

Construction of Recombinant Lentiviral Vector Containing shRNA against Mouse Fndc5 Gene in Order to Transduce Mouse Embryonic Stem Cells

Shima Nazem¹, Kamran Ghaedi², Sadegh Babashah³, Majid Sadeghizadeh^{4*},
Mohammad Hossein Nasr Esfahani^{5**}

- 1- Ph.D. Candidate, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 2- Associate Professor of Molecular Genetics, Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Isfahan, and Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
- 3- Assistant Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 4- Professor, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
- 5- Professor, Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran

*Corresponding Address: Postal Code: 1411713116, Department of Molecular Genetics, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
Email: sadeghma@modares.ac.ir

**Corresponding Address: Postal Code: 8165131378, Department of Cellular Biotechnology, Cell Science Research Center, Royan Institute for Biotechnology, ACECR, Isfahan, Iran
Email: mh_nasr@royaninstitute.org

Received: 09/Sep/2016, Accepted: 29/Nov/2016

Abstract

Objective: RNA interference (RNAi) is considered a potential approach to knock down target genes and their functional assessment. Lentiviral vectors serve as an efficient tool to transduce foreign genes in a wide variety of mammalian cells. Fibronectin type I domain-containing 5 (Fndc5) is a glycosylated membrane protein whose transcript levels increase during neural and cardiac differentiation of mouse embryonic stem cells (mESCs). Here, we report the efficacy of Fndc5 gene silencing in mESCs using lentiviral vectors that express shRNA.

Methods: Two distinct shRNA sequences that targeted Fndc5 coding sequence (CDS) and one scramble shRNA sequence as a negative control were designed and commercially synthesized. Synthetic shRNA oligonucleotides were cloned into a lentiviral inducible vector after annealing downstream of the tetracycline inducible H1 promoter. The recombinant lentiviral vector was packaged in HEK293T cells, then mESCs were transduced by lentiviral particles. Expression of shRNA in transduced cell lines was induced by doxycycline treatment for 48 h.

Results: Evaluation of transcript levels of Fndc5 by real-time PCR showed a significant decrease in transduced cells by a mixture of two shRNAs.

Conclusion: Taken together, lentiviral-mediated RNAi that targeted the Fndc5 gene could be considered an efficient tool to silence gene expression in the transduced cell line to study the function of Fndc5.

Keywords: Fndc5, shRNA, Lentiviral vectors, RNAi

Pathobiology Research, Vol. 19 (2016-2017), No.2, Pages: 59-73

ساخت حامل ویروسی نو ترکیب ناقل RNA کوتاه سنجاق سری اختصاصی علیه ژن Fndc5 موشی برای انتقال به سلول‌های بنیادی جنینی

شیما ناظم^۱، کامران قاندي^۲، صادق باباشاه^۳، مجید صادقی زاده^{۴*}، محمدحسین نصر اصفهانی^{۵**}

- ۱- دانشجوی دکتری تخصصی، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۲- دانشیار، دانشکده علوم دانشگاه اصفهان و گروه زیست فناوری سلولی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران
- ۳- استادیار، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۴- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده علوم زیستی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- ۵- استاد مرکز تحقیقات علوم سلولی، پژوهشکده زیست فناوری جهاد دانشگاهی، پژوهشگاه رویان، اصفهان، ایران

*آدرس نویسنده مسئول: ایران، تهران، کدپستی: ۱۴۱۱۷۱۳۱۱۶، دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک
Email: sadeghma@modares.ac.ir

**آدرس نویسنده مسئول: ایران، اصفهان، کدپستی: ۸۱۶۵۱۳۱۳۷۸، خوراسگان، خیابان سلمان، خیابان رویان، پژوهشکده زیست فناوری رویان
Email: mh_nasr@royaninstitute.org

پذیرش مقاله: ۹۵/۰۹/۰۹

دریافت مقاله: ۹۵/۰۶/۱۹

چکیده

هدف: RNA مداخله گر یک مکانیسم کارآمد در کاهش بیان ژن‌ها و تعیین عملکرد ژن‌ها است. ناقل‌های لنتی ویروسی ابزارهای مناسبی برای انتقال ژن‌های خارجی به طیف گسترده‌ای از سلول‌های پستانداران است. پروتئین Fndc5 یک پروتئین گلیکوزیل غشایی است که بیان آن طی روند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موشی افزایش می‌یابد. در این مطالعه قابلیت کاهش بیان ژن Fndc5 در سلول‌های بنیادی جنینی موشی با استفاده از ناقل‌های لنتی ویروسی بیان کننده RNA کوتاه سنجاق سری بررسی شد.

مواد و روش‌ها: به این منظور دو توالی مشخص RNA کوتاه سنجاق سری علیه ناحیه کد کننده رونوشت Fndc5 و یک توالی RNA کوتاه سنجاق سری کنترل به عنوان کنترل منفی طراحی و سنتز شد. قطعات RNA کوتاه سنجاق سری سنتزی پس از دورگه شدن درون ناقل لنتی ویروسی در پایین دست پروموتور H1 القا شوند توسط ترانسایکلین کلون شد. ناقل لنتی ویروس نو ترکیب درون سلول‌های HEK293T بسته‌بندی شد و سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط ذرات ویروسی ترانسداکت شدند. بیان RNA کوتاه سنجاق سری در سلول‌های ترانسداکت شده توسط ۴۸ ساعت تیمار با داکسیسایکلین القا شد.

نتایج: سنجش میزان بیان رونوشت Fndc5 توسط Real-time PCR در سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس‌های نو ترکیب حامل هر دو RNA کوتاه سنجاق سری، کاهش بیان معنی‌داری را نسبت به گروه کنترل نشان داد. **نتیجه‌گیری:** در مجموع هدف قرار دادن ژن Fndc5 از طریق مکانیسم RNA مداخله گر می‌تواند به عنوان یک ابزار کارآمد در کاهش بیان این ژن در رده سلولی ترانسداکت شده به منظور بررسی عملکرد Fndc5 مورد توجه قرار بگیرد.

کلیدواژگان: Fndc5، RNA کوتاه سنجاق سری، ناقل‌های لنتی ویروسی، RNA مداخله گر

پژوهش‌های آسیب شناسی زیستی، دوره ۱۹، شماره ۲، تابستان ۱۳۹۵، صفحات: ۷۳-۵۹

مقدمه

RNA مداخله گر (RNA interference: RNAi) یک مکانیسم سلولی برای تنظیم بیان ژن‌ها و کنترل رشد و نمو

کردن سلول‌هایی است که قابلیت تقسیم شدن را ندارند و می‌توانند بیان ژن را داخل سلول به مدت طولانی حفظ کنند [۸]. به منظور افزایش ایمنی کار با لنتی ویروس‌ها، نسل دوم و سوم از حامل‌های ویروسی ایجاد شدند که در آن‌ها اجزای تشکیل دهنده ویروس در چندین حامل به جای یک حامل توزیع شده‌اند [۱۰، ۱۱].

سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem Cells: ESCs) سلول‌های پرتوانی هستند که از لایه سلولی داخلی بلاستوسیست (Inner Cell Mass: ICM) مشتق می‌شوند و قابلیت تمایز به هر سه لایه سلولی جنینی اندودرمی (سلول‌های کبدی و پانکراس)، مزودرمی (سلول‌های قلبی، ماهیچه‌ای و خونی) و اکتودرمی (سلول‌های عصبی) را دارا هستند [۱۲]. به منظور بررسی نقش ژن‌ها در هر کدام از این فرآیندهای تمایزی می‌توان با به کارگیری مکانیسم RNAi بیان ژن هدف را در این سلول‌ها کاهش داد و از طریق تمایز لاین سلولی به دست آمده به هر کدام از این رده‌های سلولی به بررسی نقش ژن مذکور در این فرآیندها پرداخت.

پروتئین Fndc5 یک پروتئین گلیکوزیله غشایی است که در بافت قلب، مغز و ماهیچه اسکلتی در موش بیان بالا دارد. این پروتئین در سطح سلول توسط یک پروتئاز ناشناخته شکسته می‌شود و به صورت یک هورمون پپتیدی به نام irisin وارد جریان خون می‌شود و نقش مهمی را در تنظیم متابولیسم بدن ایفا می‌کند [۱۳]. مطالعات قبلی نشان داده است که بیان ژن Fndc5 طی روند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موشی افزایش می‌یابد [۱۴، ۱۵]. با توجه به این که کاهش بیان ژن‌ها یکی از مهم‌ترین راه‌ها در بررسی نقش ژن‌ها در مسیرهای مولکولی است [۶]، بنابراین در این مطالعه به منظور بررسی بیشتر نقش ژن Fndc5 در روند تمایز، shRNA اختصاصی علیه رونوشت این ژن در حامل لنتی ویروسی نسل دوم کلون می‌شود و سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط ویروس‌های حامل نوترکیب حاصل ترانسداکت می‌شود و در نهایت بیان ژن هدف در سطح mRNA بررسی می‌شود.

سلولی در مرحله پس از نسخه‌برداری است. این پدیده توسط مولکول‌های RNA مداخله‌گر کوچک [Small (or short) interfering RNA: siRNA] واسطه‌گری می‌شود و از لحاظ تکاملی در میان موجودات یوکاریوت حفظ شده است. فعال شدن مسیرهای RNAi در داخل سلول توسط قطعات کوچک RNA دو رشته‌ای (double-stranded RNA: dsRNA) صورت می‌گیرد که یا به صورت صناعی وارد سلول می‌شود یا توسط پروموتورهای داخل سلولی از روی ژنوم سلول رونویسی می‌شود و باعث کاهش بیان ژن هدف به صورت اختصاصی و مؤثر می‌شود. RNA دو رشته‌ای در داخل سیتوپلاسم توسط آنزیم دایسر (Dicer) به قطعات کوچک‌تر ۲۵-۳۰ نوکلئوتیدی به نام siRNA شکسته می‌شود و siRNA با اتصال به کمپلکس RISC (RNA-Induced Silencing Complex) تک رشته‌ای شده و به mRNA ژن هدف متصل می‌شود و سبب کاهش میزان ترجمه توسط تخریب mRNA یا مهار ترجمه می‌شود [۱، ۲]. تاکنون با به کارگیری مکانیسم RNAi در مدل‌های سلولی مطالعات متعددی در زمینه بروز سرطان، بیماری‌های عفونی و اختلالات سیستم قلبی و دستگاه عصبی انجام شده است [۳-۵].

یکی از روش‌های بررسی عملکرد ژن‌ها در فرآیندهای مختلف سلولی کاهش بیان ژن با به کارگیری مکانیسم RNAi است. بدین منظور توالی نوکلئوتیدی کد کننده dsRNA که اصطلاحاً به آن RNA سنجاق سری کوتاه (small hairpin RNA; shRNA) گفته می‌شود، به صورت مکمل با ژن هدف طراحی می‌شود و با قرار دادن در حامل‌های بیانی مناسب به داخل سلول انتقال داده می‌شود [۶، ۷].

ابزارهای متعددی برای انتقال ژن‌ها به داخل سلول‌ها وجود دارد. یکی از راه‌های کارآمد انتقال ژن‌ها به داخل سلول استفاده از ویروس‌ها و خصوصاً لنتی ویروس‌ها (Lentivirus) است. لنتی ویروس‌ها به عنوان ابزار تحقیقاتی قدرتمند برای وارد کردن یک ژن خارجی در سیستم‌های In vitro و In vivo به کار می‌روند. از جمله محاسن حامل‌های لنتی ویروسی آلوده

مواد و روش‌ها

این پژوهش دارای مجوز تأیید کمیته اخلاق پزشکی پژوهشگاه رویان با شماره نامه EC/۹۳/۱۱۲۷ است.

حامل‌های ویروسی

در این مطالعه از حامل‌های ویروسی pLVTHM و pMD2G pLVPT-tTR-KRAB حامل پوششی، حامل پوششی pMD2G و حامل بسته‌بندی psPAX2 که همگی از حامل‌های لنتی ویروسی نسل دوم هستند، استفاده شد. در حامل pLVPT-tTR-KRAB مورد استفاده، ژن گزارشگر GFP (Green Fluorescent Protein) با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Blasticidin جایگزین شد. تمامی حامل‌ها مربوط به شرکت Addgene (آمریکا) (<https://www.addgene.org>) بود که به صورت هدیه از پژوهشکده زیست فناوری پژوهشگاه رویان دریافت شد.

طراحی توالی siRNA و رشته‌های shRNA

به منظور به دست آوردن توالی‌های siRNA علیه رونوشت Fndc5 موشی (شماره دستیابی: 4. NM_027402) از سایت

Sigma Aldrich (<https://www.sigmaaldrich.com>) پیش از این در مطالعه‌ای توسط اسپیکلمن (Spiegelman) و همکاران به کار برده شده بود، استفاده شد [۱۶]. توالی‌های siRNA به دست آمده در پایگاه NCBI بلاست (Blast) شدند تا از اختصاصی بودن توالی برای ژن Fndc5 اطمینان حاصل شود. همچنین با استفاده از نرم‌افزار آنالیز mfold ساختار ثانویه رونوشت Fndc5 ترسیم شد تا siRNA ای که نواحی تک رشته و بدون ساختار ثانویه از رونوشت Fndc5 را هدف قرار می‌داد، انتخاب شود.

رشته‌های shRNA به صورت دو رشته‌ای تعبیه شدند که مکمل هم هستند و در هر رشته بین توالی‌های سنس (sense) و آنتی سنس (antisense) یک لوپ ۹ نوکلئوتیدی طراحی شد. در نهایت دو siRNA علیه رونوشت Fndc5 و یک siRNA کنترل (Scramble) از پایگاه Sigma انتخاب و در الگوی ارایه شده در سایت Addgene به منظور طراحی shRNA و همسانه‌سازی در حامل بیانی pLVTHM قرار داده شد. همچنین به منظور تأیید انجام همسانه‌سازی در مراحل بعدی، جایگاه برش منفرد آنزیم BstZ171 در انتهای توالی shRNA تعبیه شد. توالی shRNA سنتزی در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱ توالی‌های shRNA سنتزی

نام	<i>BstZ171</i>	<i>ClaI</i>	<i>antisense</i>	loop	<i>sense</i>	<i>MluI</i>
shRNA1	3'	CGCGTCCCCGCTCTCTCTGCGCCAGTATTCAAGAGAA	TACTGCGCGCAGAAAGAGAGCTTTTGGGAAGTATACAT	5'	CGCGTCCCCGCTCTCTCTGCGCCAGTATTCAAGAGAA	3'
shRNA2	3'	CGCGTCCCCGAGCCCAATAACAACAAGGA	TTCAAGAGATCCTTGTGTTATTTGGGCTCGTTTGGGAAGTATACAT	5'	CGCGTCCCCGAGCCCAATAACAACAAGGA	3'
Scramble	3'	CGCGTCCCCGACCATCAATATGACTAGATTCAAGAGATCTAGTCATATTTGATGGTC	TTTTTGGGAAGTATACAT	5'	CGCGTCCCCGACCATCAATATGACTAGATTCAAGAGATCTAGTCATATTTGATGGTC	3'

دورگه‌سازی رشته‌های shRNA

برای انجام دورگه‌سازی (Hybridization) قطعات shRNA سفارش داده شده، رشته بالایی و پایینی هر shRNA با غلظت‌های یکسان ۲ میکرومولار با یکدیگر مخلوط شدند و به مدت ۴ دقیقه در دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳ دقیقه در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و ۳۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد

قرار داده شد. به منظور تأیید انجام دورگه‌سازی از الکتروفورز روی ژل آگارز ۲ درصد استفاده شد.

کاهش اندازه حامل pLVTHM

به منظور سهولت در انجام واکنش اتصال بین حامل و قطعات shRNA، با بررسی نقشه حامل، هضم حامل توسط

را تنها برای باکتری‌هایی فراهم می‌کند که پلاسمید نوترکیب حامل ژن مقاومت به آمپی‌سیلین را دریافت کرده‌اند.

کلونی PCR، برش آنزیمی و تعیین توالی

پس از کشت ۱۶ ساعته باکتری‌های نوترکیب، تعدادی از کلونی‌های منفرد روی پلیت آمپی‌سیلین جدید کشت و شماره‌گذاری شدند. به‌منظور تأیید همسانه‌سازی سازه‌های تولید شده، از روش کلونی PCR با آغازگرهای (Primers) طراحی شده روی shRNA و بدنه حامل استفاده شد. به این منظور قسمتی از کلونی باکتری‌های شماره‌گذاری شده به‌عنوان الگو برای واکنش PCR استفاده شد و محصول PCR روی ژل آگارز الکتروفورز شد. کلونی‌های مثبت در محیط مایع (Lysogeny broth: LB) حاوی آمپی‌سیلین به‌صورت شبانه کشت داده شدند و توسط کیت miniprep (Qiagen) آلمان استخراج پلاسمید شدند. هضم آنزیمی پلاسمیدها با آنزیم BstZ17I (Thermoscientific، آمریکا) برای تأیید همسانه‌سازی انجام شد و پلاسمید مثبت برای تعیین توالی به شرکت Macro Gen (کره جنوبی) ارسال شد.

همسانه‌سازی مجدد قطعه ژنی Tet response element- H1promoter- shRNA-ampicilin resistance در حامل لتی ویروسی pLVPT-tTR-KRAB

با توجه به این که حامل هدف اصلی در این مطالعه حامل pLVPT-tTR-KRAB بود، بنابراین سازه pLVTHM* حاوی shRNA توسط آنزیم‌های MscI و FspI (Thermoscientific، آمریکا) هضم شد و قطعه ۲ کیلوبازی حاوی shRNA درون حامل هدف اصلی tTR-KRAB-pLVPT (هضم شده با آنزیم‌های MscI و FspI) توسط آنزیم لیگاز کلون شد. تأیید همسانه‌سازی توسط کلونی PCR و هضم آنزیمی BstZ17I به روش ذکر شده انجام شد.

آنزیم AgeI (Thermoscientific، آمریکا) صورت پذیرفت و قطعه ۶ کیلوبازی حاصل از برش پس از استخراج از ژل آگارز و حلقوی شدن توسط آنزیم لیگاز (Thermoscientific، آمریکا) به‌عنوان حامل جدید pLVTHM و تحت نام pLVTHM* استفاده شد.

همسانه‌سازی قطعات shRNA درون حامل pLVTHM*

به‌منظور ساخت حامل هدف حاوی قطعات shRNA ابتدا حامل pLVTHM* با آنزیم‌های MluI و ClaI (Thermoscientific، آمریکا) مطابق دستورالعمل آنزیم هضم شد. واکنش اتصال قطعات shRNA دورگه شده در پایین دست پروموتور القایی H1 توسط آنزیم لیگاز به‌صورت شبانه در دمای ۱۶ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

ترانسفورماسیون باکتری اشریشیا کلی توسط حامل‌های نوترکیب

باکتری مستعد (Competent cell) از سویه DH5α باکتری اشریشیا کلی (*Escherichia coli*) به روش کلرید کلسیم تهیه شد. به‌منظور انتقال پلاسمید نوترکیب به درون باکتری، محصول واکنش اتصال به باکتری مستعد افزوده شد و به‌مدت ۳۰ دقیقه روی یخ قرار داده شد. سپس مخلوط فوق در دمای ۴۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۹۰ ثانیه شوک حرارتی داده شد و بلافاصله روی یخ منتقل شد. سپس مقدار ۲۰۰ میکرولیتر محیط غنی از گلوکز SOC (Super Optimal broth with Catabolite Repression) افزوده و به‌مدت ۹۰ دقیقه در انکوباتور لرزاننده در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. پس از دریافت پلاسمید نوترکیب، باکتری‌ها روی پلیت آگار حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین (Ampicillin) به‌مدت ۱۶ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد کشت داده شدند. محیط کشت حاوی آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین امکان رشد

کشت رده‌های سلولی

رده سلولی HEK293T (بانک سلولی پژوهشگاه رویان، RSCB) در محیط کشت DMEM high Glucose حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Fetal Bovine Serum: FBS) (Gibco، آمریکا)، ۱ درصد آمینواسیدهای غیر ضروری (NEAA) (Gibco، آمریکا) ۱ درصد ال-گلوتامین (L-Glu) (Gibco، آمریکا) و ۱ درصد آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین - استرپتومایسین (Penicillin/Streptomycin: pen/strep) (Gibco، آمریکا) در انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و غلظت ۵ درصد دی‌اکسید کربن نگهداری شدند. همچنین سلول‌های بنیادی جنینی موشی به‌دست آمده از بانک سلولی پژوهشگاه رویان، Royan B20 (RB20) در محیط کشت حاوی ۴۵ درصد DMEM F12 (Gibco، آمریکا) ۴۵ درصد Neurobasal (Gibco، آمریکا) ۴ درصد BSA (Bovine serum albumin) (Sigma، آمریکا)، ۱ درصد NEAA، ۱ درصد L-Glu، ۱ درصد pen/strep، ۱ درصد B27 (Gibco، آمریکا) ۰/۱ درصد ریزمولکول SB (Sigma، آمریکا)، ۰/۰۱ درصد ریزمولکول PD (Sigma، آمریکا) و ۰/۱ LIF (Leukemia Inhibitory Factor) (Chemicon، آمریکا) کشت داده شد.

ترانسفکشن سلول‌های HEK293T

سلول‌های HEK293T ۲۴ ساعت قبل از ترانسفکشن با تراکم ۷۰ درصد در پلیت‌های پوشیده شده با ژلاتین ۰/۱ درصد کشت داده شدند. ترانسفکشن سلول‌ها با حامل‌های ویروسی pMD2G، psPAX2 و حامل هدف نوترکیب tTR-KRAB-LVPT به‌صورت همزمان توسط لیپوفکتامین LTX (Thermo Fisher Scientific) (Lipofectamine LTX) (آمریکا) انجام شد. محیط کشت سلول‌ها ۶ ساعت پس از ترانسفکشن تعویض شد. همچنین به‌منظور تعیین درصد ترانسفکشن در گروه کنترل از حامل هدف pWPXLD که

حاوی ژن گزارشگر GFP بود استفاده شد و درصد سلول‌های ترانسفکت شده توسط فلوسایتمتری تعیین شد.

تغلیظ ذرات ویروسی و تعیین تیتراسیون

ویروس

۴۸ ساعت و ۶۰ ساعت پس از ترانسفکشن محیط رویی سلول‌ها که حاوی ذرات ویروسی بود جداسازی و به‌مدت ۱۵۰ دقیقه با سرعت ۲۴۰۰۰ دور در دقیقه اولتراسانتریفوژ شد. رسوب ویروسی در محیط کشت اختصاصی سلول‌های RB20 حل شد و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد. به‌منظور تعیین تیترو ویروس‌های تولید و تغلیظ شده، سلول‌های HEK293T با رقت‌های مختلف از ویروس آلوده شد و درصد سلول‌های بیان‌کننده پروتئین GFP توسط فلوسایتمتری اندازه‌گیری شد. در نهایت ترانسداکشن سلولی با ضریب آلودگی (MOI) ۱۰ انجام شد.

ترانسداکشن سلول‌ها و تیمار آنتی‌بیوتیک

محیط کشت سلول‌های RB20 با محیط حاوی ذرات ویروسی تغلیظ شده تعویض شد. به‌منظور تعیین درصد ترانسداکشن، سلول‌های RB20 توسط ویروس‌های تغلیظ شده حاوی حامل pWPXLD آلوده شدند و ۲۴ ساعت بعد درصد سلول‌های GFP مثبت توسط فلوسایتمتری تعیین شد. ۴۸ ساعت پس از ترانسداکشن، تیمار سلول‌ها با غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک Blasticidin (Invitrogen، آمریکا) آغاز شد.

استخراج ژنوم از سلول‌های ترانسداکت شده و

بررسی ورود shRNA به داخل ژنوم

از رده سلولی به‌دست آمده پس از پاساژهای مکرر به‌منظور بررسی ورود shRNA به داخل ژنوم، استخراج DNA توسط کیت Qiagen (آلمان) انجام شد. سپس با استفاده از

آغازگرهای مربوط به shRNA وارد شدن توالی حامل در درون ژنوم سلول توسط PCR بررسی شد. آغازگرهای مربوط به shRNA وارد شدن توالی حامل در درون ژنوم سلول توسط PCR بررسی شد. آغازگرهای مربوط به shRNA وارد شدن توالی حامل در درون ژنوم سلول توسط PCR بررسی شد.

آغازگرهای مربوط به shRNA وارد شدن توالی حامل در درون ژنوم سلول توسط PCR بررسی شد.

استخراج RNA، سنتز cDNA و بررسی تغییرات بیان ژن Fndc5

به منظور بررسی تغییرات بیان ژن Fndc5، سلول‌ها به مدت ۴۸ ساعت تحت تیمار با القاکننده داکسی سایکلین (Doxycycline) قرار گرفتند. پس از آن RNA تام سلولی توسط کیت RNeasy mini kit (آلمان، Qiagen) استخراج شد و غلظت RNA توسط دستگاه نانودراپ (Thermoscientific، آمریکا) ارزیابی شد. مقادیر مساوی از RNA (یک میکروگرم) توسط آنزیم DNaseI (Thermoscientific، آمریکا) عاری از DNA شد و سنتز cDNA توسط کیت cDNA synthesis (Thermoscientific، آمریکا) مطابق دستورالعمل انجام شد. به منظور بررسی میزان مهار ژن Fndc5 از کیت

طراحی آغازگرها

آغازگرهای جلوپی (Forward) و برگشتی (Reverse) به منظور بررسی کلونی‌های نو ترکیب، یکی روی shRNA و دیگری روی بدنه حامل توسط نرم افزار Oligo 6 طراحی شد. همچنین توالی آغازگرهای مربوط به واکنش Real-time PCR (Fndc5، Gapdh) توسط نرم افزار AllelID طراحی شد. توالی آغازگرها و طول محصولات در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲ توالی آغازگرها و طول محصولات PCR

نام آغازگر	آغازگر جلوپی (Forward)	آغازگر برگشتی (Reverse)	طول محصول (جفت باز)
shRNA1	5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3'	5'-TGCCGCCAGTATTCTCTTG-3'	۱۳۰
shRNA2	5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3'	5'-CCAATAACAACAAGGATCTCTTGAA-3'	۱۳۴
Scramble	5'-TCGCTATGTGTTCTGGGAAA-3'	5'-CTAGTCATATTGATGGTCGG-3'	۱۰۷
Gapdh	5'-GCCGCCTGGAGAAACC-3'	5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'	۱۲۱
Fndc5	5'-TCATTGTTGTGGTCCTCTTC-3'	5'-TGAAGTCGCAGGAGACAACC-3'	۸۱

نتایج

نتایج مربوط به کاهش اندازه حامل pLVTHM

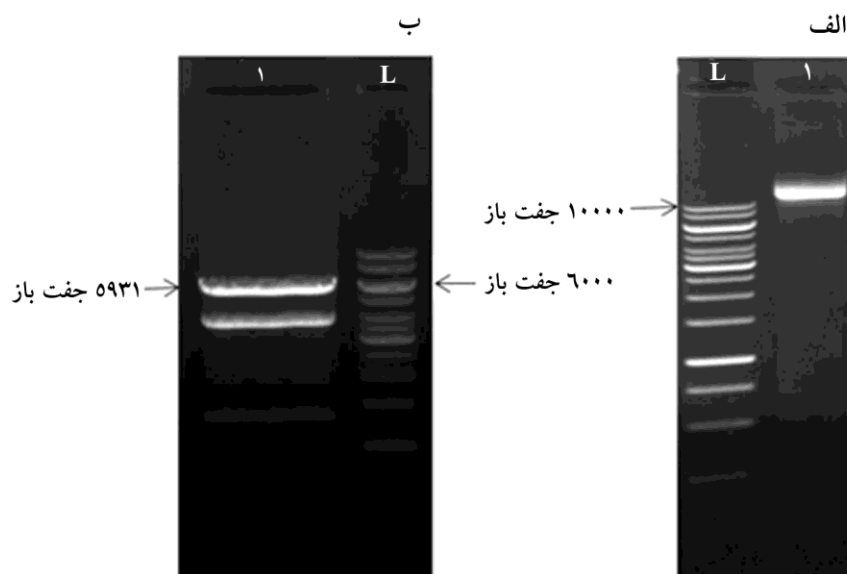
با توجه به این که اختلاف اندازه حامل pLVTHM (۱۱۶۴۰ جفت باز) و قطعات سنتزی shRNA (حدود ۸۰ جفت باز) زیاد بود، این امر وارد شدن قطعه به حامل را بسیار دشوار نموده بود. بنابراین با بررسی نقشه حامل و با حفظ قسمت‌های مورد نیاز، آنزیم AgeI برای هضم حامل انتخاب شد. قطعات حاصل از

برش حامل روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و قطعه حامل مورد نظر که اندازه حدود ۶ کیلوباز داشت توسط کیت Qiagen (آلمان) از ژل استخراج شد و مجدداً توسط آنزیم لیگاز T4 حلقوی شد (شکل ۱). نقشه حامل جدید pLVTHM (pLVTHM*) در شکل ۲ آمده است.

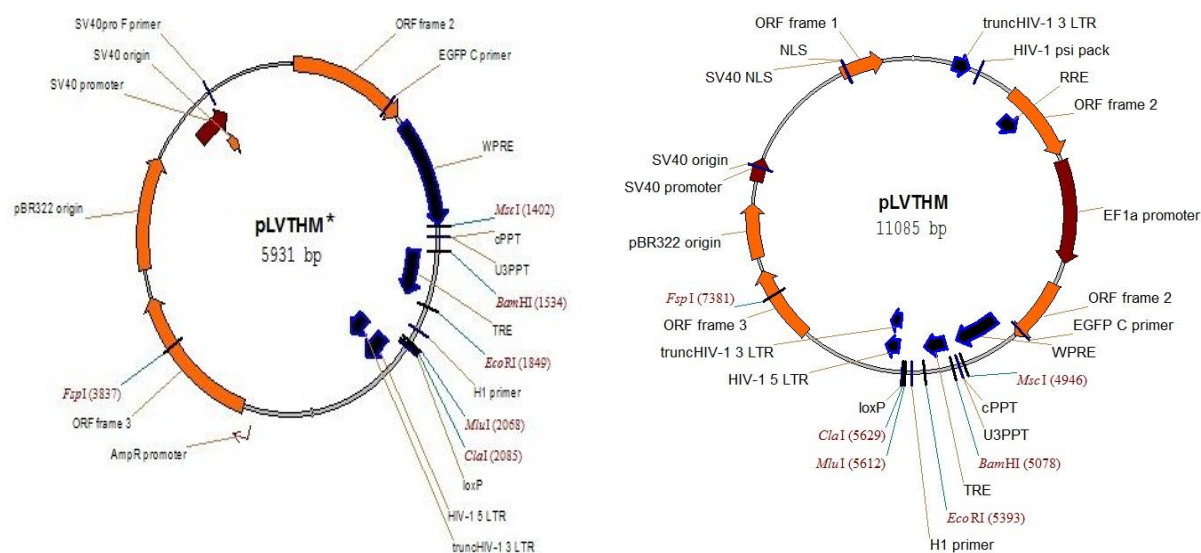
دورگه سازی رشته‌های shRNA در برنامه دمایی ذکر شده انجام شد. به منظور حصول اطمینان از دورگه شدن رشته‌های

shRNA دورگه شده به علت دو رشته‌ای بودن روی ژل بالاتر از shRNA تک رشته‌ای قرار می‌گیرد (شکل ۳).

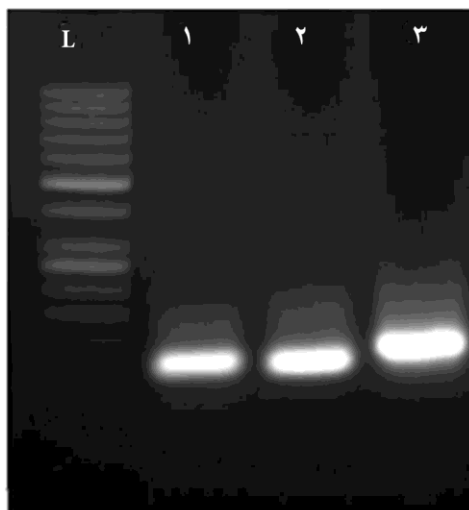
بالایی و پایینی shRNA هر کدام از رشته‌ها به تنهایی و نیز محصول دورگه‌سازی، روی ژل ۲ درصد آگارز الکتروفورز شد.



شکل ۱ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل pLVTHM توسط آنزیم AgeI؛ (الف) حامل pLVTHM هضم نشده، (ب) حامل pLVTHM هضم شده با آنزیم AgeI، باند ۵۹۳۱ بازی از ژل تخلیص و به عنوان حامل جدید استفاده شد. L: نشانگر DNA با اندازه ۱ کیلوباز

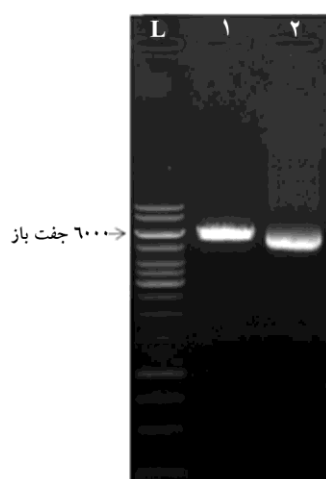


شکل ۲ نقشه حامل‌های pLVTHM* و pLVTHM ترسیم شده با نرم‌افزار Vector NTI؛ اندازه حامل pLVTHM از ۱۱ کیلوباز به ۶ کیلو باز در pLVTHM* کاهش یافت. shRNA در بین دو جایگاه برشی MluI و ClaI کلون شد.



شکل ۳ الکتروفورز قطعات shRNA سنتزی تک رشته و دورگه شده روی ژل آگارز ۲ درصد؛ ستون (۱) رشته بالایی shRNA، ستون (۲) رشته پایینی shRNA، ستون (۳) رشته بالایی و پایینی shRNA پس از دورگه شدن؛ L: نشانگر DNA اندازه ۱۰۰ جفت باز

H1 از حامل pLVTHM* توسط هضم آنزیمی جداسازی و درون حامل pLVPT-tTR-KRAB که واجد توالی TetR بود، کلون شد. در نهایت کلونی‌های حاوی حامل نو ترکیب pLVPT-tTR-KRAB توسط کلونی PCR شناسایی و توسط برش با آنزیم BstZ17I تأیید شدند (شکل ۶ ب).



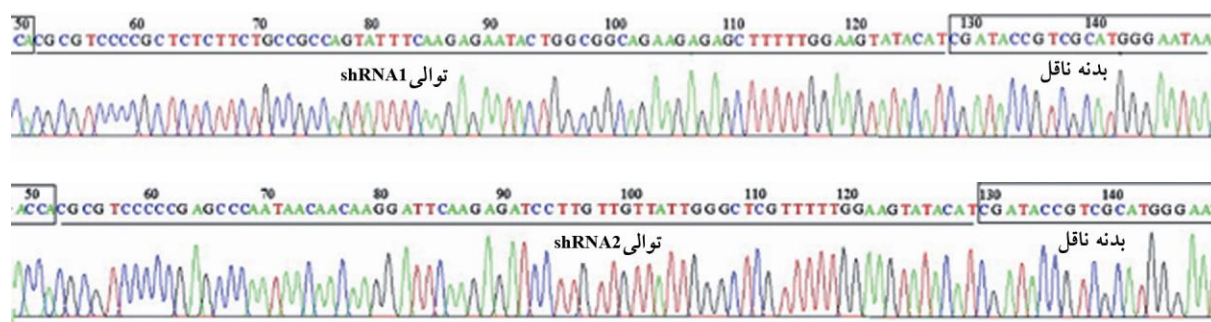
شکل ۴ الکتروفورز محصول هضم آنزیمی حامل نو ترکیب pLVTHM* با آنزیم BstZ17I؛ ستون (۱) حامل نو ترکیب هضم شده خطی؛ ستون (۲) حامل نو ترکیب هضم نشده؛ L: نشانگر DNA اندازه ۱ کیلوباز

نتایج ترانسفورماسیون باکتری‌ها با حامل نو ترکیب

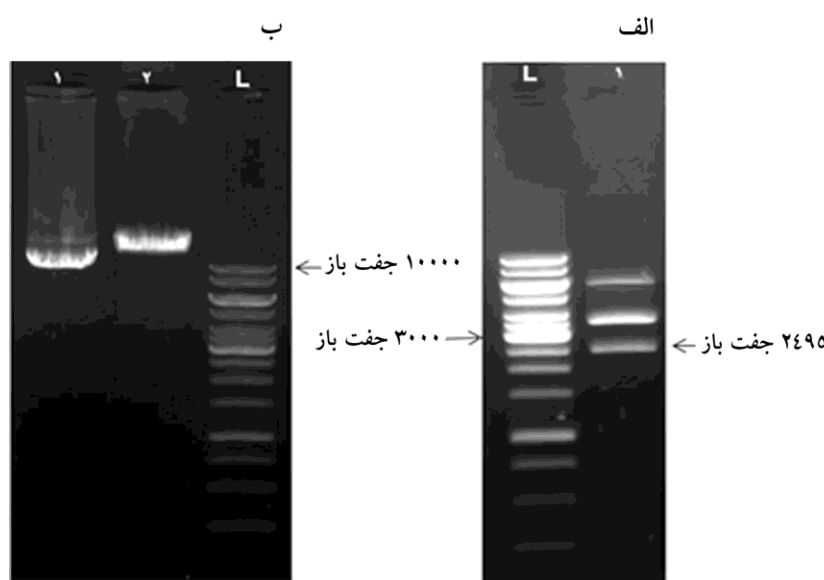
pLVTHM و pLVPT-tTR-KRAB

پس از انجام دورگه‌سازی قطعات shRNA و هضم آنزیمی حامل pLVTHM*، واکنش اتصال میان قطعات shRNA دورگه شده و حامل هضم شده انجام گرفت و باکتری‌های DH5α مستعد با محصول واکنش اتصال ترانسفورم شدند. با انجام کلونی PCR روی چند ده مورد از کلونی‌های رشد یافته مجزا روی محیط کشت حاوی آمپی‌سیلین، کلونی‌های حاوی حامل نو ترکیب انتخاب شدند. تأیید کلونی نو ترکیب (جواب مثبت در کلونی PCR) توسط هضم با آنزیم BstZ17I (شکل ۴) همچنین تعیین توالی (شکل ۵) انجام شد.

حامل نو ترکیب pLVTHM* توسط آنزیم‌های FspI و MscI هضم شد و روی ژل آگارز ۱ درصد الکتروفورز شد و قطعه ۲۴۹۵ جفت بازی (حاوی shRNA کلون شده در پایین دست پروموتور H1) از ژل استخراج شد (شکل ۶ الف). با توجه به این که حامل pLVTHM* فاقد توالی TetR به منظور القایی نمودن پروموتور H1 بود، بنابراین قطعه حاوی shRNA-



شکل ۵ بخشی از گراف حاصل از توالی‌یابی حامل نوترکیب pLVTHM* حامل قطعات shRNA1 و shRNA2



شکل ۶ الف) هضم آنزیمی حامل pLVTHM* نوترکیب حامل shRNA و جداسازی قطعه ۲۴۹۵ جفت بازی به منظور همسانه‌سازی مجدد در حامل KRAB-tTR-pLVPT؛ ب) هضم آنزیمی حامل نوترکیب KRAB-tTR-pLVPT توسط آنزیم BstZ17I به منظور تأیید همسانه‌سازی ستون (۱) حامل نوترکیب هضم شده، ستون (۲) حامل نوترکیب هضم نشده؛ (L) نشانگر DNA با اندازه ۱ کیلو باز

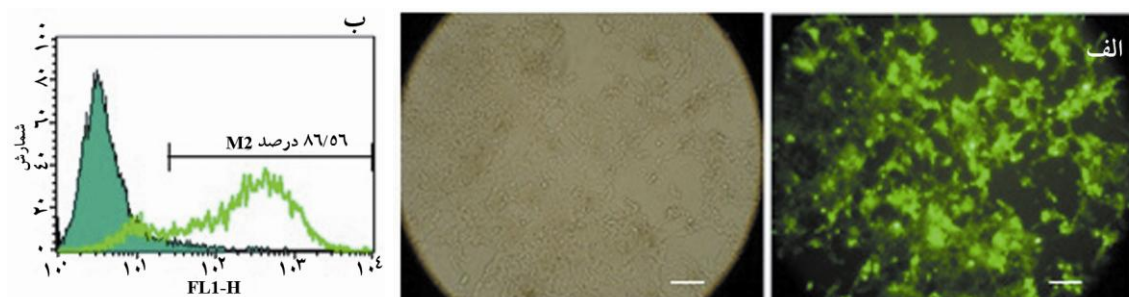
ترانسداکشن سلول‌های RB20

به منظور دستیابی به ویروس‌های نوترکیب، سلول‌های HEK293T توسط حامل هدف نوترکیب pLVPT-tTR- و KRAB و نیز حامل‌های کد کننده پروتئین‌های ساختاری و بسته‌بندی ویروس به طور همزمان ترانسفکت شدند. درصد ترانسفکشن سلول‌های HEK293T در گروه کنترل توسط فلوسایتمتری ۹۹/۴ درصد گزارش شد. ترانسداکشن سلول‌های RB20 توسط ویروس‌های نوترکیب حاوی shCtrl ۱ و shRNA-1

shRNA-2 و نیز مخلوطی از ۱، ۲ shRNA انجام شد. همچنین درصد ترانسداکشن سلول‌های RB20 توسط فلوسایتمتری ۸۶/۵ درصد برآورد شد (شکل ۷). ۴۸ ساعت پس از ترانسداکشن، تیمار سلول‌های ترانسداکت شده با آنتی‌بیوتیک Blasticidin آغاز شد و به مدت ۲ هفته ادامه یافت. در گروه کنترل (سلول‌های ترانسداکت شده با ویروس حاوی حامل pWPXL) ۴۸ ساعت پس از آغاز تیمار با آنتی‌بیوتیک همه سلول‌ها از بین رفتند. پس از ۲ هفته تیمار رده‌های سلولی با غلظت ۶ میکروگرم بر میلی‌لیتر از آنتی‌بیوتیک

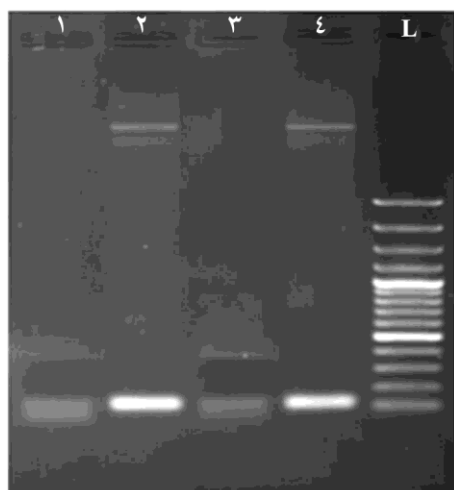
کلونی های سلولی نمودند (شکل ۸).

Blasticidin. تک سلول های باقی مانده شروع به تشکیل



شکل ۷ الف) عکس میکروسکوپ نوری و فلورسنت از سلول های HEK293T ترانسفکت شده با حامل pWXLD ناقل ژن GFP (اندازه بار: ۵۰ میکرومتر) ب) گراف فلوسایتمتری مربوط به ترانسداکشن سلول های RB20؛ ۸۶/۵ درصد سلول ها توسط ویروس های نو ترکیب ترانسداکت شده اند.

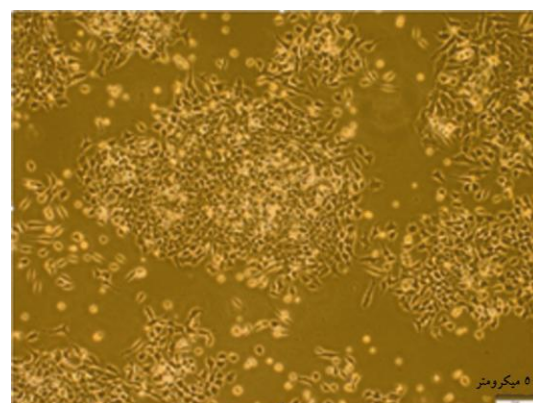
وارد شده است (شکل ۹).



شکل ۹ الکتروفورز محصولات PCR ژنومی روی ژنوم استخراج شده از رده سلولی با آغازگرهای اختصاصی shRNA (ستون ۱ و ۳) PCR روی ژنوم RB20 با آغازگر اختصاصی 2 shRNA1 (ستون ۲ و ۴) محصول PCR ژنوم رده سلولی با آغازگر اختصاصی 2 shRNA1 (L) نشانگر DNA با اندازه ۱۰۰ جفت باز

بررسی سطوح بیان رونوشت Fndc5

با توجه به این که shRNA در این مطالعه در پایین دست پروموتور القایی H1 (Tetracycline-on) کلون شد، بنابراین به منظور القای بیان shRNA در درون سلول از داکسی سایکلین (Dox) (آنالوگ تتراسایکلین) استفاده شد. به این منظور



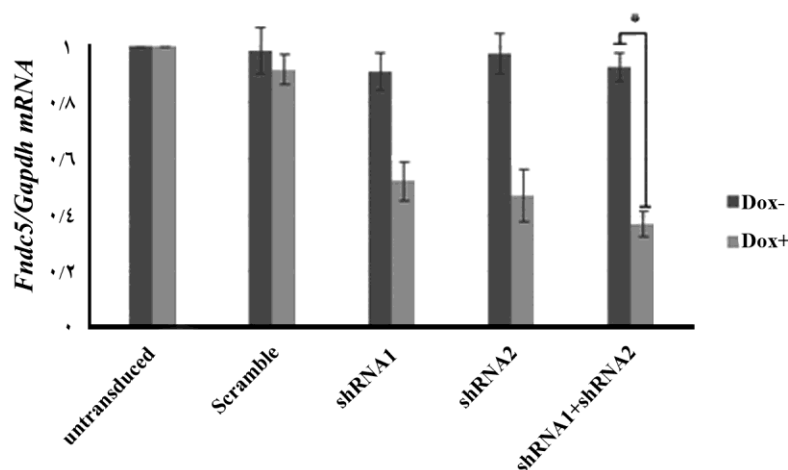
شکل ۸ عکس میکروسکوپ نوری از رده سلولی تولید شده که پس از دو هفته تیمار با آنتی بیوتیک Blasticidin تشکیل کلونی نموده اند. اندازه بار: ۵۰ میکرومتر

تأیید ورود حامل لتی ویروس نو ترکیب به داخل ژنوم سلول

رده های سلولی پس از ۲ هفته تیمار با آنتی بیوتیک Blasticidin و پاساژهای مکرر به منظور بررسی ورود پلاسمید نو ترکیب به داخل ژنوم استخراج DNA شدند. سپس روی ژنوم استخراج شده، با آغازگرهای اختصاصی برای ژن shRNA واکنش PCR انجام شد. الکتروفورز محصولات PCR روی ژل آگارز در رده سلولی ترانسداکت شده با 2 shRNA1 نشان داد که هر دو shRNA در ساختار ژنوم سلول

رده های سلولی با غلظت ۱/۵ میکروگرم بر میلی لیتر از داکسی سایکلین به مدت ۴۸ ساعت تیمار شدند. بررسی میزان بیان ژن *Fndc5* در رده های سلولی در حضور و عدم حضور داکسی سایکلین نشان داد که میزان بیان رونوشت *Fndc5* در

رده ترانسداکت شده با ۲، *shRNA1* القا شده با داکسی سایکلین، کاهش بیان معنی دار نسبت به بیان این ژن در همین رده سلولی در عدم حضور داکسی سایکلین را نشان می دهد (شکل ۱۰).



شکل ۱۰ میزان نسبی بیان ژن *Fndc5* توسط Real-time PCR در سلول های RB20 ترانسداکت نشده (Untransduced)، سلول ترانسداکت شده با *shCtrl* (Scramble)، سلول های RB20 ترانسداکت شده با *shRNA1*، سلول های RB20 ترانسداکت شده با *shRNA2* و سلول های RB20 ترانسداکت شده با ۲، *shRNA1* به صورت همزمان

بحث

در سال های اخیر RNAi به عنوان یک روش قوی و اختصاصی برای کاهش بیان ژن استفاده شده است [۱]. کاهش بیان ژن ها یکی از ابزارهای ارزشمند در تعیین نقش ژن ها در فرآیندهای مختلف سلولی از جمله فرآیندهای تمایز سلول های بنیادی است [۶]. RNAi به طور طبیعی در سلول تحت عنوان microRNA ساخته می شود و در آزمایشگاه به صورت siRNA یا shRNA ساخته می شود و بیان ژن های هدف را در مرحله بعد از رونویسی غیرفعال می کند [۱]. siRNA به طور موقت بیان ژن هدف را کاهش می دهد در حالی که shRNA در پایین دست پروموتور مربوط به RNA پلیمراز II و III وارد و نسخه برداری می شود و بیان ژن هدف را به صورت پایدار و مؤثرتر از siRNA کاهش می دهد. علاوه بر این؛ می توان با

استفاده از پروموتورهای القایی کاهش بیان ژن ها را تحت کنترل درآورد [۱۷-۱۹].

استفاده از سیستم بیانی لتی ویروس یکی از مناسب ترین ابزارها برای انتقال ژن های خارجی در اغلب سلول های مقاوم به ترانسفکشن مانند سلول های بنیادی است. مطالعات نشان داده است که بیان ژن های خارجی انتقال یافته به سلول های بنیادی توسط حامل های لتی ویروسی خاموش نمی شود و می تواند در طول فرآیند تمایز این سلول ها پایدار باقی بماند؛ در صورتی که سایر حامل های رتروویروسی این ویژگی را ندارند [۲۰]. سازه های بیانی انتقال یافته توسط لتی ویروس ها قابلیت ادغام در DNA سلول هدف را داراست، بنابراین امکان بیان پایا و طولانی مدت ژن مورد نظر را فراهم می کند [۲۱]. در این حامل ها به منظور افزایش ایمنی زیستی، تعداد زیادی از

مجدداً همسانه‌سازی می‌شد. با توجه به این‌که اختلاف اندازه حامل pLVTHM و قطعات shRNA سنتزی زیاد بود و این امر واکنش اتصال را بسیار دشوار نموده بود، بنابراین با بررسی نقشه حامل و توسط هضم آنزیمی (AgeI) قسمت‌های غیر ضروری از حامل حذف و قطعه جدید با حفظ ori همسانه‌سازی، ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک آمپی‌سیلین و قطعه مورد نیاز برای همسانه‌سازی مجدد در حامل انتقالی pLVPT-tTR-KRAB از ژل تخلیص و مجدداً حلقوی شد. بدین ترتیب واکنش اتصال قطعات shRNA دورگه شده در حامل pLVTHM* (حدود ۶ کیلو باز) به راحتی صورت پذیرفت. سپس قطعات DNA حاوی shRNA1، shRNA2 و shScramble به‌طور جداگانه درون حامل انتقالی pLVPT-tTR-KRAB مجدداً همسانه‌سازی شد.

سلول‌های بنیادی جنینی موشی توسط لنتی ویروس‌های حاوی Scramble، shRNA1، shRNA2، مخلوطی از 2، shRNA1 ترانسداکت شدند. نتایج بررسی میزان بیان mRNA ژن Fndc5 در این سلول‌ها نشان داد که هر دو shRNA و مخلوط آن‌ها به‌طور مؤثر باعث کاهش بیان ژن Fndc5 می‌شوند. پیش از این در مطالعه اسپیگلمن و همکاران توالی‌های shRNA مشابه در نورون‌های کورتیکوتیدی به‌کار برده شد که به میزان مؤثرتر از مطالعه انجام شده باعث کاهش بیان ژن Fndc5 شده‌است [۱۶]. هرچند توالی‌های shRNA به‌کار برده شده در دو مطالعه مشابه هم بود ولی عوامل مختلف از جمله ادغام تصادفی ناقل لنتی ویروسی در درون ژنوم، نوع و تعداد سلول هدف، میزان ناقل به‌کار رفته همگی از جمله عواملی است که بر میزان ترانسداکشن سلولی و به دنبال آن بر کارایی shRNA در کاهش بیان ژن مؤثر است [۲۴].

با توجه به کاهش بیان ژن Fndc5 به‌طور مؤثر، می‌توان در مطالعات آینده توسط القای مسیرهای تمایز قلبی و عصبی در رده سلولی به‌دست آمده به بررسی نقش این ژن در هر یک از این فرایندها پرداخت. همچنین باتوجه به این‌که پروموتور مورد استفاده در این مطالعه از نوع القایی بود، بنابراین می‌توان آثار کاهش بیان

ژن‌های غیر ضروری و بیماری‌زای ویروسی حذف شده و ویروس در سیستم همسانه‌سازی دچار نقص است. همچنین در نسل دوم و سوم از حامل‌های ویروسی ژن‌های مورد نیاز برای تکثیر و بسته‌بندی اجزای ویروسی به‌ترتیب در سه و چهار حامل توزیع شده است که یکی از آن‌ها حامل انتقال و بقیه حاملین کمکی برای بسته‌بندی لنتی ویروس‌ها هستند. به‌دلیل عدم وجود همولوژی بین این حامل‌ها، امکان نوترکیبی و قرار گرفتن ژن‌های لنتی ویروسی در مجاور هم کاهش یافته و ایمنی آن‌ها افزایش پیدا کرده‌است [۲۲، ۲۳].

هدف از انجام این مطالعه کاهش بیان ژن Fndc5 در سلول‌های بنیادی جنینی موشی است. همان‌طور که گفته شد بیان ژن Fndc5 طی فرآیند تمایز قلبی و عصبی سلول‌های بنیادی جنینی موشی افزایش می‌یابد. با توجه به این‌که تمایز سلول‌های بنیادی به رده‌های مختلف سلول‌های عصبی و قلبی فرآیندی زمان‌بر است، بنابراین به‌منظور بررسی نقش ژن‌ها در هر کدام از این فرایندها و نیز القای کاهش بیان ژن‌ها در زمان‌های متفاوت از فرآیند تمایزی، بایستی از رده‌های سلولی پایدار و القایی استفاده شود. به این منظور shRNAهایی که ناحیه کدکننده (Coding Sequence: CDS) ژن Fndc5 را هدف قرار می‌داد از پایگاه اطلاعاتی شرکت Sigma Aldrich (آلمان) بازیابی و ارزیابی شد. دو توالی siRNA که اکثر نرم‌افزارهای طراحی siRNA بر کارایی آن اتفاق نظر داشتند انتخاب و با توجه به الگوی پیشنهادی پایگاه Addgen برای حامل pLVTHM به shRNA تبدیل شدند.

حامل انتقالی مورد استفاده در این مطالعه حامل pLVPT-tTR-KRAB دست‌کاری شده بود که در آن ژن گزارشگر GFP با ژن مقاومت به آنتی‌بیوتیک Blastidicin جایگزین شده بود. به‌منظور استفاده از pLVPT-tTR-KRAB به‌عنوان حامل انتقالی، ابتدا می‌بایست shRNA در پایین دست پروموتور القایی H1 در حامل pLVTHM کلون می‌شد و سپس ناحیه TetO-H1-shRNA توسط برش آنزیمی (FspI-MscI) از pLVTHM جداسازی و درون حامل pLVPT-tTR-KRAB

ژن را در زمان‌های مختلف از فرآیندهای تمایزی ارزیابی کرد.

تشکر و قدردانی

مطالعه حاضر بخشی از رساله دکتری رشته ژنتیک

منابع

- [1] Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411(6836): 494-8.
- [2] Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004; 35(6): 545-53.
- [3] Singer O, Marr RA, Rockenstein E, Crews L, Coufal NG, Gage FH, Verma IM, Masliah E. Targeting BACE1 with siRNAs ameliorates Alzheimer disease neuropathology in a transgenic model. *Nat Neurosci* 2005; 8(10): 1343-9.
- [4] Ohrt T, Schwille P. siRNA modifications and sub-cellular localization: a question of intracellular transport? *Curr Pharm Des* 2008; 14(34): 3674-85.
- [5] Singh A, Boldin-Adamsky S, Thimmulappa RK, Rath SK, Ashush H, Coulter J, Blackford A, Goodman SN, Bunz F, Watson WH, Gabrielson E, Feinstein E, Biswal S. RNAi-mediated silencing of nuclear factor erythroid-2-related factor 2 gene expression in non-small cell lung cancer inhibits tumor growth and increases efficacy of chemotherapy. *Cancer Res* 2008; 68(19): 7975-84.
- [6] Cullen LM, Arndt GM. Genome-wide screening for gene function using RNAi in mammalian cells. *Immunol Cell Biol* 2005; 83(3): 217-23.
- [7] Paddison PJ, Caudy AA, Bernstein E, Hannon GJ, Conklin DS. Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells. *Genes Dev* 2002; 16(8): 948-58.
- [8] Naldini L. Lentiviruses as gene transfer agents for delivery to non-dividing cells. *Curr Opin Biotechnol* 1998; 9(5): 457-63.
- [9] Buchsacher GL Jr. Introduction to retroviruses and retroviral vectors. *Somat Cell Mol Genet* 2001; 26(1-6): 1-11.
- [10] Zufferey R, Dull T, Mandel RJ, Bukovsky A, Quiroz D, Naldini L, Trono D. Self-inactivating lentivirus vector for safe and efficient in vivo gene delivery. *J Virol* 1998; 72(12): 9873-80.
- [11] Tiscornia G, Singer O, Verma IM. Production and purification of lentiviral vectors. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 241-5.
- [12] Schroeder IS, Rolletschek A, Blyszczuk P, Kania G, Wobus AM. Differentiation of mouse embryonic stem cells to insulin-producing cells. *Nat Protoc* 2006; 1(2): 495-507.
- [13] Boström P, Wu J, Jedrychowski MP, Korde A, Ye L, Lo JC, Rasbach KA, Boström EA, Choi JH, Long JZ, Kajimura S, Zingaretti MC, Vind BF, Tu H, Cinti S, Højlund K, Gygi SP,

- Spiegelman BM. A PGC1- α -dependent myokine that drives brown-fat-like development of white fat and thermogenesis. *Nature* 2012; 481(7382): 463-8.
- [14] Rabiee F, Forouzanfar M, Ghazvini Zadegan F, Tanhaei S, Ghaedi K, Motovali Bashi M, Baharvand H, Nasr-Esfahani MH. Induced expression of Fndc5 significantly increased cardiomyocyte differentiation rate of mouse embryonic stem cells. *Gene* 2014; 551(2): 127-37.
- [15] Ostadsharif M, Ghaedi K, Hossein Nasr-Esfahani M, Mojbafan M, Tanhaei S, Karbalaie K, Baharvand H. The expression of peroxisomal protein transcripts increased by retinoic acid during neural differentiation. *Differentiation* 2011; 81(2): 127-32.
- [16] Wrann CD, White JP, Salogiannis J, Laznik-Bogoslavski D, Wu J, Ma D, Lin JD, Greenberg ME, Spiegelman BM. Exercise induces hippocampal BDNF through a PGC-1 α /FNDC5 pathway. *Cell Metab* 2013; 18(5): 649-59.
- [17] Chung KH, Hart CC, Al-Bassam S, Avery A, Taylor J, Patel PD, Vojtek AB, Turner DL. Polycistronic RNA polymerase II expression vectors for RNA interference based on BIC/miR-155. *Nucleic Acids Res* 2006; 34(7): e53.
- [18] Giering JC, Grimm D, Storm TA, Kay MA. Expression of shRNA from a tissue-specific pol II promoter is an effective and safe RNAi therapeutic. *Mol Ther* 2008; 16(9): 1630-6.
- [19] Bridge AJ, Pebemard S, Ducraux A, Nicoulaz AL, Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat Genet* 2003; 34(3): 263-4.
- [20] Pfeifer A, Ikawa M, Dayn Y, Verma IM. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(4): 2140-5.
- [21] Scherr M, Battmer K, Ganser A, Eder M. Modulation of gene expression by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA. *Cell Cycle* 2003; 2(3): 251-7.
- [22] Pawliuk R, Bachelot T, Raftopoulos H, Kalberer C, Humphries RK, Bank A, Leboulch P. Retroviral vectors aimed at the gene therapy of human beta-globin gene disorders. *Ann N Y Acad Sci* 1998; 850: 151-62.
- [23] Dull T, Zufferey R, Kelly M, Mandel RJ, Nguyen M, Trono D, Naldini L. A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. *J Virol* 1998; 72(11): 8463-71.
- [24] Zhang B, Metharom P, Jullie H, Ellem KA, Cleghorn G, West MJ, Wei MQ. The significance of controlled conditions in lentiviral vector titration and in the use of multiplicity of infection (MOI) for predicting gene transfer events. *Genet Vaccines Ther* 2004; 2(1): 6.