

تأثیر ایجاد تغییرات اپی ژنتیکی با کوچک مولکول‌ها بر بیش بیان ژن به روش لنتی ویروسی در سلول‌های بنیادی جنینی

محسن بصیری^۱ M.Sc.، مهرداد بهمنش^{۱*} Ph.D.، یاسر تهمتنی^۲ Ph.D.، آزاده مرادمند^۲ M.Sc.
حسین بهاروند^{۳*} Ph.D.

- ۱- دانشگاه تربیت مدرس، دانشکده علوم زیستی، گروه ژنتیک، تهران، ایران
- ۲- پژوهشگاه رویان، پژوهشکده زیست شناسی و فناوری سلول‌های بنیادی جهاد دانشگاهی، مرکز تحقیقات علوم سلولی، گروه سلول‌های بنیادی و زیست شناسی تکوینی، تهران، ایران
- ۳- دانشگاه علم و فرهنگ، گروه زیست شناسی، تهران، ایران

* پست الکترونیک نویسندگان مسئول: baharvand@royaninstitute.org, behmanesh@modares.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۱۹

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱۱/۱۹

چکیده

هدف: در این مطالعه کارایی روش انتقال ژن به روش لنتی ویروسی و بیش بیان ژن با پروموتور سایتومگالوویروس (CMV) بررسی و تأثیر کوچک مولکول (small molecules) های مهارکننده مسیرهای اپی ژنتیکی بر بیش بیان ژن ارزیابی شده است.

مواد و روش‌ها: سلول‌های ES موشی با مقادیر مختلف لنتی ویروس بیان کننده پروتئین فلورسنت سبز (green fluorescent protein; GFP) تراریخت شده و درصد سلول‌های بیان کننده GFP با روش فلوسایتومتری اندازه گیری شد. ماندگاری بیان GFP در مدت هشت روز بررسی گردید. به کمک لنتی ویروس بیان کننده ژن فاکتور رونویسی پانکراسی و دئودنومی ۱ (*Pdx1*)، تأثیر تیمار کوچک مولکول‌های ۵-آزاسایتادین (5-AZA)، DZNep و BIX01294 بر سیستم بیانی ارزیابی شد.

نتایج: انتقال لنتی ویروسی ژن به سلول‌های ES با استفاده از ضریب آلوده سازی (Multiplicity of infection; MOI) ۱۰ و ۲۰ موجب تراریخت شدن بیش از ۹۰ درصد این سلول‌ها شد. با این حال، بیان ژن انتقال یافته در طول هشت روز کاهش چشم‌گیر داشت. کوچک مولکول 5-AZA در محیط کشت تسهیل کننده تمایز (permissive)، بیان ژن از سیستم لنتی ویروسی را ۲/۵ برابر افزایش داد. همچنین DZNep در محیط‌های پر توانی (pluripotency) و تسهیل کننده تمایز موجب افزایش به ترتیب ۲۶/۵ و ۵/۹ برابری بیان ژن شد. بیان ژن *Pdx1* داخلی خود سلول نیز در تیمار با DZNep افزایش یافت.

نتیجه گیری: انتقال لنتی ویروسی ژن با MOI بیش از ۱۰، روشی کارآمد برای انتقال ژن به سلول‌های ES موشی است، اما این روش به همراه استفاده از پروموتور CMV موجب خاموش شدن بیان ژن در درازمدت می‌شود. تیمار با DZNep موجب فعال شدن این سیستم بیانی می‌شود. اما می‌تواند با تاثیراتی بر بیان سایر ژن‌های سلول نیز همراه باشد.

واژگان کلیدی: ترانس ژن، سایتومگالوویروس، سلول‌های بنیادی جنینی، لنتی ویروس، ناقل ژنتیکی

مقدمه

سلول‌های بنیادی جنینی (Embryonic Stem, ES) از ویژگی‌های پرتوانی (Pluripotency) و خودنوزایی (Self-renewal) برخوردار هستند. همین ویژگی‌ها باعث شده‌اند تا این سلول‌ها به‌عنوان منبعی تجدیدپذیر برای تولید انواع سلول‌های سوماتیک به‌شمار بروند. مطالعه تمایز سلول‌های ES هم برای تامین سلول‌های لازم در درمان‌های سلولی و هم به‌منظور مطالعه فرآیندهای تمایز سلولی و شبیه‌سازی آزمایشگاهی شرایط تکوینی حائز اهمیت است (۱). دست‌کاری ژنتیکی سلول‌های ES روشی مفید برای انجام مطالعات ژنتیکی روی فرایندهای تمایزی این سلول‌ها است (۲). برای این منظور، توسعه روش‌های دست‌کاری ژنتیکی و بررسی کارکرد عناصر و ابزارهای مربوطه در سلول‌های ES امری ضروری است. تاکنون روش‌های مختلفی برای انتقال ژن به سلول‌های ES به‌کار رفته است، که از آن میان می‌توان به الکتروپوریشن (Electroporation) (۳ و ۴) نوکلئوفکشن (Nucleofection) (۵ و ۶) و لیپوفکشن (Lipofection) (۷ و ۸) اشاره کرد. در این روش‌ها محدودیت‌هایی از نظر میزان انتقال ژن (۹ و ۱۰)، سمیت سلولی (۴ و ۱۱) و بیان کوتاه مدت ژن (۵ و ۶) مشاهده شده‌است. یکی از کارآمدترین روش‌های انتقال ژن به سلول‌های جانوری استفاده از ناقل‌های لنتی‌ویروسی است (۱۲، ۱۳). این ناقل‌ها معمولاً در انتقال ژن به سلول‌های جانوری کارایی بالایی دارند. به‌علاوه، ناقل‌های لنتی‌ویروسی با وارد کردن ژن به ژنوم سلول، می‌توانند موجب بیان دراز مدت آن شوند (۱۲). پیش از این نیز ناقل‌های لنتی‌ویروسی برای انتقال ژن به سلول‌های ES با موفقیت به‌کار گرفته شده‌اند (۱۴ و ۱۵).

گذشته از انتقال کارآمد ژن به سلول، استفاده از عناصر تنظیمی مناسب برای دستیابی به میزان موثری از بیان ژن ضروری است. پروموتور، به‌عنوان مهم‌ترین عنصر تنظیمی، تأثیر عمده‌ای در بیان ژن دارد. عمدتاً چند پروموتور شناخته شده که فعالیت مناسبی در اکثر انواع سلولی دارند، در ناقل‌های جانوری تعبیه شده و برای بیش‌بیان (overexpression) ژن‌ها به‌کار می‌روند. برخی مطالعات نشان داده‌اند که این پروموتورها از حیث فعالیت در سلول‌های ES متفاوتند (۹ و ۱۵). یکی از دلایل شناخته شده خاموش شدن بیان ژن‌های انتقال یافته به سلول‌های ES، تأثیر عوامل اپی‌ژنتیکی بر پروموتور این ژن‌ها است (۱۶ و ۱۷). ساز و کارهای اپی‌ژنتیکی متعددی در ES شناخته شده‌اند که مسئول

خاموش نگه‌داشتن ژن‌های تمایزی و در نتیجه حفظ شرایط پرتوانی هستند (۱۸ و ۱۹). این سازوکارها می‌توانند بعضی از پروموتورهایی را که برای بیش‌بیان ژن‌ها به‌کار می‌روند شناسایی و غیرفعال کنند. به‌همین دلیل است که برای دست‌کاری ژنتیکی موثر و دستیابی به بیش‌بیان ژن، بررسی کارایی هر سیستم بیانی و بهینه‌سازی شرایط بیش‌بیان حائز اهمیت است. یکی از روش‌هایی که دست‌کاری فرآیندهای اپی‌ژنتیکی استفاده از کوچک مولکول‌ها (small molecules) است. کوچک مولکول‌ها عنوانی کلی برای دسته‌ای از مواد با وزن مولکولی پایین است که می‌توانند به‌راحتی از غشا سلولی عبور کرده و وارد سلول شوند. این مولکول‌ها عمدتاً با مهار فعالیت پروتئین‌های سلول سازوکارهای سلولی را تحت تأثیر قرار می‌دهند (۲۰). کوچک مولکول‌هایی که باعث مهار فعالیت آنزیم‌های اپی‌ژنتیکی، مانند متیلاسیون DNA و استیلاسیون و متیلاسیون هیستون‌ها می‌شوند ابزاری بالقوه برای دست‌کاری این فرآیندهای اپی‌ژنتیکی و در نتیجه القای تغییر در بیان ژن‌ها به‌شمار می‌روند (۲۱ و ۲۲). برای نمونه، کوچک مولکول ۵-آزاسایتادین (AZA) با مهار آنزیم‌های متیل ترانس‌فراز، مانع فرایند متیله شدن DNA می‌شود (۲۳). همچنین کوچک مولکول BIX01294 (BIX) که مهارکننده هیستون متیل ترانسفرازهای خانواده G9a و G9a-like است، متیلاسیون لایزین ۹ از هیستون سه (H3K9me2) را که عمدتاً با فعالیت PRC1 (Polycomb Repressive Complex 1) در ارتباط است، کاهش می‌دهد (۲۴). کوچک مولکول ۳-دی‌آزانیپلانسین A (DZNep یا Deazaneplanocin) مهارکننده فعالیت هیستون متیل ترانسفراز با گرایش اختصاصی به Ezh2 است (۲۵ و ۲۶). پروتئین Ezh2 هیستون متیل ترانسفراز است که باعث متیلاسیون لایزین ۲۷ از هیستون سه (H3K27me3) می‌شود و یکی از اجزای اصلی PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2) به‌شمار می‌رود (۲۶).

در این مطالعه پس از تعیین میزان لنتی‌ویروس موردنیاز برای انتقال کارآمد ژن به سلول‌های ES، پایداری بیش‌بیان ژن خارجی انتقال‌یافته (اگزوزن) طی مدت هشت روز بررسی شده‌است. در ادامه این فرضیه که مهار ساز و کارهای اپی‌ژنتیکی سلول ES می‌تواند منجر به افزایش فعالیت سیستم بیانی لنتی‌ویروسی با پروموتور CMV شود، مورد آزمایش قرار گرفته است. برای این منظور سلول‌های ES تراریخت با کوچک مولکول‌های مهارکننده سه مسیر اپی‌ژنتیکی که منجر به

تولید سازه‌های ژنی: برای تهیه سازه‌های ژنی لنتی ویروسی pLenti6.3-Pdx1، توالی کدکننده ژن *Pdx1* موشی پس از بهینه‌سازی کدونی، به روش سنتزی تولید و در ناقل pENTR-21 کلون شد (Gene Arts). سپس این ژن با روش Gateway (Life technologies) به ناقل pLenti6.3/TO/DEST منتقل شد (Gene Arts). برای تولید سازه pLenti6.3-GFP نیز مشابه بالا عمل شد با این تفاوت که توالی GFP از ناقل pEGFP-N1 جدا گردید. در انتها صحت سازه‌های نهایی با تعیین توالی تایید شد. پلاسمیدهای کمکی تولید لنتی ویروس شامل pMD2.G، pRSV، pMDLg از Addgene خریداری شدند.

تولید ویروس: برای تولید ذرات لنتی ویروسی مطابق با دستور کار شرکت Life technologies عمل شد، به‌طور خلاصه، سلول‌های LentiX-293T در ظروف کشت پوشش داده شده با ژلاتین به تعداد پنج میلیون سلول در هر ظرف ده سانتی‌متری کشت داده شدند. سپس سه پلاسمید کمکی (pMDLg، pRSV و pMD2.G) به‌همراه پلاسمید لنتی ویروسی (pLenti6.3-GFP یا pLenti6.3-Pdx1)، هر کدام سه میکروگرم، با استفاده از Lipofectamin (Life technologies) و با روش ارائه شده در دستور کار شرکت، به سلول‌های LentiX-293T انتقال یافتند. محیط حاوی ویروس در روزهای دوم و سوم پس از ترانسفکشن جمع‌آوری و ذرات لنتی ویروسی با سانتریفیوژ در ۲۰۰۰۰ g به مدت دو ساعت، از محیط جدا شدند. رسوب لنتی ویروسی در محیط کشت DMEM/F12 فاقد سرم حل شدند و تا زمان مصرف در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

اندازه‌گیری تیترو و آلوده‌سازی ویروسی: برای اندازه‌گیری تیترو ویروس‌ها، سلول‌های HT1080 به تعداد ۲۰۰۰۰ سلول در هر چاهک از ظروف شش‌خانه‌ای کشت شدند. پس از یک روز رقت‌های مختلف از ویروس به‌همراه ۲ میکروگرم در میلی‌لیتر از پلی‌برن (Sigma) به سلول‌ها اضافه شد. سلول‌ها برای مدت ۱۸ تا ۲۰ ساعت در معرض ویروس و سپس برای یک شبانه روز در محیط فاقد آنتی‌بیوتیک قرار گرفتند. در ادامه سلول‌ها برای مدت ۱۲ تا ۱۴ روز در محیط کشت حاوی ۵ میکروگرم در میلی‌لیتر بلاستوسیدین (Sigma) نگهداری شدند. در نهایت با رنگ آمیزی متیلن بلو کلونی‌های برجای مانده از تیمار آنتی‌بیوتیکی مشخص و شمارش شدند. تیترو ویروس فعال در واحد حجم با در نظر گرفتن

متیلاسیون DNA و ریشه‌های لایزین ۹ و ۲۷ از هیستون سه (H3K9me3 و H3K27me3) می‌شوند، تیمار شده و در نهایت تأثیر این تیمارها بر بیان اگزوزن و ژن داخلی خود سلول (اندوزن) بررسی شده است.

مواد و روش‌ها

کشت سلول: کشت سلول‌های ES موشی رده Royan B20 به روشی که قبلاً شرح داده شده است (۲۷ و ۲۸) صورت گرفت. به‌طور مختصر، این سلول‌ها در ظروف کشت پوشش داده شده با ژلاتین در محیط کشت DMEM/F12 (Life technologies) حاوی ۱۵ درصد جایگزین سرم (Knock-out serum replacement، Life technologies)، غلظت ۱X از مخلوط اسیدهای آمینه غیرضروری (None-essential amino acids، Life technologies)، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (Life technologies)، ۱۰ واحد در میلی‌لیتر عامل مهارکننده لوسمی (LIF) (۲۹) و دو مهارکننده کوچک مولکولی (R2i) SB431542 (۱۰ میکرومولار) و PD404182 (یک میکرومولار) کشت داده شدند. سلول‌ها در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد با هوای حاوی پنج درصد CO₂ نگهداری شدند. محیط کشت‌ها هر روز تعویض شد و پاساژ سلول‌ها در فواصل دو روزه و به‌روش معمول با محلول تریپسین و EDTA (Life technologies) انجام شد.

برای تیمار سلول‌ها با کوچک مولکول‌های مهارگر اپی ژنتیکی به‌منظور تعیین دوز کشنده یا سنجش تأثیر کوچک مولکول‌ها بر بیان ژن، ابتدا سلول‌های ES با تراکم 2×10^4 سلول در هر سانتی‌متر مربع در ظروف پوشش داده شده با ژلاتین کشت شدند و پس از یک روز محیط کشت با محیط حاوی یکی از کوچک مولکول‌های ۵-آزاسیتادین (Sigma)، کوچک مولکول DZNep (Sigma) یا BIX (Sigma) تعویض شد. غلظت‌های کوچک مولکول‌های به‌کار رفته در هر آزمایش در قسمت نتایج ذکر شده است. سلول‌ها برای مدت سه روز، با تعویض محیط روزانه، در محیط کشت حاوی کوچک مولکول نگهداری شدند.

کشت سلول‌های HT1080 و LentiX-293T (Clonetech) در محیط DMEM (Life technologies) حاوی ۱۰ درصد سرم جنین گاوی (Life technologies)، غلظت ۱X از مخلوط اسیدهای آمینه غیرضروری (Life technologies)، ۲ میلی‌مولار ال-گلوتامین (Life technologies) انجام شد.

اندازه‌گیری بیان ژن به روش *real time RT-PCR* برای جداسازی RNA از کیت Qiagen RNeasy Micro و طبق دستورالعمل کیت استفاده شد. کیفیت و کمیت RNA به دست آمده با الکتروفورز بر روی ژل آگاروز و اسپکتروفوتومتری در طول موج‌های ۲۶۰ و ۲۸۰ نانومتر ارزیابی شد. ساخت cDNA با استفاده از کیت RevertAidTM H Minus M-Mulv (Thermo Scientific) مطابق با دستورالعمل مربوطه انجام گرفت. واکنش realtime PCR در دستگاه Rotor Gene 6000 (Corbett Life Science) و با استفاده از مخلوط آماده PCR حاوی سایبرگرین (Takara) انجام شد. برنامه واکنش شامل این مراحل بود: پنج دقیقه دمای ۹۵ درجه سانتی‌گراد برای دناتوراسیون اولیه، چهل چرخه، هر چرخه شامل سی ثانیه ۹۵ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه ۶۰ درجه سانتی‌گراد، ۳۰ ثانیه ۷۲ درجه سانتی‌گراد و خوانش فلورسنت؛ اندازه‌گیری دمای ذوب محصول با شیب دمایی ۹۵ تا ۶۵ درجه سانتی‌گراد انجام پذیرفت. توالی پرایمرهای به کار رفته برای هر کدام از ژن‌ها در جدول ۱ نشان داده شده است. بیان ژن‌ها با روش Ct ، بر اساس بیان ژن گلیسرآلدئید ۳-فسفات دهیدروژناز (GAPDH) نرمال شد و نسبت به نمونه شاهد (سلول ES) محاسبه شد.

آنالیزهای آماری: برای مقایسه آماری داده‌ها از آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده و مقادیر p کمتر از ۰/۰۵ معنی‌دار تلقی شدند. محاسبه توسط نرم‌افزار GraphPad Prism 3 انجام گرفت.

ضریب رقت، بر حسب واحد ترانسداکشن (transduction unit) در میلی‌لیتر محاسبه شد.

برای آلوده سازی سلول‌های ES، ابتدا مقدار مورد نیاز از سوسپانسیون ویروسی بر حسب تیترو ویروس و تعداد سلول‌ها تعیین شد. به این ترتیب که به ازای هر 2×10^5 سلول در یک ظرف ۳ سانتی‌متری، برای ضریب آلوده‌سازی یا MOI (Multiplicity of infection) ۱، ۵، ۱۰ و ۲۰ به ترتیب 2×10^5 ، 1.06×10^6 و 4×10^6 واحد ترانسداکشن از ذرات لنتی‌ویروسی استفاده شد. پس از اضافه کردن محلول حاوی ویروس، به همان حجم محیط کشت سلول ES حاوی پلی‌برن و با غلظت دو برابر از همه محتویات، روی سلول‌ها ریخته شد. با این روش، با توجه به این‌که ویروس‌ها در محیط کشت DMEM/F12 حل شده بودند، محیط نهایی کاملاً مطابق با محیط کشت معمولی سلول‌های ES بود. بعد از ۱۲ تا ۱۴ ساعت محیط کشت با محیط فاقد آنتی‌بیوتیک تعویض شد.

بررسی میکروسکوپی و فلوسایتومتری: برای بررسی و عکس برداری میکروسکوپی سلول‌ها به صورت زنده و در محیط کشت با میکروسکوپ فلورسنت مدل DP72 (Olympus) مشاهده و عکس برداری شدند. برای بررسی فلوسایتومتری سلول‌ها با تریپسین جدا و سپس سانتریفیوژ شدند. رسوب سلولی با بافر نمکی فسفات بدون کلسیم (D-PBS) دو بار شستشو شد. در نهایت سوپ سلولی در D-PBS توسط دستگاه فلوسایتومتر مدل BD FACS Calibur (BD Biosciences) بررسی و نتایج با نرم افزار (Turku) Flowing Software 2.5.1 (Centre for Biotechnology) تجزیه و تحلیل شدند.

جدول ۱: توالی پرایمرهای به کار رفته برای بررسی بیان ژن‌ها با *qRT-PCR*

Gene Symbol	Primer Sequence
<i>Gapdh</i>	F: 5'-CAACTCCACTCTTCCACTT-3'
	R: 5'-GCAGCGAACTTTATTGATGGTA-3'
<i>WPRE</i>	F: 5'-CGTTGTCAGGCAACGTG-3'
	R: 5'-CTGACAGGTGGTGGCAAT-3'
<i>Pdx1</i> (endogenous)	F: 5'-CCTGGAAGAGCCCAACCGC-3'
	R: 5'-TCCGCTGTGTAAGCACCTCCT-3'

تعداد $2/5 \times 10^5$ سلول ES موشی با نسبت MOI صفر (به عنوان شاهد)، یک، پنج، ۱۰ و ۲۰ انجام شد. سلول‌ها پس از دو روز ارزیابی شدند. در تصاویر میکروسکوپ فلورسنت بیان GFP در سلول‌ها، به ویژه آن‌هایی که با MOI بیشتر آلوده شده بودند، دیده می‌شد (شکل ۱، الف). بررسی کمی با فلوسایتومتری نشان داد که بیشترین مقدار انتقال ژن در MOI‌های ۲۰ و ۱۰ صورت

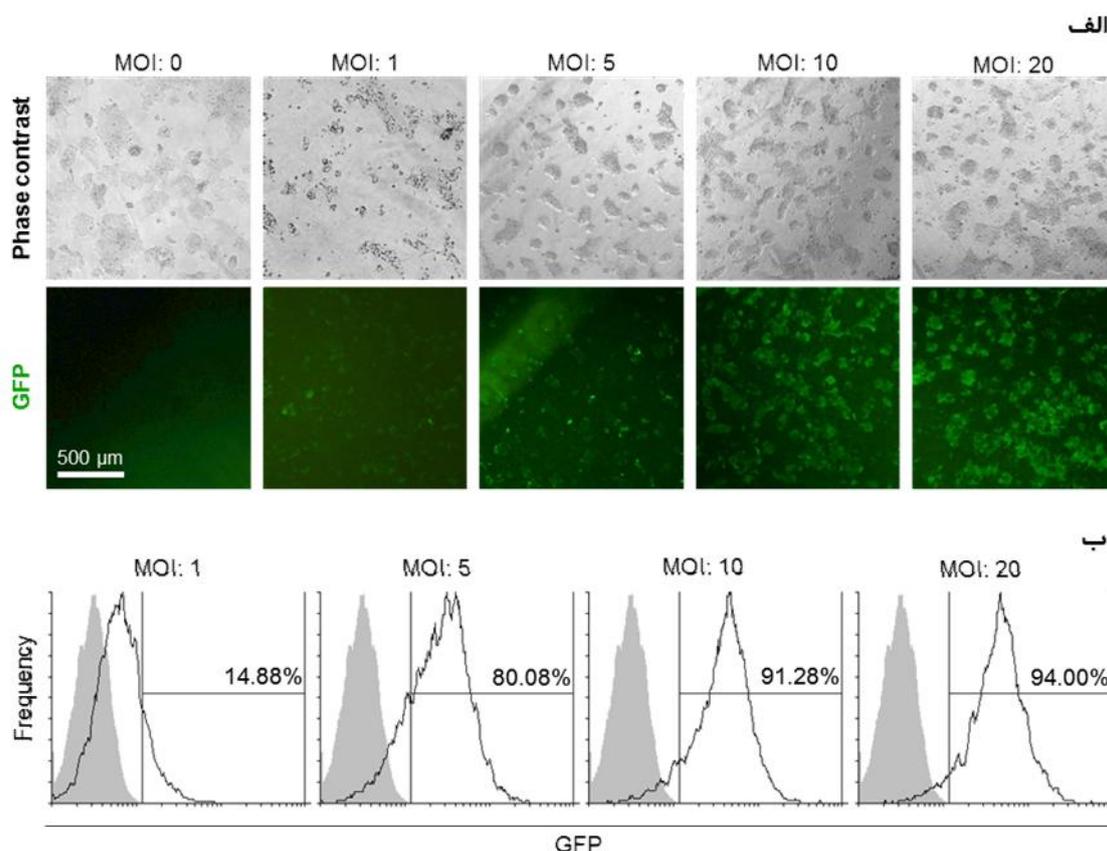
نتایج

تعیین مقدار ویروس برای انتقال موثر ژن به سلول‌های ES موشی

برای تعیین نسبت مناسب از ذرات لنتی‌ویروس و سلول ES از لنتی‌ویروس حاوی ژن GFP (pLenti6.3-GFP) استفاده شد.

مجموع نشان داد که MOI بالاتر از ده منجر به انتقال موثر و کارآمد ژن به سلول‌های ES موشی می‌شود. از این رو در ادامه برای سایر آزمایش‌ها از MOI ۱۰ برای انتقال ژن به سلول‌های ES استفاده شد.

می‌گیرد و منجر به بیان GFP در بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها می‌شود. در MOI پنج نیز ۸۰ درصد از سلول‌ها GFP را بیان می‌کردند. این در حالی است که با MOI یک، کمتر از ۱۵ درصد سلول‌ها بیان GFP را نشان می‌دادند (شکل ۱، ب). این نتایج در



شکل ۱: تعیین MOI برای آلوده‌سازی ویروسی سلول‌های ES موشی. الف) تصاویر میکروسکوپی فازکنتراست (ردیف بالا) و فلورسنت (ردیف پایین) سلول‌های ES را دو روز بعد از انتقال ژن با مقادیر مختلف از لنتی ویروس بیان کننده GFP نشان می‌دهند. نمونه MOI صفر که هیچ ویروسی دریافت نکرده، به عنوان شاهد نشان داده شده است. ب) بررسی کمی میزان سلول‌های بیان کننده GFP در مقادیر مختلف MOI با استفاده از فلوسایتومتری. نمونه MOI صفر (با زمینه خاکستری) به عنوان شاهد به کار رفته است.

فلوسایتومتری نشان داد که بیان این ژن به مرور زمان طی پاساژهای متوالی کاهش می‌یابد (شکل ۲). در حالی که درصد سلول‌های بیان کننده GFP در روز دوم مشابه با آزمایشات تعیین MOI، بیش از ۹۰ درصد بود. به این ترتیب هرچند سیستم بیانی مبتنی بر پرموتر CMV و ناقل لنتی ویروسی قابلیت بیان ژن در سلول‌های ES موشی را دارد، اما این بیان به مرور دچار کاهش می‌شود.

تأثیر کوچک مولکول‌های مهارکننده مسیره‌های اپی ژنتیکی بر بیش بیان ژن

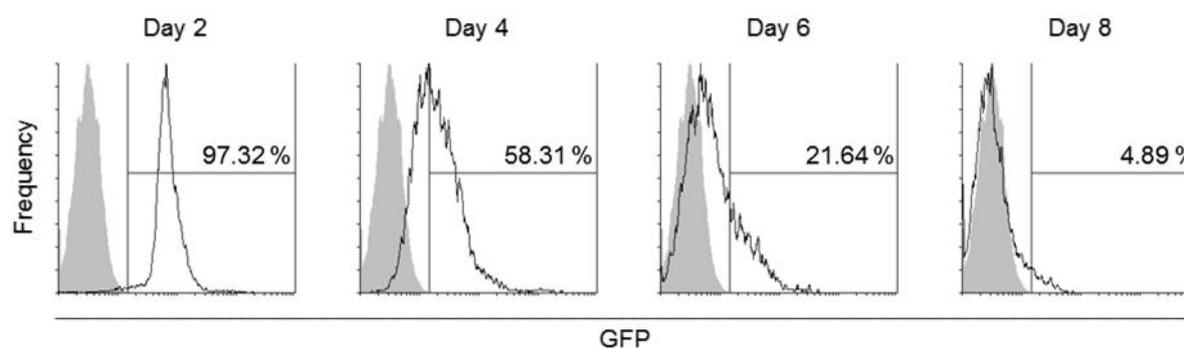
سه مورد از عمده‌ترین ساز و کارهای اپی ژنتیکی که به طور گسترده در سلول‌های ES فعال هستند و می‌توانند موجب مهار

بررسی پایداری بیش بیان ژن

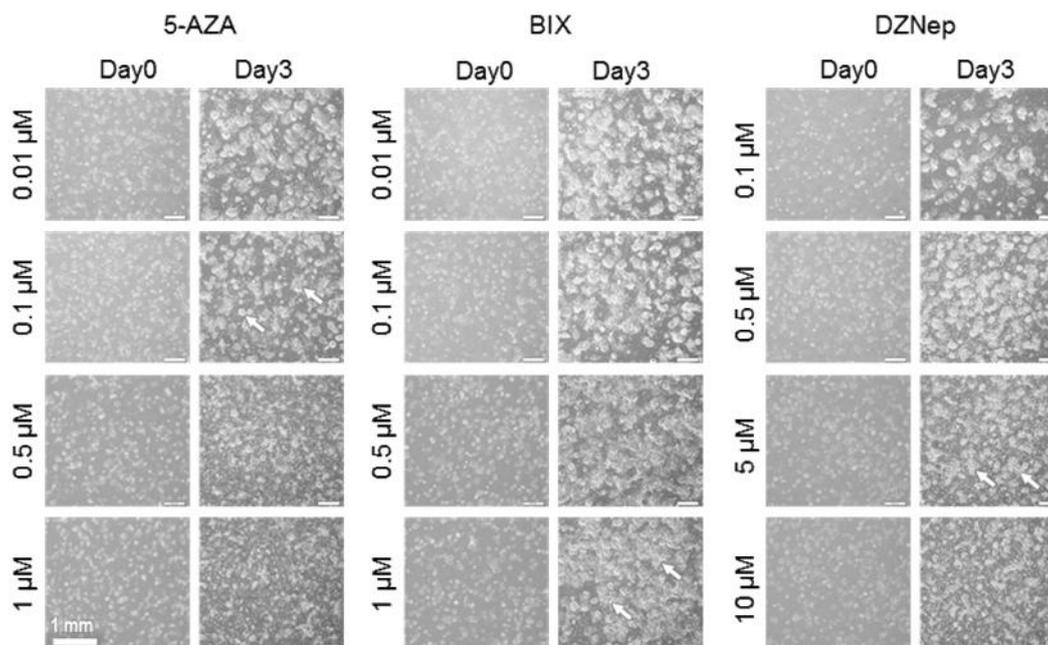
برای بررسی پایداری بیش بیان ژن با استفاده از سیستم بیانی لنتی ویروسی با پرموتر CMV، سلول‌های تراریخت شده با لنتی ویروس pLenti6.3-GFP، پس از گذشت دو، چهار، شش و هشت روز از زمان انتقال ژن بررسی شدند. برای این کار سلول‌های ES موشی در گروه‌های جداگانه با فواصل دو روزه و MOI برابر ۱۰ با لنتی ویروس pLenti6.3-GFP آلوده شدند. بررسی کمی تعداد سلول‌های بیان کننده GFP با فلوسایتومتری پس از گذشت هشت روز از اولین آلوده سازی ویروسی انجام شد. در طول این مدت سلول‌ها در همه گروه‌ها تکثیر داشته و هر دو روز یکبار پاساژ داده شدند. نتایج بررسی بیان GFP با

تعیین حداکثر غلظت قابل استفاده از این کوچک مولکول‌ها، سلول‌های ES موشی در حضور چهار غلظت مختلف از کوچک مولکول‌ها برای مدت سه روز کشت داده شدند. بررسی کشندگی کوچک مولکول‌ها به صورت کیفی و با مشاهده میکروسکوپی، بر مبنای تشکیل کلونی‌های طبیعی سلول‌های ES صورت گرفت (شکل ۳). نتایج نشان دادند که حداکثر غلظتی که تکثیر و تشکیل کلونی طبیعی ES را مختل نمی‌کند برای هر یک از کوچک مولکول‌های 5-AZA، BIX و DZNep به ترتیب ۰/۱، ۱ و ۵ میکرومولار است، بنابراین از همین غلظت‌ها برای آزمایش‌های بعدی استفاده شد.

بیان اگزوزن شوند، متیلاسیون DNA (۳۰)، تری‌متیلاسیون لایزین ۲۷ از هیستون سه (H3K27me3) (۳۱ و ۳۲) و دی‌متیلاسیون لایزین ۹ از هیستون سه (H3K9me2) (۱۸ و ۳۳) هستند. در ادامه برای مطالعه نقش احتمالی این مکانیزم‌ها در غیرفعال شدن سیستم بیانی لنتی‌ویروسی با پروموتور CMV و نیز بهره‌برداری از مهار این مسیرها برای فعال کردن دوباره این سیستم بیانی، از مهارکننده‌های کوچک مولکولی استفاده شد. برای این منظور، کوچک مولکول ۵-آزاسیتادین (5-AZA) برای مهار DNA متیل ترانس‌فراز، کوچک مولکول DZNep به‌عنوان مهارگر H3K27me3 و کوچک مولکول BIX (BIX01294) به‌عنوان مهارگر H3K9me2 به کار گرفته شدند. ابتدا برای



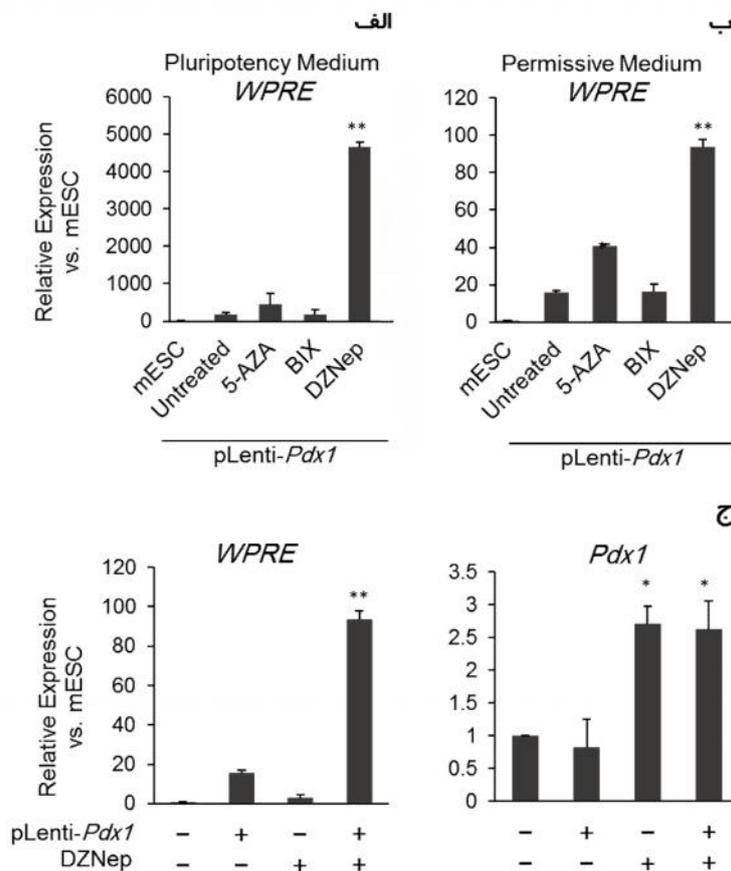
شکل ۲: پایداری بیان GFP با پروموتور CMV پس از انتقال لنتی‌ویروسی به سلول ES گروه‌های جدا از سلول‌ها در فواصل دو روزه با 10^6 MOI در معرض لنتی‌ویروس pLenti-GFP قرار گرفتند و پس از گذشت هشت روز از اولین آلوده‌سازی با فلوسایتومتری بررسی شدند. گروه‌هایی که روزهای بیشتری پس از انتقال ژن سپری کرده‌اند درصد کمتری از سلول‌های بیان‌کننده GFP دارند.



شکل ۳: ارزیابی سمیت کوچک مولکول‌های 5-AZA، BIX و DZNep روی سلول‌های ES موشی. سلول‌ها در حضور غلظت‌های مختلفی از کوچک مولکول‌ها برای مدت سه روز کشت شدند. تفاوت میزان بقای سلول‌ها در غلظت‌های مختلف مشهود است. به‌ویژه حضور چند نمونه از کلونی‌های ES با فلش نشان داده شده است. بر مبنای تشکیل کلونی‌های ES با مورفولوژی طبیعی، بیشترین غلظت‌های قابل استفاده برای کوچک مولکول‌های 5-AZA، BIX و DZNep به ترتیب ۰/۱، ۱ و ۵ میکرومولار تعیین شد.

تسهیل‌کننده تمایز (فاقد LIF و R2i) قرار گرفتند. بررسی بیان *Pdx1* اگزوزن با استفاده از پرایمرهای ویژه توالی WPRE نشان داد که در محیط پرتوانی، بیان اگزوزن تنها در حضور DZNep افزایش معنی‌دار و ۲۶/۵ برابری در مقایسه با نمونه تیمار نشده نشان می‌دهد (شکل ۴، الف). در محیط تسهیل‌کننده تمایز نیز تیمار با DZNep و 5-AZA موجب افزایش به ترتیب ۵/۹ و ۲/۵ برابری بیان اگزوزن در مقایسه با نمونه تیمار نشده، می‌شوند (شکل ۴، ب). به این ترتیب می‌توان نتیجه گرفت مهار کوچک مولکولی متیلاسیون لایزین ۲۷ هیستون سه با استفاده از DZNep، بیشترین تاثیر را در فعال کردن دوباره سیستم بیش‌بیان لنتی‌ویروسی با پروموتور CMV دارد.

با توجه به این که سه ساز و کار اپیژنتیکی مورد بررسی، مسئول غیرفعال نگه‌داشتن بسیاری از ژن‌های تمایزی در سلول ES هستند و از این طریق به حفظ شرایط بنیادینگی سلول کمک می‌کنند، مهار این ساز و کارها می‌تواند منجر به القای تمایز در سلول ES شود. از آنجا که هدف این مطالعه نیز دستیابی به ساز و کاری برای بیش‌بیان ژن‌ها در سلول ES به منظور القای تمایز بود، در ادامه، تاثیر مهارگرهای کوچک مولکولی بر بیش‌بیان *Pdx1*، به عنوان یک ژن تمایزی، مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور سلول‌های ES موشی تراریخت شده با pLenti-*Pdx1* برای مدت سه روز سلول‌ها در معرض هر کدام از کوچک مولکول‌ها و در دو محیط کشت پرتوانی (حاوی LIF و R2i) و



شکل ۴: تاثیر کوچک مولکول‌های مهارکننده مسیرهای اپیژنتیکی بر بیان *Pdx1* اندوژن و اگزوزن. الف) برای بررسی تاثیر کوچک مولکول‌های 5-AZA و DZNep روی بیان ژن *Pdx1* اگزوزن از سیستم بیانی لنتی‌ویروسی pLenti-*Pdx1* سلول‌های تراریخت شده با این لنتی‌ویروس برای مدت سه روز در محیط پرتوانی در معرض هر کدام از این کوچک مولکول‌ها قرار گرفتند. بررسی بیان اگزوزن با استفاده از پرایمرهای ویژه توالی WPRE نشان داد که تنها تیمار با DZNep موجب افزایش معنی‌دار بیان اگزوزن در این محیط شده است. ب) نتیجه تیمار سلول‌های تراریخت با کوچک مولکول‌ها در محیط تسهیل‌کننده تمایز نشان می‌دهد که بیان اگزوزن با تیمار 5-AZA و DZNep افزایش معنی‌دار داشته است. ج) بررسی بیان اگزوزن (با پرایمرهای ویژه WPRE) و *Pdx1* اندوژن (با پرایمرهای ویژه نسخه اندوژن این ژن) در حضور یا غیاب DZNep و در سلول‌های غیر تراریخت یا تراریخت شده با pLenti-*Pdx1* نشان داد که DZNep مستقیماً و مستقل از بیان *Pdx1* اگزوزن، بیان *Pdx1* اندوژن را افزایش داده است. مقدار نسبی بیان براساس نسبت بیان به نمونه ES موشی غیرتراریخت پس از نرمال شدن با بیان *Gapdh* محاسبه شده است. همه نمودارها میانگین سه تکرار و خطوط خطا (error bars) (انحراف معیار (standard deviation) را نشان می‌دهند. آزمون آماری داده‌ها در مقایسه با نمونه سلول‌های تراریخت تیمار نشده انجام گرفته و تفاوت‌های معنی‌دار با یک ستاره برای $p < 0.05$ و دو ستاره برای $p < 0.01$ گزارش شده‌اند.

تأثیر تیمار کوچک مولکول DZNep بر بیان Pdx1 اندوژن

مهار ساز و کارهای اپی ژنتیکی که مسئول خاموش نگه داشتن ژن‌های تمایزی هستند، می‌تواند منجر به فعالیت و افزایش بیان این ژن‌ها در سلول ES شود. برای این که بدانیم کوچک مولکول DZNep گذشته افزایش بیان Pdx1 اگزوژن، چه تأثیری روی بیان ژن‌های سلول داشته است، بیان Pdx1 اندوژن را در سلول‌های غیرتراریخت و تراریخت شده با pLenti-Pdx1، در حضور و در غیاب DZNep اندازه‌گیری کردیم. این آزمایش در محیط کشت تسهیل کننده تمایز انجام شد. مطابق انتظار بیان Pdx1 اگزوژن در سلول‌های غیرتراریخت تشخیص داده نشد و در سلول‌های تراریخت در حضور DZNep افزایش داشت. در حالی که تیمار با DZNep چه در سلول‌های تراریخت و چه سلول‌های غیر تراریخت، موجب افزایش دو برابری بیان Pdx1 اندوژن شد (شکل ۴، ج).

بحث

بیش بیان ژن‌ها برای بررسی تأثیر آن‌ها در فرآیندهای مختلف مرتبط با سلول ES مانند چرخه سلولی و خودنوزایی، مهار تمایز و پرتوانی، و نیز خروج از پرتوانی و تمایز به رده‌های مختلف سلولی کاربرد دارد. از آنجا که ناقل‌های لنتی ویروسی یکی از کارآمدترین روش‌های انتقال ژن به شمار می‌روند، برای انتقال ژن به سلول‌های ES نیز گزینه‌ای بالقوه مناسب هستند. پیش از این نشان داده شده بود که در انتقال لنتی ویروسی ژن به سلول‌های ES با MOI ۳۰ حدود ۴۲ درصد (۳۴) و با MOI ۵۰ کمتر از ۹۰ درصد سلول‌ها (۳۵) تراریخت می‌شوند. این در حالی است که در این مطالعه بیش از ۹۰ درصد سلول‌های ES با MOI ۱۰ و ۲۰ تراریخت شدند. این تفاوت می‌تواند ناشی از اختلاف شیوه کشت سلول‌های ES باشد؛ چرا که در مطالعات یاد شده از روش کشت سلول ES بر روی لایه سلولی فیبروبلاست جنینی موش استفاده شده بود و در اینجا ما از روش بدون لایه سلولی فیبروبلاست با استفاده از محیط حاوی مهارکننده‌های R2i استفاده نمودیم. همچنین جزئیات روش آلوده‌سازی سلول با ویروس نیز می‌تواند بر کارایی فرایند تأثیرگذار باشد (۳۶). مطالعات قبلی نتایج متفاوتی را در مورد کارایی سیستم لنتی ویروسی و پروموتور CMV گزارش کرده‌اند. در بعضی از این مطالعات عنوان شده است که استفاده از انتقال لنتی ویروسی با خاموش شدن بیان ژن همراه بوده است (۳۷، ۳۸) حال آنکه در

مورد دیگر بیان موفقیت آمیز ژن با این سیستم گزارش شده است (۱۵، ۳۴، ۳۵). در مورد پروموتور CMV نیز، هر چند در برخی مطالعات از ناکارآمدی این پروموتور در سلول‌های ES موشی خبر داده‌اند (۹، ۱۵، ۳۹)، گزارشی از بیش بیان ژن با این پروموتور نیز موجود است (۴۰، ۴۱). نتایج ما نشان می‌دهد که پس از تراریخت نمودن سلول‌های ES توسط سیستم لنتی ویروسی با پروموتور CMV بیش از ۹۰ درصد سلول‌ها ژن انتقال یافته را بیان می‌کنند. با این حال، بیان ژن پایدار نیست و با گذشت زمان خاموش می‌شود. نشان داده شده است که خاموش بودن پروموتور CMV مربوط به شرایط و سازوکارهای بنیادینگی سلول ES است، به طوری که با تمایز این سلول‌ها به سلول‌های پیش‌ساز عصبی پروموتور CMV دوباره فعال می‌شود (۱۵). همچنین پیش از این، از کوچک مولکول 5-AZA و مهار متیلاسیون DNA برای فعال کردن بیان ژن انتقال یافته با لنتی ویروس سلول‌های مختلف استفاده شده بود (۴۲، ۴۳). در مطالعه ما 5-AZA تنها در محیط تسهیل کننده تمایز موجب افزایش معنی دار در فعالیت سیستم بیانی شد. کوچک مولکول DZNep که مهارکننده خاصیت هیستون متیل ترانسفراز Ezh2 از مجموعه مهار PRC2 است، هم در محیط حاوی R2i و LIF و هم محیط بدون R2i و LIF باعث افزایش معنی دار در فعالیت سیستم بیانی شد. این نتایج با یافته‌های قبلی که نشان می‌دهند PRC2 یکی از مهمترین عوامل مهار ژن‌های تمایزی در سلول ES است (۱۸، ۳۱)، سازگاری دارد. همچنین پیش از این مشخص شده است که فعالیت هیستون متیل ترانسفراز Ezh2 در لنفوسیت‌های T می‌تواند باعث غیر فعال شدن توالی لنتی ویروسی شود (۴۴). کوچک مولکول‌های DZNep و 5-AZA علیه سلول‌های سرطانی و به عنوان یک عامل تمایزدرمانی (differentiation therapy) به کار رفته و تأثیر آن‌ها در روشن کردن ژن‌های خاموش کننده تومور (tumor repressive genes) نشان داده شده است (۲۶ و ۴۵). از سوی دیگر کوچک مولکول‌های BIX و 5-AZA برای کمک به فرآیند تمایز زدایی در باز برنامه ریزی سلولی (cell reprogramming) و تولید سلول‌های بنیادی پرتوان القایی (Induced Pluripotent Stem Cells; iPSCs) به کار رفته‌اند (۴۶ و ۴۷). با توجه به این که ژن‌های خاموش شده در سلول ES، عمدتاً ژن‌های تمایزی هستند، می‌توان انتظار داشت که تیمار این سلول‌ها با DZNep موجب افزایش بیان در این ژن‌ها شود.

gene transfer into murine embryonic stem cells by nucleofection. *Biotechnol Lett.* 2004; 26(20): 1589–92.

7. McLenachan S, Sarsero JP, Ioannou P a. Flow-cytometric analysis of mouse embryonic stem cell lipofection using small and large DNA constructs. *Genomics.* 2007; 89(6): 708–20.

8. Ribeiro SC, Mendes R, Madeira C, Monteiro G a, et al. A quantitative method to evaluate mesenchymal stem cell lipofection using real-time PCR. *Biotechnol Prog.* 2010; 26(5): 1501–4.

9. Chung S, Andersson T, Sonntag K-C, Björklund L, et al. Analysis of different promoter systems for efficient transgene expression in mouse embryonic stem cell lines. *Stem Cells.* 2002 Jan; 20(2): 139–45.

10. Eiges R, Schuldiner M, Drukker M, Yanuka O, et al. Establishment of human embryonic stem cell-transfected clones carrying a marker for undifferentiated cells. *Curr Biol.* 2001; 11:514–8.

11. Zwaka TP, Thomson J a. Homologous recombination in human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2003; 21(3): 319–21.

12. Sakuma T, Barry MA, Ikeda Y. Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J.* 2012; 443(3): 603–18.

13. Cockrell AS, Kafri T. Gene delivery by lentivirus vectors. *Mol Biotechnol.* 2007; 36(3): 184–204.

14. Somers A, Jean JC, Sommer C a, Omari A, et al. Generation of transgene-free lung disease-specific human induced pluripotent stem cells using a single excisable lentiviral stem cell cassette. *Stem Cells.* 2010; 28(10): 1728–40.

15. Hong S, Hwang D-Y, Yoon S, Isacson O, et al. Functional analysis of various promoters in lentiviral vectors at different stages of in vitro differentiation of mouse embryonic stem cells. *Mol Ther.* 2007 Sep; 15(9): 1630–9.

16. Schumacher A, Koetsier P a, Hertz J, Doerfler W. Epigenetic and genotype-specific effects on the stability of de novo imposed methylation patterns in transgenic mice. *J Biol Chem.* 2000; 275(48): 37915–21.

17. Dietz-Pfeilstetter A. Stability of transgene expression as a challenge for genetic engineering. *Plant Sci. Elsevier Ireland Ltd;* 2010; 179(3): 164–7.

18. Li M, Liu G-H, Belmonte JCI. Navigating the epigenetic landscape of pluripotent stem cells. *Nat*

بررسی تاثیر DZNep بر بیان *Pdx1* اندوژن نیز حاکی از افزایش بیان این ژن بود.

نتیجه گیری

انتقال لنتی‌ویروسی ژن‌ها به سلول‌های ES با MOI بالاتر از ۱۰، روشی مناسب برای تراریخت نمودن این سلول‌ها است. اما استفاده از لنتی‌ویروس دارای پروموتور CMV موجب کاهش و غیرفعال شدن بیان ژن در درازمدت می‌شود. برای فعال‌سازی دوباره این سیستم بیانی، می‌توان از مهار متیلاسیون لایزین ۲۷ هیستون سه با کوچک مولکول DZNep استفاده کرد. با این حال، با توجه به تاثیر DZNep بر ژن‌های تمایزی، برای استفاده از این کوچک مولکول برای فعال کردن پروموتور CMV در سلول‌های ES باید تاثیرات احتمالی تمایزی آن نیز مد نظر قرار گیرد.

تشکر و قدردانی

این طرح توسط دانشگاه تربیت مدرس و پژوهشگاه رویان در قالب طرح پژوهشی شماره ۹۱۰۰۰۱۰۲ مورد حمایت مالی قرار گرفته‌است.

منابع

- Zhu Z, Huangfu D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development.* 2013; 140(4): 705–17.
- Menendez P, Wang L, Bhatia M. Genetic manipulation of human embryonic stem cells: a system to study early human development and potential therapeutic applications. *Curr Gene Ther.* 2005; 5(4): 375–85.
- Xie X, Cao F, Sheikh AY, Li Z, et al. Genetic modification of embryonic stem cells with VEGF enhances cell survival and improves cardiac function. *Cloning Stem Cells.* 2007; 9(1): 549–63.
- Furuya M, Yasuchika K, Mizutani K-I, Yoshimura Y, et al. Electroporation of cynomolgus monkey embryonic stem cells. *Genesis.* 2003; 37: 180–7.
- Lakshminpathy U, Pelacho B, Sudo K, Linehan JL, et al. Efficient transfection of embryonic and adult stem cells. *Stem Cells.* 2004; 22(4): 531–43.
- Lorenz P, Harnack U, Morgenstern R. Efficient

- Rev Mol Cell Biol. 2012; 13(8): 524–35.
19. Lund RJ, Närvä E, Lahesmaa R. Genetic and epigenetic stability of human pluripotent stem cells. *Nat Rev Genet.* Nature Publishing Group; 2012; 13(9): 732–44.
 20. Efe J a, Ding S. The evolving biology of small molecules: controlling cell fate and identity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2011; 366(1575): 2208–21.
 21. You JS, Han JH. Targeting components of epigenome by small molecules. *Arch Pharm Res.* 2014; 37(11): 1367–74.
 22. Knapp S, Weinmann H. Small-molecule modulators for epigenetics targets. *ChemMedChem.* 2013; 8:1885–91.
 23. Issa JPI, Kantarjian HM. Targeting DNA methylation. *Clinical Cancer Research.* 2009; 15(12): 3938–46.
 24. Kubicek S, O'Sullivan RJ, August EM, Hickey ER, et al. Reversal of H3K9me2 by a small-molecule inhibitor for the G9a histone methyltransferase. *Mol Cell.* 2007 Feb 9; 25(3): 473–81.
 25. Miranda TB, Cortez CC, Yoo CB, Liang G, et al. DZNep is a global histone methylation inhibitor that reactivates developmental genes not silenced by DNA methylation. *Mol Cancer Ther.* 2009 Jun; 8(6): 1579–88.
 26. Tan J, Yang X, Zhuang L, Jiang X, et al. Pharmacologic disruption of polycomb-repressive complex 2-mediated gene repression selectively induces apoptosis in cancer cells. *Genes Dev.* 2007; 21(9): 1050–63.
 27. Hassani S-N, Totonchi M, Farrokhi A, Taei A, et al. Simultaneous suppression of TGF- and ERK signaling contributes to the highly efficient and reproducible generation of mouse embryonic stem cells from previously considered refractory and non-permissive strains. *Stem Cell Rev.* 2012 Jun; 8(2): 472–81.
 28. Hassani SN, Totonchi M, Sharifi-Zarchi A, Mollamohammadi S, et al. Inhibition of TGF Signaling Promotes Ground State Pluripotency. *Stem Cell Rev Reports.* 2014 Sep 15; 10(1): 16–30.
 29. Rassouli H, Nemati S, Rezaeiani S, Sayadmanesh A, et al. Cloning, expression, and functional characterization of in-house prepared human leukemia inhibitory factor. *Cell J.* 2013; 15(2): 190–7.
 30. Smith ZD, Meissner A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet.* 2013; 14(3): 204–20.
 31. Boyer L a, Plath K, Zeitlinger J, Brambrink T, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006 May 18; 441(7091): 349–53.
 32. Mikkelsen TS, Ku M, Jaffe DB, Issac B, et al. Genome-wide maps of chromatin state in pluripotent and lineage-committed cells. *Nature.* 2007 Aug 2; 448(7153): 553–60.
 33. Kang Y-K. SETDB1 in Early Embryos and Embryonic Stem Cells. *Curr Issues Mol Biol.* 2014; 17:1–10.
 34. Kosaka Y, Kobayashi N, Fukazawa T, Totsugawa T, et al. Lentivirus-based gene delivery in mouse embryonic stem cells. *Artif Organs.* 2004 Mar; 28(3): 271–7.
 35. 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: 2140–5.
 36. Zhang B, Metharom P, Jullie H, Ellem KA, et al. 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; 2:6.
 37. Xia X, Zhang Y, Zieth CR, Zhang S. Transgenes delivered by lentiviral vector are suppressed in human embryonic stem cells in a promoter-dependent manner. *Stem Cells Dev.* 2007; 16(1): 167–76.
 38. Ma Y, Ramezani A, Lewis R, Hawley RG, et al. High-level sustained transgene expression in human embryonic stem cells using lentiviral vectors. *Stem Cells.* 2003; 21(1): 111–7.
 39. Kawabata K, Sakurai F, Yamaguchi T, Hayakawa T, et al. Efficient gene transfer into mouse embryonic stem cells with adenovirus vectors. *Mol Ther.* 2005 Sep; 12(3): 547–54.
 40. Sheik Mohamed J, Gaughwin PM, Lim B, Robson P, et al. Conserved long noncoding RNAs transcriptionally regulated by Oct4 and Nanog modulate pluripotency in mouse embryonic stem cells. *RNA.* 2010; 16(2): 324–37.
 41. Ward CM, Stern PL. The human cytomegalovirus immediate-early promoter is transcriptionally active in undifferentiated mouse

- embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2002; 20(5): 472–5.
42. Swindle CS, Klug CA. Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors. *J Hematother Stem Cell Res*. 2002; 11(3): 449–56.
43. Hofmann A, Kessler B, Ewerling S, Kabermann A, et al. Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther*. 2006; 13: 59–66.
44. Friedman J, Cho W-K, Chu CK, Keedy KS, et al. Epigenetic Silencing of HIV-1 by the Histone H3 Lysine 27 Methyltransferase Enhancer of Zeste 2. *J Virol*. 2011; 85(17): 9078–89.
45. Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy. *Oncogene*. 2002; 21(35): 5483–95.
46. Shi Y, Despons C, Do JT, Hahm HS, et al. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic Fibroblasts by Oct4 and Klf4 with Small-Molecule Compounds. *Cell Stem Cell*. 2008; 3(5): 568–74.
47. Mikkelsen TS, Hanna J, Zhang X, Ku M, et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature*. 2008; 454(7200): 49–55.

The Effect of Small Molecule Mediated Epigenetic Modulations on Gene Overexpression with Lentiviral System in Embryonic Stem Cells

Basiri M, M.Sc.^{1,2}, Behmanesh M, Ph.D.^{1*}, Tahamtani Y, Ph.D.², Moradmamand A, M.Sc.²,
Baharvand M, Ph.D.^{2,3*}

1. Department of Genetics, Faculty of Biological Science, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran
2. Department of Stem Cells and Developmental Biology at Cell Science Research Center, Royan Institute for Stem Cell Biology and Technology, ACECR, Tehran, Iran
3. Department of Developmental Biology, University of Science and Culture, ACECR, Tehran, Iran

* Email corresponding authors: behmanesh@modares.ac.ir, baharvand@royaninstitute.org

Received: 8 Feb. 2015

Accepted: 10 Mar. 2015

Abstract

Aim: In this study the efficiency of lentiviral gene transfer and cytomegalovirus promoter mediated overexpression has been investigated. Furthermore, the effect of small molecule-mediated inhibition of epigenetic pathways on gene overexpression has been studied.

Materials and Methods: Mouse ES cells were transduced with different doses of lentiviruses harboring Green Fluorescent Protein (GFP) and the percentage of GFP expressing cells was quantified with flowcytometry. The persistence of GFP expression was assessed after 8 days of transduction. Using embryonic stem (ES) cells transduced with a lentiviral vector harboring pancreatic and duodenal 1 (*Pdx1*) gene, we studied the influence of 5-azacytidin (5-AZA), DZNep, and BIX01294 small molecules on the gene expression system.

Results: Lentiviral mediated gene transfer to ES cells with 10 and 20 multiplicities of infection (MOI) resulted in more than 90 percent transgenesis. However, the expression of transgene showed a dramatic decrease during 8 days of post-transduction. Treatment with 5-AZA leads to a 2.5 folds increase in the transgene expression in a permissive culture medium. DZNep also elevated the transgene expression up to 26.5 and 5.9 folds in pluripotency and permissive media respectively. The expression of endogenous *Pdx1* gene also increased following DZNep treated.

Conclusion: Lentiviral transduction with MOIs more than 10, is an efficient method for transgenesis of mouse ES cells. However, co-application of this method along with the CMV promoter leads to inactivation of the gene expression in long term. DZNep treatment results in reactivation of transgene expression but also can influence the expression of endogenous genes.

Keywords: Cytomegalovirus, Embryonic stem cells, Genetic vectors, Lentivirus, Transgene