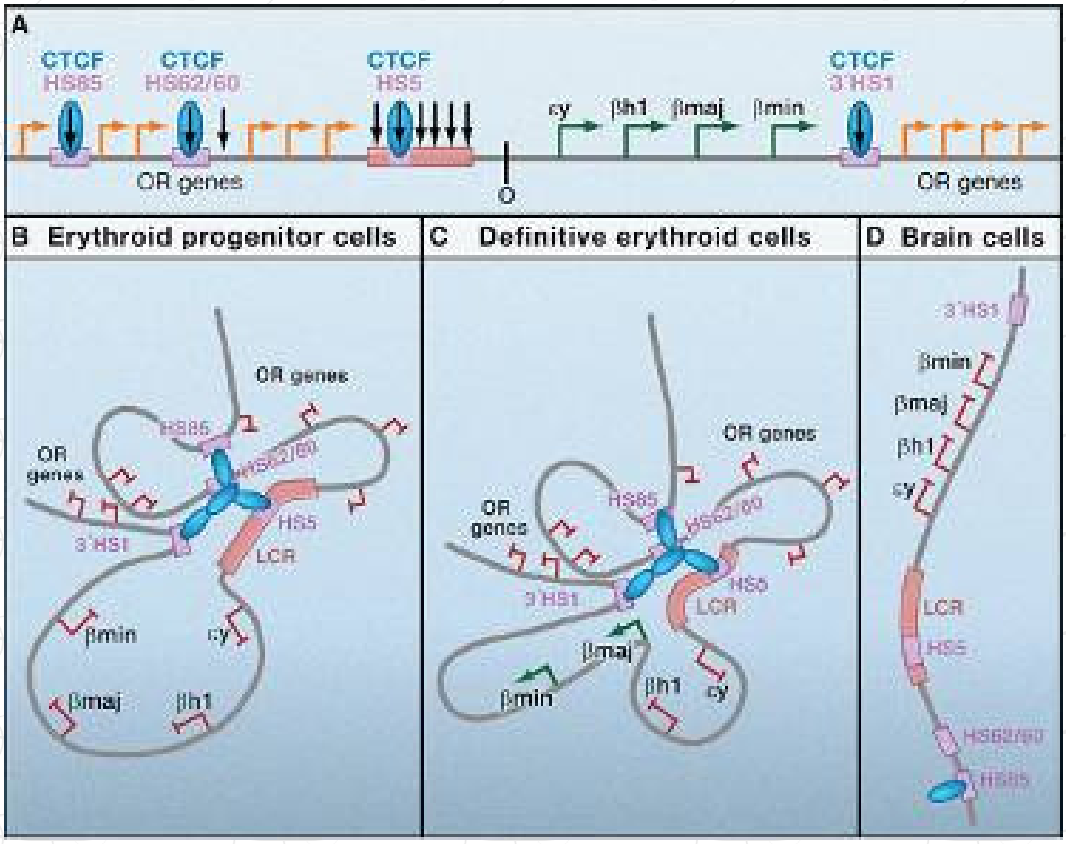
[1] **Enescent-like**



شکل ٤- انواع جداکننده‌ها (A): جداکننده‌های بازدارنده‌ی توالی‌های افزاینده، EB باعث اختلال در ارتباط بین پروموتور و افزاینده با توجه به جایگاهش می‌شود. یک EB تنها زمانی که بین یک پروموتور و افزاینده قرار گیرد (مانند حالت پروموتور ۱)، از فعالیت رونویسی جلوگیری می‌کند؛ در دیگر حالت‌ها (برای مثال پروموتور ۲) فعالیت رونویسی را مختل نمی‌کند. (B): جداکننده‌های مانع، یک جدا کننده‌ی مانع ژن را از پیشرویه ساختارهای هتروکروماتینی محافظت می‌نماید (Gaszner and Felsenfeld, 2006).

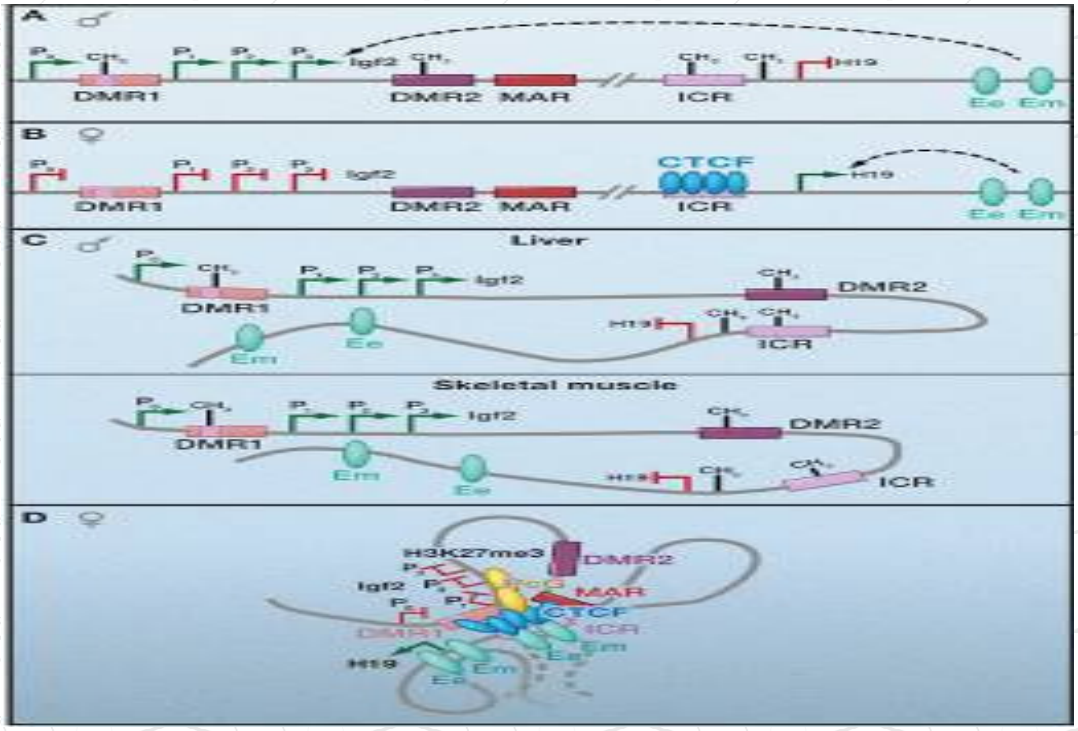
Figure 4- Types of insulators: (A) enhancer-blocking insulator function. An enhancer-blocking insulator is expected to interfere with enhancer–promoter communication in a position-dependent manner. An enhancer-blocking insulator will block transcriptional activation only when it lies between a promoter and an enhancer (as in the case of promoter 1); in other situations (such as for promoter 2), activation is not blocked. (B) barrier insulator. A barrier insulator protects a gene from heterochromatic encroachment (Gaszner and Felsenfeld, 2006).

متیلاسیون ICR در نرها در طی گامتوژنز از اتصال CTCF به چهار جایگاه اتصال آن در این ناحیه جلوگیری می‌کند. ولی در ماده‌ها این ناحیه در طی گامتوژنز از متیلاسیون محافظت شده و در نتیجه پروتئین CTCF قادر به اتصال به این ناحیه می‌باشد. این اتصال در حفظ نقشه-گذاری در مراحل بعدی و سلول‌های بدنی بسیار حائز اهمیت است. با اتصال CTCF توالی افزاینده نمی‌تواند بر روی پروموتور ژن Igf2 اثر بگذارد و در نتیجه بیان نخواهد شد، اما توالی افزاینده بر روی ژن H19 اثر کرده و باعث بیان آن می‌شود. در آللی که منشأ پدری دارد، علاوه بر متیلاسیون ICR، پروموتور ژن H19 نیز متیله شده که از بیان آن جلوگیری شده اما توالی افزاینده به دلیل عدم اتصال CTCF بر روی ژن Igf2 اثر کرد و باعث بیان آن می‌شود (شکل ٦) (Pant *et al.*, 2003). به طور کلی CTCF دارای چندین نقش در ناحیه‌ی H19/Igf2 ICR می-باشد: ۱) خنثی کردن اثر توالی افزآینده بر روی پروموتور آلل مادری ژن Igf2 ، ۲) شروع بیان ژن H19، ۳) نگهداری الگوی متیلاسیون آلل‌های والدینی در ناحیه‌ی ICR موجود در بین این دو ژن و ٤) ایجاد یک ساختار بلند کروماتینی.



شکل ۵- ارتباطات درون کروموزومی با توجه به نوع سلول. (A) جایگاه‌های اتصال CTCF در یک الگوی خطی برای جایگاه β-گلوبین. چهار ژن گلوبین (فلش‌های سبز) در درون یک دسته ژن‌های گیرنده‌ی بویایی (فلش‌های نارنجی) قرار گرفته‌اند. سه جایگاه اتصال CTCF در بالا دست (5′HS85، 5′HS62/60 و 5′HS5) و یک جایگاه در ۲۰ kb پایین دست ژن قرار گرفته‌اند. (B تا D) ارتباطات درون کروموزومی در حالت سه بعدی، و الگوی بیان ژن گلوبین در سلولهای خونی اولیه (B)، سلولهای خونی تمایز یافته (C) و سلولهای مغزی غیر خونی(D) (Phillips and Corces, 2009).

Figure 5- Cell type-specific intrachromosomal interactions at a developmentally regulated locus. (A) CTCF binding sites in linear manner for β-globin locus. Four globin genes (green arrows) are embedded within a larger olfactory receptor gene cluster (orange arrows). Three CTCF-binding sites have been identified upstream (5′HS85, 5′HS62/60, and 5′HS5) and one 20 kb downstream (3′HS1) of the gene. (B to D) 3C-based intrachromosomal interactions, and globin gene expression profiles in erythroid progenitors (B), definitive erythroid cells (C), and non-erythroid brain cells (D) (Phillips and Corces, 2009).



شکل ٦- A و B جایگاه H19/Igf2 موش را به صورت یک مدل خطی نشان می‌دهد. ژن غیر کد کننده‌ی H19 به صورت مادری بیان شده که در فاصله‌ی ۹۰ kb پایین دست ژن کد کننده‌ی Igf2 قرار دارد که تنها به صورت آلل پدری بیان می‌شود. ناحیه‌ی کنترل نقشه گذاری (ICR) حدود ۲ kb بالادست H19 قرار داشته و دارای چهار جایگاه اتصال CTCF می‌باشد، و برای تنظیم کل جایگاه ضروری می‌باشد. نواحی متیلاسیون افتراقی[1] (DMRs) ، مانند DMR1 در بالا دست پروموتورهای Igf2 (P1، 2 و 3) و DMR2 درون اگزون ٦ Igf2 باهم به صورت کاملا هماهنگ شده، الگوهای بیانی با منبع آللی[2] با همکاری افزاینده‌های موجود در فواصل ۸ kb (Ee: افزاینده‌ی بافت اندودرم و ۲۵ kb (Em: افزاینده‌ی بافت مزودرمی پایین دست ژن Igf2 را تنظیم می‌کنند. CH_3-، متیلاسیون DNA. دایره‌های سبز رنگ، افزاینده. C و D مدل‌های سه بعدی الگوهای با منبع آللی برای اتصال CTCF، متیلاسیون DNA، و حلقه‌های کروماتینی را نشان می‌دهد (Phillips and Corces, 2009).

Figure 6- (A and B) Linear depiction of the mouse H19/Igf2 locus. The maternally expressed noncoding H19 gene is located approximately 90 kb downstream from the gene encoding Insulin-like growth-factor 2 (Igf2) that is expressed exclusively from the paternal allele. The imprinting control region (ICR) ~2 kb upstream of H19 contains four CTCF-binding sites and is essential for regulation of the entire locus. Differentially methylated regions (DMRs), such as DMR1 upstream of Igf2 promoters (P1, 2, 3) and DMR2 within Igf2 exon 6, act in concert to regulate reciprocal, allele-specific expression patterns from a shared set of downstream enhancers at 8 kb (Ee: endodermal tissue enhancer) and 25 kb (Em: mesodermal tissue enhancer) downstream of the H19 gene. –CH3, DNA methylation. Green ovals, enhancers. (C and D) Schematic 3D models illustrating allele-specific patterns of CTCF binding, DNA methylation, and chromatin looping (Phillips and Corces, 2009).

[1] **Differentially methylated regions**
[2] **Allele-specific expression patterns**

به طور کلی عملکرد CTCF در جداکننده ها تنها از طریق مکانیسم EB و نقش غیر مستقیم در جداکننده‌های مانع مطرح می‌شود (Phillips and Corces, 2009).

CTCF پروتئین مهم در غیر فعال‌سازی کروموزوم X (XCI)

XCI یک نمونه‌ی بسیار جالب برای نشان دادن بیان ژن به‌صورت تک آللی و تنظیمات اپیژنتیکی در پستانداران می‌باشد. در پستانداران، جنس ماده دارای دو کروموزوم جنسی X می‌باشد. متعادل کردن مقدار کروموزوم جنسی با استفاده از خاموش کردن یکی از دو کروموزوم جنسی در طی مراحل ابتدایی نمو انجام می‌گیرد. مکانیسم XCI در موش به طور اساسی مورد مطالعه قرار گرفته است، که حالت ابتدایی XCI یعنی شکل نقشه گذاری شده، و حالت بعدی آن یعنی شکل تصادفی XCI را به خوبی نشان می‌دهد. Xist ncRNA با هر دو شکل XCI در ارتباط بوده، و همان کروموزومی که از آن بیان می‌شود را پوشانده و خاموش می‌کند.

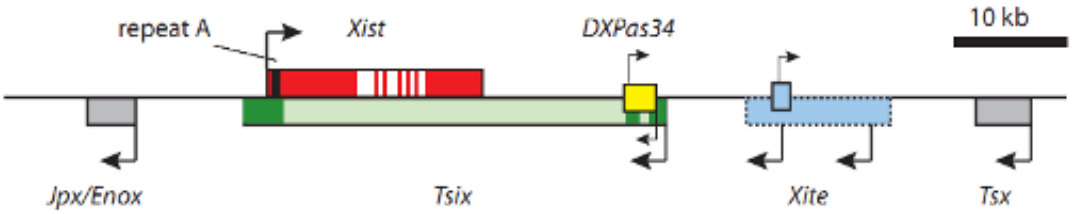
اگرچه جزئیات مکانیسم این دو حالت به خوبی روشن نشده، اما پژوهشگران بر این عقیده‌اند که XCI تنها در مراحل ابتدایی نمو روی می‌دهد. در طی XCI کروموزوم غیر فعال[1] (Xi) در اثر تنظیمات اپیژنتیکی به صورت ساختارهای هتروکروماتینی در آمده، و با استفاده از این تنظیمات در طی تقسیمات سلولی این ساختارها ثابت می‌مانند. با وجودی که مطالعات بیشتر بر روی Xi نشان داد که تغییرات هیستونی زیادی در آن وجود دارد که شامل H3K27me3، H3K9me2، H3K9me3، H4K20me1 و H2AK119Ub به علاوه جایگزینی هیستون متفاوت[2] ماکرو H2A می‌باشد. با این وجود، خالی از تغییرات هیستونی مانند H3K4me2/3 و لایزین استیله شده در هیستون‌های H3 و H4 که با ساختارهای یوکروماتینی همراه است، می‌باشد (Chow and Heard, 2009). انتهای ´۵ Xist دارای ناحیه‌ی متیلاسیون می‌باشد که در تخمک متیله بوده ولی در اسپرم نمی‌باشد (Ariel *et al.*, 1995). همچنین عامل تنظیم کاهشی Xist یک ncRNA کننده‌ی دیگری به نام Tsix می‌باشد که آنتی‌سنس Xist نامیده می‌شود. این دو ژن در کنار هم بر روی کروموزوم X در ناحیه‌ای به نام مرکز غیر فعال سازی X[3] (Xic) قرار گرفته‌اند (شکل ۷).

در این ناحیه چندین ژن دیگر وجود دارند که در XCI نقش دارند (Arthold *et al.*, 2011). Tsix خود توسط یک ncRNA دیگر به نام Xite و نواحی تکراری DXPas34 کنترل می‌شود، و هر دوی آنها در داخل Xic قرار دارند، که این نواحی در اسپرم بسیار بیشتر از تخمک متیله گردیده‌اند (Payer and Lee, 2008).

[1] inactive X

[2] histone variant

[3] X-inactivation center



شکل ۷- عناصر موجود در مرکز غیر فعال سازی X (Xic). در این شکل، محل و مسیر رونویسی عناصر Xic نشان داده شده است (Payer and Lee, 2008).

Figure 7- Elements of the mouse X-inactivation center (Xic). Diagram depicting the location and transcriptional direction of Xic-elements (Payer and Lee, 2008).

در ناحیه‌ی DXPas34 مناطقی برای متصل شدن پروتئین CTCF وجود دارد. اگر این مناطق متیله شوند، اتصال این پروتئین کاهش می‌یابد، که نشان دهنده‌ی نقش کلیدی و بسیار مهم آن برای تنظیمات اپیژنتیکی در XCI است (Chao *et al.*, 2002). اتصال CTCF به نواحی غیر متیله در کروموزوم X فعال باعث می‌گردد اولا، CTCF باعث جلوگیری از دسترسی Xist به توالی افزاینده‌ی پایین دست آن یعنی DXPas34 شود (Chao *et al.*, 2002). به علاوه، DXPas34 به کوفاکتور CTCF یعنی Yy1 متصل شده و باهم یک کمپلکسی را تشکیل داده که باعث فعال شدن بیان ژن Tsix می‌شود (Donohoe *et al.*, 2007). ثانیا، CTCF برای جفت شدن کروموزوم X در اطراف ناحیه‌های Tsix و Xite در شروع غیر فعال سازی تصادفی X نیاز است (Xu *et al.*, 2007). در مقابل نقش مهم CTCF بر روی کروموزوم X فعال، CTCF همچنین به پروموتور Xist در Xi متصل شده و باعث فعال شدن آن می‌شود (Pugacheva *et al.*, 2005). در مجموع، CTCF به عنوان یک تنظیم کننده‌ی چند منظوره در هر دو کروموزوم X فعال و غیر فعال می‌باشد، و به عنوان یک فاکتور ترجمه کننده‌ی اطلاعات نقشه گذاری با استفاده از توانایی آن در خواندن نشانه‌های متیلاسیون محسوب می‌گردد.

کشف نقش CTCF در ایجاد ارتباط بین متیلاسیون و پیرایش متفاوت (Alternative splicing)

در سال‌های اخیر توجه به ارتباط بین ساختارهای DNA و پیرایش mRNA های اولیه در حال افزایش است. بیش از ۹۰٪ از ژن‌های انسان تحت پیرایش متفاوت قرار گرفته و از هر mRNA اولیه دو یا چندین شکل متفاوت از mRNA بالغ تولید می‌شود (Pan *et al.*, 2008)، و اختلال در این فرآیند با ایجاد چندین بیماری مختلف همراه است (Tazi *et al.*, 2009). پردازش mRNA اولیه ژن CD45 یک مدل مناسب برای مطالعه فرآیند تنظیمی اسپلایسینگ متفاوت در یوکاریوت‌ها می‌باشد. در این ژن با

توجه به مرحله نمو لیمفوسیت‌ها[1] نحوه‌ی اسپلایسینگ در اگزون ٤ تا ٦ آن متفاوت می‌باشد، به طوری که در لمفوسیت‌های ابتدایی شکل طویل‌تر ژن که دارای اگزون ٤ است بیان شده، و در لمفوسیت‌های تمایز یافته‌ی کامل، کوتاه‌ترین شکل ژن که فاقد سه اگزون هستند بیان می‌گردد. داخل اگزون ٥ دارای جایگاه اتصال برای پروتئین CTCF می‌باشد، که این جایگاه اتصال با توجه به مرحله نمو لمفوسیت‌ها دارای الگوهای متیلاسیون متفاوتی هستند. با متیلاسیون جایگاه اتصال CTCF دیگر این پروتئین قادر به اتصال نبوده که این امر با افزایش سرعت رونویسی از ژن CD45 همراه است. در این شرایط یک فاکتور تنظیم اسپلایسینگ به نام ریبونوکلئو پروتئین نامتجانس L-شکل heterogeneous ribonucleoprotein L-like ((hnRNPLL)) به اگزون‌های ٤ و ٦ mRNA اولیه‌ی در حال رونویسی متصل شده که در نهایت باعث حذف اگزون ٤ تا ٦ آن می‌شود. هنگامی که جایگاه اتصال CTCF غیر متیله باشد، این پروتئین به این جایگاه متصل شده و از رونویسی سریع آن جلوگیری کرده و در این شرایط فاکتور تنظیمی hnRNPLL تنها به اگزون ٤ متصل شده و در نهایت اگزون ٥ آن در mRNA بالغ باقی می‌ماند (شکل ٨) (Shukla *et al.*, 2011).

اگرچه مطالعه‌ی عملکرد CTCF بیشتر به فعالیت خارج ژنی محدود بوده، اما یافته‌ها نشان از وجود حدود ٤٥-٤٠٪ جایگاه اتصال در داخل ژن می‌دهند (Jothi *et al.*, 2008). بنابراین پیشنهاد می‌شود که، جایگاه‌های اتصال داخل ژنی CTCF باعث تأثیر در فرآیند پیرایش mRNA های اولیه می‌شود. با این یافته بسیار مهم دو عقیده نقض شده است. اولی این است که، تا این زمان CTCF تنها در بین ژن‌ها فعال بوده و در داخل ژن نقشی نداشت. دوم این که، این روش تنظیمی پیرایش نشان داد که متیلاسیون DNA بر خلاف روش‌های تنظیمی شناخته شده‌ی دیگر با استفاده از جلوگیری از اتصال CTCF باعث برداشتن مانع رونویسی آنزیم پلیمراز می‌شود (Kornblihtt, 2012).

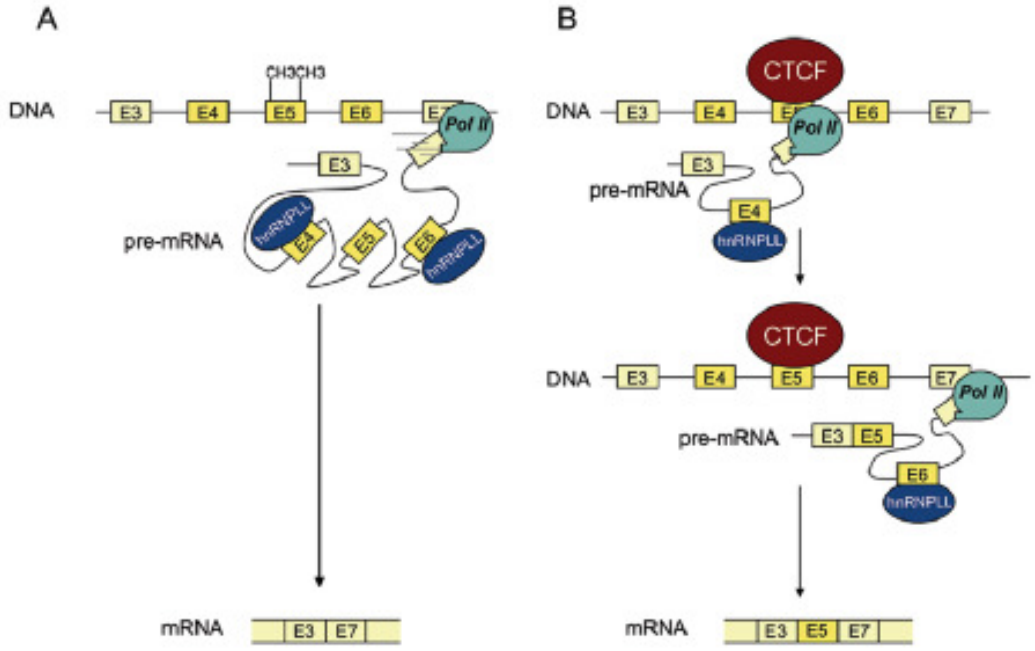
نقش CTCF در برقراری مجدد تنظیمات اپیژنتیکی[2]

در نمو طبیعی یا در برخی حالت‌های بیماری، برخی از سلول‌ها تحت برقراری مجدد تنظیمات اپی ژنتیکی قرار می‌گیرند، که شامل برداشت تنظیمات اپی ژنتیکی به همراه برقراری مجدد اما متفاوت آن است. این تغییرات به طور ویژه‌ای پس از لقاح اتفاق می‌افتد، در این زمان بسیاری از تنظیمات اپی ژنتیکی گامت‌ها پاک شده و با تنظیمات اپی ژنتیکی که برای مراحل ابتدایی نمو رویان مهم است، جایگزین می‌شود. (Morgan et al., 2005). این مرحله ابتدایی نمو بسیار حساس بوده و به شدت تحت تاثیر عوامل محیطی قرار می‌گیرند. این امر موجب شده تا رویان‌های تولیدی در شرایط in vitro نسبت به

[1] Lymphocyte

[2] Reprogramming

رویان‌های in vivo دارای کیفیت کمتری باشند (Wrenzycki et al., 2007). همچنین کیفیت رویان‌های نموی در محیط‌های مختلف در شرایط in vitro، متفاوت می‌باشد (Zahmatkesh et al., 2013)، که این تفاوت را می‌توان در تغییر الگوی بیان ژن‌های مهم نموی مشاهده نمود (Wrenzycki et al., 2007).



شکل ۸- مدل پیرایش متفاوت ژن CD45. (A) متیلاسیون اگزون ۵ DNA از اتصال CTCF جلوگیری می‌کند، که با عدم وجود مکث در کار RNA پلیمراز II همراه است. با رونویسی سری اگزون ۵ از mRNA بالغ حذف شده، حذف اگزون ٤ و ٦ با استفاده از اتصال hnRNPLL به این دو اگزون در pre-mRNA انجام می‌شود (B) با نبود متیلاسیون، اتصال CTCF به اگزون ۵ صورت گرفته و و باعث ایجاد مانع برای رونویسی Poll II شده که از اگزون ۵ محافظت کرده و موجب حضور آن در RNA بالغ می‌شود. اگزون‌های ٤ و ٦ نیز توسط hnRNPLL از mRNA بالغ حذف می‌شوند (Kornblihtt, 2012).

Figure 8- Model for the regulation of CD45 alternative splicing. (A) Methylation of exon 5 DNA prevents binding of CTCF. In the absence of internal pauses, fast elongation promotes exclusion of exon 5 from mature mRNA. Exclusion of exons 4 and 6 is promoted by binding of hnRNPLL to these exons in the pre-mRNA. (B) In the absence of methylation, CTCF binds to exon 5 DNA and creates a transient roadblock to pol II elongation that favors exon 5 recognition at the pre-mRNA level and its inclusion into mature mRNA. Inclusion of exons 4 and 6 remains inhibited by hnRNPL binding (Kornblihtt, 2012)**.**

برقراری مجدد دیگری نیز در سلولهای زاینده اولیه (PGCs) اتفاق می‌افتد، که نقشه گذاری‌های والدینی در آنها پاک شده و توانایی توتیپوتنسی در آنها ایجاد می شود. این سلولها که تحت تنظیمات مجدد اپی ژنتیکی قرار گرفته‌اند قادر به تمایز به دیگر سلولها هستند. بنابراین در طی چرخه‌ی زندگی برقراری مجدد تنظیمات اپی ژنتیکی در طی دو مرحله اجرا می‌شود که شامل گامتوژنز و پیش از لانه گزینی رویان، است (Morgan *et al.*, 2005).

حدود ۱۵۷۰۰ ژن در طی مراحل پیش از لانه گزینی موش، به صورت یک الگوی منظم بیان می‌شوند. با این وجود تعداد بسیار کمی از این ژن‌ها ممکن است از نظر بیولوژیکی مهم باشند، و احتمالا در تنظیم بیان ژن‌ها و یا در مسیرهای علامت دهی نقش دارند (Wrenzycki *et al.*, 2005).

پروتئین CTCF از طریق مکانیسم‌های تنظیمی مهم مرتبط با اپیژنتیک شامل، جداکننده-ها، نقشه‌گذاری و غیرفعال سازی کروموزوم X نقش غیر قابل انکاری در برقراری این تنظیمات دارا می‌باشد(Ohlsson *et al.*, 2001). علاوه بر نقش بسیار مهم این ژن در تنظیم بیان چندین ژن مؤثر در فرآیند نمو، مانند Igf2/H19 و یا ژن‌های Hox، وظایف دیگر این ژن در بسیاری از فرآیند-های نمو گوناگون مشخص گرید (Herold *et al.*, 2012). مطالعات بیشتر به همراه تحلیل‌های انجام شده بر روی این پروتئین نشان از یک نقش اساسی در ایجاد ساختارهای کروماتینی دارد که به نظر می‌رسد به عنوان یک عامل توارثی در تنظیم مکانیسم اپی‌ژنتیکی بوده، و باعث ایجاد ارتباط بین متیلاسیون DNA، ساختارهای سطح بالاتر کروماتینی و تفاوت بیان ژن‌های سلول‌های مختلف می‌گردد (Phillips and Corces, 2009). در موجود بالغ الگوی بیان و تغییرات پس از ترجمه این ژن در سلول‌های مختلف متفاوت می‌باشد، که این نشان از نقش مهم این ژن در ایجاد و نگهداری تمایز سلول‌ها دارد (Torrano *et al.*, 2005). در یک آزمایش برای بررسی نقش CTCF از موش‌های ترانس‌ژنتیک که از طریق مکانیسم RNAi میزان پروتئین CTCF را کاهش داده بودند، استفاده شد. این آزمایش نشان داد که در غیاب این پروتئین باعث افزایش متیلاسیون در ناحیه‌ی ICR ژن H19 شده، که نشان دهنده‌ی نقش حفاظتی این پروتئین در برابر متیلاسیون در طی رشد و تشکیل تخمک می‌باشد. همچنین این تحقیق نشان داد که این پروتئین برای رشد طبیعی در طی پیش از لانه‌گزینی ضروری می‌باشد (Fedoriw *et al.*, 2004). آنالیز آماری میکرو-اری[1] (SAM) که بین موش‌های ترانس‌ژن CTCF و موش‌های غیر ترانس‌ژن انجام گرفت، ۱۵۹۰ ژن افزایش بیان و ۲۲۸۲ ژن کاهش بیان نشان دادند. تعداد بسیار زیادی از این ژن‌ها نقش مهمی در رشد رویان دارند، و نشان از این حقیقت است که اشکال در بیان این ژن باعث تأثیر بر روی مراحل بعدی نمو رویان می‌گردد (Wan *et al.*, 2008). در تحقیق دیگر که از موش‌های ناک-

[1] Statistical Analysis of Microarrays

اوت[1] شده، به طوری که توالی ژن CTCF آنها بر روی کروموزوم تغییر داده شده و بدین ترتیب پروتئین CTCF غیر طبیعی تولید می‌کردند، استفاده شد. موش‌های دارای ژنوتیپ CTCF(+/-) (کاملا طبیعی بوده اما موش‌هایی که در هر دو آلل ناک‌اوت شده بودند ((CTCF(-/-) قادر به لانه گزینی نبوده و در روزهای ٤/٥ و ٥/٥ رویانی و پس از تشکیل بلاستوسیست از بین می‌روند. توانایی رشد موش‌های CTCF(-/-) تا مرحله بلاستوسیست به دلیل وجود mRNA و پروتئین CTCF منبع مادری بوده که به تدریج تا مرحله بلاستوسیست تهی می‌گردد (Moore *et al.*, 2012). در تحقیقی دیگر، تغییرات بیان این ژن در طی مراحل پیش از لانه گزینی (از قبل بلوغ تا بلاستوسیست) مورد بررسی قرار گرفت. این تحقیق نشان داد که میزان mRNA در مرحله بلوغ نسبت به قبل از بلوغ به طور معنی داری کاهش می‌یابد، اما در مراحل بعدی یعنی ۲، ٤،١٦–٨ سلولی و بلاستوسیست میزان بیان نسبت به قبل بلوغ افزایش یافته است. این تغییرات بیان نشان از اهمیت پروتئین CTCF در مراحل ابتدایی دارد، به طوری که بلافاصله بعد از باروری بیان آن آغاز می‌شود. شروع بیان ژن CTCF از ژنوم رویان و تغییر منبع CTCF از مادری به رویانی در مرحله دو سلولی با زمان فعال شدن کوچک ژنوم رویان گاو همراه می‌باشد. علاوه بر این یک افزایش بیان نیز پس از مرحله ٨ سلولی که با فعال شدن بزرگ ژنوم رویان گاو همراه است، مشاهده می‌شود، اما این افزایش خیلی نبوده و مقدارش نسبتا کم است. همان طور که گفته شده است، پس از لقاح تخمک یک دمتیلاسیون سراسری ژنوم در گاو اتفاق می‌افتد که تا مرحله بلاستوسیست ادامه دارد. احتمالا با افزایش در دمتیلاسیون میزان جایگاه‌های اتصال برای پروتئین CTCF نیز افزایش یافته که نیاز به پروتئین CTCF بیشتری جهت اتصال به این جایگاه‌های دمتیله می‌باشد. به نظر می‌رسد این افزایش بیان باعث افزایش در میزان پروتئین CTCF در رویان شده، بنابراین افزایش نیاز به این پروتئین مرتفع می‌شود (Amiri-Roudbar, 2012).

نتیجه‌گیری

شواهد نشان از نقش فراگیر CTCF در برقراری ارتباطات تنظیمی درون و بین کروموزومی دارد (Botta *et al.*, 2010). با توجه به تغییر در مطالعات ژنومی به یک الگوی سه بعدی، به نظر میرسد که عملکردهای تنظیم ژنی CTCF که در دیگر فاکتورها نیز متداول است مانند نقش‌های که در فعال و بازدارنگی بیان، جداکننده‌ای و نقشه‌گذاری دارد در برابر نقش این پروتئین در سازمان دهی سراسر ژنوم در درجه‌ی دوم اهمت قرار گیرد (Phillips and Corces, 2009). نقش CTCF در تنظیمات ژنومی چنان گسترده است که می‌توان یک الگوی تنظیمی کد–CTCF برای این پروتئین در نظر گرفت. به طوری که این کد–CTCF در هرجایگاه اتصال CTCF ساختار فضایی مختص به آن ناحیه را

[1] Knockout

فراهم می‌کند (Ohlsson et al., 2010; Phillips and Corces, 2009). یافته‌های جدید نشان دادند که، CTCF عملکرد خود را از طریق ایجاد ارتباطات با دامنه‌ی وسیع با توجه به نوع سلول انجام می‌دهد. با وجود مطالعات گسترده طی دو دهه‌ی گذشته، هنوز توضیح نقش این پروتئین در نمو و تمایز سلولی در مراحل اولیه می‌باشد. با توجه به جایگاه‌های بسیار زیاد اتصال برای CTCF و قرار گرفتن حدود ٤٥٪ از این جایگاه‌ها در داخل ژن‌ها، کشف نقش این پروتئین در پیراش متفاوت mRNA پنجره‌ای جدید برای بررسی تنظیم ژنومی در نواحی اتصالی که در محدوده‌ی داخل ژن‌ها قرار گرفته فراهم شده است (Kornblihtt, 2012).

همچنان سوالات مهم زیادی درمورد چگونگی عملکرد این پروتئین بدون پاسخ مانده است. مشخص کردن ساختار سه بعدی نواحی ZFs موجب فهم بهتر از چگونگی استفاده از شکل فضایی CTCF و ZFs آن در اتصال به توالی‌های متفاوت می‌شود. دانستن این مطلب می‌تواند ما را در درک بهتری از، خصوصیات مختص جایگاهی، ارتباط بین ساختار فضایی CTCF، تغییرات پس از ترجمه‌ای که بر روی پروتئین‌ها رخ می‌دهد، همکاری با پروتئین‌های تنظیمی دیگر، و چگونگی ارتباطات کروماتینی، یاری نماید (Phillips and Corces, 2009). تمام یافته‌ها نشان می‌دهند که CTCF می‌تواند به عنوان یک استاد بافنده‌ی ژنومی در ایجاد ساختارهای سه بعدی تنظیمی ژنوم، در درون هسته‌ی سلول‌های پستانداران عمل کند.

منابع

Amiri-Roudbar M (2012). Quantification of CTCF transcript during maturation of bovine oocytes. MSc Thesis. ferdowsi University of Mashhad, Mashhad, Iran.

Apostolou E, Thanos D (2008). Virus infection induces NF-κB-dependent interchromosomal associations mediating monoallelic IFN-β gene expression. Cell 134:85-96.

Ariel M, Robinson E, McCarrey JR, Cedar H (1995). Gamete-specific methylation correlates with imprinting of the murine Xist gene. Nature Genetics 9:312-5.

Arthold S, Kurowski A, Wutz A (2011). Mechanistic insights into chromosome-wide silencing in X inactivation. Human Genetics 130:295-305.

Bacher CP, Guggiari M, Brors B, Augui S, Clerc P, Avner P, Eils R, Heard E (2006). Transient colocalization of X-inactivation centres accompanies the initiation of X inactivation. Nature Cell Biology 8:293-9.

Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I, Zhao K (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. Cell 129:823-37.

Bell AC, Felsenfeld G (2000). Methylation of a CTCF-dependent boundary controls imprinted expression of the Igf2 gene. Nature 405:482-5.

Bell AC, West AG, Felsenfeld G (1999). The protein CTCF is required for the enhancer blocking activity of vertebrate insulators. Cell 98:387-396.

Bernstein BE, Meissner A, Lander ES (2007). The mammalian epigenome. Cell 128:669-681.

Botta M, Haider S, Leung IXY, Lio P, Mozziconacci J (2010). Intra- and inter-chromosomal interactions correlate with CTCF binding genome wide. Molecular Systems Biology 6.

Burcin M, Arnold R, Lutz M, Kaiser B, Runge D, Lottspeich F, Filippova GN, Lobanenkov VV, Renkawitz R (1997). Negative protein 1, which is required for function of the chicken lysozyme gene silencer in conjunction with hormone receptors, is identical to the multivalent zinc finger repressor CTCF. Molecular and Cellular Biology 17:1281-8.

Chao W, Huynh KD, Spencer RJ, Davidow LS, Lee JT (2002). CTCF, a candidate trans-acting factor for X-inactivation choice. Science 295:345-7.

Chen X, Xu H, Yuan P, Fang F, Huss M, Vega VB, Wong E, Orlov YL, Zhang W, Jiang J, Loh Y-H, Yeo HC, Yeo ZX, Narang V, Govindarajan KR, Leong B, Shahab A, Ruan Y, Bourque G, Sung W-K, Clarke ND, Wei C-L, Ng H-H (2008). Integration of external signaling pathways with the core transcriptional network in embryonic stem cells. Cell 133:1106-1117.

Chow J, Heard E (2009). X inactivation and the complexities of silencing a sex chromosome. Current Opinion in Cell Biology 21:359-366.

Chung JH, Whiteley M, Felsenfeld G (1993). A 5' element of the chicken beta-globin domain serves as an insulator in human erythroid cells and protects against position effect in Drosophila. Cell 74:505-14.

Cuddapah S, Jothi R, Schones DE, Roh T-Y, Cui K, Zhao K (2009). Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains. Genome Research 19:24-32.

Docquier F, Farrar D, D'Arcy V, Chernukhin I, Robinson AF, Loukinov D, Vatolin S, Pack S, Mackay A, Harris RA, Dorricott H, O'Hare MJ, Lobanenkov V, Klenova E (2005). Heightened expression of CTCF in breast cancer cells is associated with resistance to apoptosis. Cancer Research 65:5112-5122.

Donohoe ME, Zhang LF, Xu N, Shi Y, Lee JT (2007). Identification of a CTCF cofactor, Yy1, for the X chromosome binary switch. Molecular Cell 25:43-56.

Essien K, Vigneau S, Apreleva S, Singh L, Bartolomei M, Hannenhalli S (2009). CTCF binding site classes exhibit distinct evolutionary, genomic, epigenomic and transcriptomic features. Genome Biology 10:R131.

Fedoriw AM, Stein P, Svoboda P, Schultz RM, Bartolomei MS (2004). Transgenic RNAi reveals essential function for CTCF in H19 gene imprinting. Science 303:238-240.

Filippova GN, Fagerlie S, Klenova EM, Myers C, Dehner Y, Goodwin G, Neiman PE, Collins SJ, Lobanenkov VV (1996). An exceptionally conserved transcriptional repressor, CTCF, employs different combinations of zinc fingers to bind diverged promoter sequences of avian and mammalian c-myc oncogenes. Molecular and Cellular Biology 16:2802-13.

Filippova GN, Qi C-F, Ulmer JE, Moore JM, Ward MD, Hu YJ, Loukinov DI, Pugacheva EM, Klenova EM, Grundy PE, Feinberg AP, Cleton-Jansen A-M, Moerland EW, Cornelisse CJ, Suzuki H, Komiya A, Lindblom A, Dorion-Bonnet F, Neiman PE, Morse HC, Collins SJ, Lobanenkov VV (2002). Tumor-associated zinc finger mutations in the CTCF transcription factor selectively alter its DNA-binding specificity. Cancer Research 62:48-52.

Fiorentino FP, Giordano A (2012). The tumor suppressor role of CTCF. Journal of Cellular Physiology 227:479-92.

Fraser P, Bickmore W (2007). Nuclear organization of the genome and the potential for gene regulation. Nature 447:413-417.

Gaszner M, Felsenfeld G (2006). Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. Nature Reviews Genetics 7:703-713.

Handoko L, Xu H, Li G, Ngan CY, Chew E, Schnapp M, Lee CWH, Ye C, Ping JLH, Mulawadi F, Wong E, Sheng J, Zhang Y, Poh T, Chan CS, Kunarso G, Shahab A, Bourque G, Cacheux-Rataboul V, Sung W-K, Ruan Y, Wei C-L (2011). CTCF-mediated functional chromatin interactome in pluripotent cells. Nature Genetics 43:630-638.

Herold M, Bartkuhn M, Renkawitz R (2012). CTCF: insights into insulator function during development. Development 139:1045-1057.

Jothi R, Cuddapah S, Barski A, Cui K, Zhao K (2008). Genome-wide identification of in vivo protein–DNA binding sites from ChIP-Seq data. Nucleic Acids Research 36:5221-5231.

Kim TH, Abdullaev ZK, Smith AD, Ching KA, Loukinov DI, Green Roland D, Zhang MQ, Lobanenkov VV, Ren B (2007). Analysis of the vertebrate insulator protein CTCF-binding sites in the human genome. Cell 128:1231-1245.

Kornblihtt AR (2012). CTCF: from insulators to alternative splicing regulation. Cell Res 22:450-452.

Lobanenkov VV, Nicolas RH, Adler VV, Paterson H, Klenova EM, Polotskaja AV, Goodwin GH (1990). A novel sequence-specific DNA binding protein which interacts with three regularly spaced direct repeats of the CCCTC-motif in the 5'-flanking sequence of the chicken c-myc gene. Oncogene 5:1743-53.

Mohammadabadi MR, Amiri Roudbar M, Amiri Z, Momen M, Montazeri M (2013) Livestock Epigenetics. (In Press)

Moore JM, Rabaia NA, Smith LE, Fagerlie S, Gurley K, Loukinov D, Disteche CM, Collins SJ, Kemp CJ, Lobanenkov VV, Filippova GN (2012). Loss of maternal CTCF is associated with peri-implantation lethality of CTCF null embryos. PLoS ONE 7:e34915.

Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W (2005). Epigenetic reprogramming in mammals. Human Molecular Genetics 14:R47-R58.

Ohlsson R, Lobanenkov V, Klenova E (2010). Does CTCF mediate between nuclear organization and gene expression? Bioessays 32:37-50.

Ohlsson R, Renkawitz R, Lobanenkov V (2001). CTCF is a uniquely versatile transcription regulator linked to epigenetics and disease. Trends in Genetics 17:520-527.

Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008). Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. Nature Genetics 40:1413-5.

Pant V, Mariano P, Kanduri C, Mattsson A, Lobanenkov V, Heuchel R, Ohlsson R (2003). The nucleotides responsible for the direct physical contact between the chromatin insulator protein CTCF and the H19 imprinting control region manifest parent of origin-specific long-distance insulation and methylation-free domains. Genes & Development 17:586-590.

Payer B, Lee JT (2008). X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. Annual Review of Genetics 42:733-772.

Phillips JE, Corces VG (2009). CTCF: master weaver of the genome. Cell 137:1194-211.

Pugacheva EM, Tiwari VK, Abdullaev Z, Vostrov AA, Flanagan PT, Quitschke WW, Loukinov DI, Ohlsson R, Lobanenkov VV (2005). Familial cases of point mutations in the XIST promoter reveal a correlation between CTCF binding and pre-emptive choices of X chromosome inactivation. Human Molecular Genetics 14:953-65.

Recillas-Targa F, Pikaart MJ, Burgess-Beusse B, Bell AC, Litt MD, West AG, Gaszner M, Felsenfeld G (2002). Position-effect protection and enhancer blocking by the chicken β-globin insulator are separable activities. Proceedings of the National Academy of Sciences 99:6883-6888.

Shukla S, Kavak E, Gregory M, Imashimizu M, Shutinoski B, Kashlev M, Oberdoerffer P, Sandberg R, Oberdoerffer S (2011). CTCF-promoted RNA polymerase II pausing links DNA methylation to splicing. Nature 479:74-79.

Spilianakis CG, Lalioti MD, Town T, Lee GR, Flavell RA (2005). Interchromosomal associations between alternatively expressed loci. Nature 435:637-645.

Tazi J, Bakkour N, Stamm S (2009). Alternative splicing and disease. Biochimica et Biophysica Acta 1:14-26.

Torrano V, Chernukhin I, Docquier F, D'Arcy V, León J, Klenova E, Delgado MD (2005). CTCF regulates growth and erythroid differentiation of human myeloid leukemia cells. Journal of Biological Chemistry 280:28152-28161.

Vostrov AA, Quitschke WW (1997). The zinc finger protein CTCF binds to the APBβ domain of the amyloid β-protein precursor promoter. Journal of Biological Chemistry 272:33353-33359.

Wan L-B, Pan H, Hannenhalli S, Cheng Y, Ma J, Fedoriw A, Lobanenkov V, Latham KE, Schultz RM, Bartolomei MS (2008). Maternal depletion of CTCF reveals multiple functions during oocyte and preimplantation embryo development. Development 135:2729-2738.

Wrenzycki C, Herrmann D, Lucas-Hahn A, Korsawe K, Lemme E, Niemann H (2005). Messenger RNA expression patterns in bovine embryos derived from in vitro procedures and their implications for development. Reproduction, Fertility and Development 17:23-35.

Xu N, Donohoe ME, Silva SS, Lee JT (2007). Evidence that homologous X-chromosome pairing requires transcription and Ctcf protein. Nature Genetics 39:1390-6.

Zahmatkesh A, Amiri Roudbar M, Joupari MD (2013) A comparative study of EGF effects on in vitro bovine embryo development in monoculture and sequential media. Turkish Journal of Biology 37:670-674.

CTCF binding protein and epigenetic regulations of genome

Mohammadabadi M.R.[*1], Amiri Roudbar M.[2], Adeldoost H.[3]

[1] Associate professor of Animal Science Department, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[2] Ph.D. Student of Animal Science Department, Shahid Bahonar University of Kerman, Iran.
[2] Ph.D. Student of Animal Science Department, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran.

Abstract

CTCF is a highly conserved DNA-binding protein involved in transcription regulation, chromatin insulation, genomic imprinting, X-chromosome inactivation, higher-order chromatin organization, and alternative splicing. These multifunctional properties of CTCF suggest an essential role in development and disease. CTCF is unique protein that known to mediate insulation function in vertebrates. Recent studies proposed that CTCF can be a heritable component in epigenetic and regulating the interaction between DNA methylation, higher-order chromatin structure, and developmentally regulated gene expression. In this review, we discuss roles of CTCF in these critical aspects of genome regulation. All information indicates that CTCF can emerge as a master weaver of the mammalian genome.

Keywords: *CTCF, Epigenetic, Chromosome X inactivation, Insulator, Cancer.*

[*] Corresponding Author: Mohammadabadi M.R. Tel: 09133987534 Email:mmohammadabadi@yahoo.ca