

## Genetically modified mice- Methods, applications and outlook

Eskandarian Boroujeni M<sup>1</sup>, Alizadeh R<sup>2</sup>, Afkhami F<sup>3</sup>, Tavakol Z<sup>4</sup>, Shamsara M<sup>5</sup>

1. Department of Stem Cells and Regenerative Medicine, Faculty of Medical Biotechnology, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran.

2. Assistant Professor, ENT and Head & Neck Research center and department, Hazrat Rasoul Hospital, The Five Senses Institute, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran.

3. Department of Medical Genetics, Faculty of Medical Sciences, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran.

4. Assistant Professor, Department of Midwifery, Faculty of Nursing and Midwifery, Shahrekord University of Medical Sciences, Shahrekord, Iran.

5 Assistant Professor, National Research Center for Transgenic Mouse, National Institute of Genetic Engineering and Biotechnology, Tehran, Iran, (Corresponding Author) Tel: +98-21-44787414, Email: shamsa@nigeb.ac.ir

### ABSTRACT

**Background & Aim:** Transgenic mice, of tengerated by random integration of foreign genes into the mouse genome or by targeted mutation in a particular gene, have demonstrated to be a very effective tool for studying gene function in living things. In this review article, we discussed on the current methods of generating genetically-modified mice and their related problems and then investigated the new methods developed to overcome these problems. Finally, we discussed future prospects on the gene targeting.

**Methods & Materials:** This is a review article, which has been written after searching Pubmed, Scopus, Google Scholar, Springer, Elsevier and Magiran databases by using keywords of transgenic mice, functional genetics, genotargeting, and homologous recombination.

**Results:** This study dealt with genetic variations in a wide range, differential processing and inactivation of gene-specific isoforms, local and induced genetic changes, Cre/loxP system and some future perspectives.

**Conclusion:** Success rate in genetic modification of mouse genome has increased dramatically, and use of knockout mice has resulted in increased knowledge of human biology and diseases.

**Keywords:** Transgenic mice, Functional genetics, Genes targeting, Homologous recombination

**Receivied: Jan 10, 2019**

**Accepted: May 27, 2019**

**How to cite the article:** Eskandarian Boroujeni M, Alizadeh R, Afkhami F, Tavakol Z, Shamsara M. Genetically modified mice- Methods, applications and outlook. SJKU 2019; 24 (1): 24-44.

## موش‌های تراریخته - روش‌ها، کاربردها و چشم انداز

مهدی اسکندریان بروجنی<sup>۱</sup>، رفیعه علیزاده<sup>۲</sup>، فاطمه افخمی<sup>۳</sup>، زینب توکل<sup>۴</sup>، مهدی شمس‌آرا<sup>۵</sup>

۱. دپارتمان سلول‌های بنیادی و پزشکی بازساختی، دانشکده بیوتکنولوژی پزشکی، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست فناوری، تهران، ایران.
۲. استادیار، مرکز تحقیقات گوش، گلو، بینی و سرو گردن، بیمارستان حضرت رسول اکرم (ص)، پژوهشکده سلامت حواس پنجگانه، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی ایران، تهران، ایران.
۳. گروه ژنتیک پزشکی، دانشکده پزشکی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران.
۴. استادیار، گروه مامایی، دانشکده پرستاری و مامایی، دانشگاه علوم پزشکی شهرکرد، شهرکرد، ایران.
۵. استادیار، مرکز ملی تحقیقات موش تراریخت، پژوهشگاه ملی مهندسی ژنتیک و زیست‌فناوری، تهران، (نویسنده مسئول) تلفن ثابت: ۰۲۱-۴۴۷۸۷۴۱۴، ایمیل: shamsa@nigeb.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** موش‌های تراریخته، که اغلب توسط ادغام تصادفی یک ژن خارجی به درون ژنوم‌شان و یا توسط جهش هدفمند در یک ژن ویژه بوجود می‌آیند، ابزار بسیار موثری برای مطالعه عملکرد ژن، در بدن موجود زنده می‌باشند. در این مقاله مروری، ابتدا روش‌های رایج تولید موش‌های تراریخته و مشکلات مرتبط با آنها مورد بررسی قرار می‌گیرد و سپس روش‌های جدیدی که برای غلبه بر این مشکلات توسعه یافته‌اند، مورد کنکاش قرار می‌گیرند و در انتها چشم اندازه‌های آتی درباره هدف‌گیری ژنها مطرح می‌شوند.

**روش بررسی:** این مطالعه به صورت مروری در پایگاه‌های اطلاعاتی Pubmed, Scopus, Google Scholar, Magiran و Springer, Elsevier و با استفاده از کلمات کلیدی transgenic mice, functional genetics, target genes, homologous recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده است.

**یافته‌ها:** در این مطالعه به بررسی تغییرات ژنی در سطح وسیع، پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم‌های اختصاصی ژن، تغییرات ژنی القایی و موضعی، سیستم Cre/loxP و برخی چشم اندازه‌های آتی پرداخته شده است.

**نتیجه‌گیری:** میزان موفقیت برای دست‌ورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است و استفاده از موش‌های ناک اوت<sup>۱</sup> منجر به کسب دانش عظیمی در زمینه زیست‌شناسی انسان و بیماری‌ها گردیده است.

**واژه‌های کلیدی:** موش‌های تراریخته، ژنتیک عملکردی، هدف‌گیری ژنها، نو ترکیبی همولوگ

وصول مقاله: ۹۷/۹/۲۱ اصلاحیه نهایی: ۹۷/۱۲/۱ پذیرش: ۹۷/۱۲/۸

<sup>1</sup>Knockout Mice

## مقدمه

امروزه با شناسایی توالی ژنوم انسان و موش، توجه به روی کشف عملکرد ژنها و تاثیر آن ها بر سلامتی انسان متمرکز شده است، چراکه ممکن است این ژنها نقش درمانی و یا پیشگیری کننده ایفا کنند (۱،۲). آنالیز جهش های ژنتیکی القایی در موجوداتی نظیر کرمها، حشرات، ماهی گوره خری<sup>۲</sup> و موش، درک و شناخت ما را از عملکرد ژنها در این موجودات به میزان قابل توجهی افزایش داده است. از میان این موجودات مدل، موش مزیت های ویژه ای را برای مطالعه بیماری ها در انسان ارایه می دهد. نخست آنکه، موش جزء پستانداران محسوب میشود و از لحاظ تکوین، فیزیولوژی، رفتار و بیماریها اشتراکات قابل توجهی با انسانها دارد؛ دوم آنکه، تقریباً ۹۹٪ ژنهای موش دارای همولوگ در انسان هستند؛ و بالاخره، ژنوم موش دارای این ویژگی است، که از جهش زایی هدفمند در برخی از ژنهای ویژه که توسط نو ترکیبی همولوگ در سلولهای بنیادی جنینی<sup>۳</sup> (ESCs) صورت می پذیرد، پشتیبانی می کند، که این امر باعث می شود که ژنها بطور کارآمد و دقیقی تغییر داده شوند.

این مقاله مروری، ابتدا به بررسی مشکلات عمومی مرتبط با ایجاد موش های تراریخته می پردازد، و سپس، چندین روش جدید و پیشرفته را که برای غلبه بر مشکلات کنونی توسعه یافته اند، را مورد بحث قرار می دهد.

## روش بررسی

این مطالعه به صورت مروری در پایگاه های اطلاعاتی Pubmed, Scopus, Google Scholar, Springer, Elsevier و Magiran و با استفاده از کلمات کلیدی transgenic mice, functional genetics, target genes, homologous

<sup>2</sup>Zebrafish<sup>3</sup>Embryonic Stem Cells

recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده

است.

## یافته ها

## تغییرات ژنی در سطح وسیع

غیرفعال سازی ژن در سطح وسیع در موشها، بوسیله نو ترکیبی همولوگ در ESCs صورت می پذیرد. در این روش، معمولاً اگزون های مهم و یا کل ژن ( بسته به اندازه آن) بوسیله یک نشانگر انتخابی، که در اکثر موارد کاست مقاومتی نومایسین<sup>۴</sup> است، جایگزین می شود (۳). در ذیل برخی از مسایل مرتبط با این روش مورد بررسی قرار می گیرد.

نخست، در موشهای ناک اوت سنتی، حذف ژنی در تمام مراحل رشد و تکوین موش و در همه سلولهای آن وجود دارد. این امر اغلب باعث ایجاد مشکلاتی در تکوین میشود، که برخی از آنها می توانند کشنده باشند و توانایی ما را برای مطالعه فنوتیپ محدود کند. بعنوان مثال، مسیر علامت دهی Wnt نقش مهمی در تکوین جنینی بسیاری از گونه ها ایفا می کند. برای نمونه این مسیر برای تکوین صحیح اندامهایی مانند مغز، دستگاه گوارش، کبد، قلب، پوست و استخوان مورد نیاز است. بسیاری از مدل های ناک اوت موشی، که در آنها ژنهای مسیر علامت دهی Wnt دست ورزی شده است، در طی جنین زایی و یا بلافاصله بعد از تولد می میرند، که این مسئله باعث ایجاد محدودیت در مطالعات مسیر علامت دهی Wnt می شود (۴). دوم، فقدان عملکرد یک ژن ویژه، اغلب توسط بیان تغییر یافته سایر ژنها جبران می شود، که تفسیر نقش اصلی ژن تغییر یافته را دشوار می سازد (۵).

این مشکلات مرتبط با موشهای ناک اوت سنتی، توسط استراتژی های هدفگیری ژن بصورت القایی و موضعی حل شده است. بعلاوه تجربیات ما در مورد موشهای هدف

<sup>4</sup>Neomycin Resistance Cassette

گیری شده ژنی، اهمیت سابقه ژنتیکی مدل‌های موشی جدید و همچنین اهمیت انتخاب صحیح موش‌های کنترل طبیعی را برای ما آشکار نمود (۶).

**سابقه ژنتیکی**

سابقه ژنتیکی موش‌های مدل، اغلب اثر قابل توجهی بروی فنوتیپ دارد. مسلماً، بیان محصولات ژن‌های جبران‌کننده و تعدیل‌کننده، فنوتیپ اولیه که توسط روش هدف‌گیری ژن ایجاد شده، را بطور وسیعی تحت تاثیر قرار می‌دهد. اکثر ESCs موشی از سویه‌های ۱۲۹ مانند SV۱۲۹ مشتق شده‌اند. موش‌های این سویه همگی رنگ موی آگوتی دارند. برای تشخیص انتقال آلل جهش یافته به سلول‌های جنسی براساس رنگ موی موش، سلول‌های بنیادی حامل آلل جهش یافته به بلاستوسیسست‌های گرفته شده از موش سیاه رنگ (مثل C57BL/6) تزریق می‌شوند تا موش‌های کایمر متولد شوند. بک کراس<sup>۵</sup> کایمرها، که حامل آلل جهش یافته هستند، با سویه‌ای که خواهان بررسی صفت در آن هستیم باعث می‌شود تا سابقه ژنتیکی مورد نظر بدست آید. برای رسیدن از یک رده با سابقه ژنتیکی مخلوط به رده‌ای با سابقه ژنتیکی نسبتاً خالص نیاز به ۹ الی ۱۰ نسل زاد و والد نیاز است. این امر ممکن است تا ۲ سال طول بکشد، بنابراین، بهتر است آزمایشات اولیه در موش‌هایی که سابقه ژنتیکی مخلوط کمتری دارند انجام شوند (۷-۹).

**پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم‌های اختصاصی ژن**

برای هدف‌گیری ژن، بررسی کاملی از ساختار ژن و رونوشت‌های متعدد و محتمل آن مورد نیاز است. بنابراین، رابطه "یک ژن، یک پروتئین" اغلب نادرست است، چرا که یک ژن ممکن است، چندین رونوشت و یا گونه‌های متغیر یک پروتئین را تولید کند. پردازش افتراقی رونوشت اولیه، فرایندی رایج و مختص سلول می‌باشد. این فرایند، منجر به تولید پروتئین‌هایی می‌گردد، که تعداد آنها از تعداد

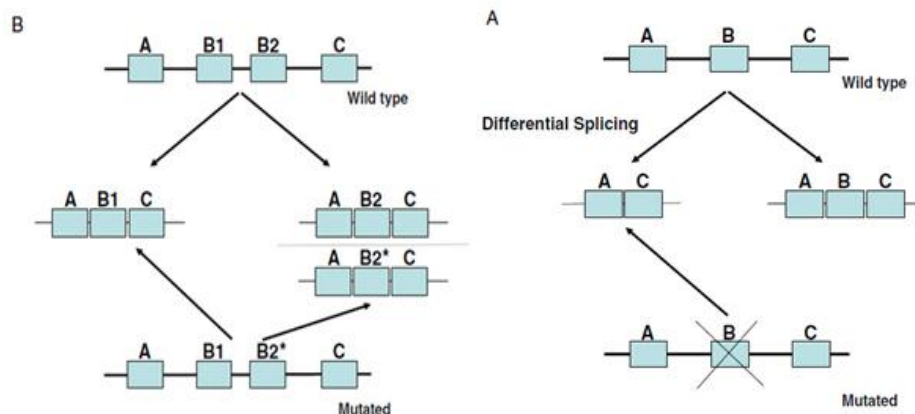
ژنهای موجود در ژنوم به مراتب بیشتر است. تخمین زده می‌شود که بیش از ۵۰٪ همه رونوشت‌های اولیه انسانی، فرایند پردازش افتراقی را پشت سر می‌گذارند، که ممکن است این مطلب برای سایر پستانداران نیز صادق باشد (۱۰). بسته به طراحی وکتور هدف، هدف‌گیری ژن بصورت کلاسیک می‌تواند/نمی‌تواند، تمام ایزوفرم‌های یک پروتئین که مشتق شده از ترجمه رونوشت‌های مختلف است، را مختل نکند. بنابراین، راهکارهایی توسعه یافتند، که بتوانند بطور اختصاصی ایزوفرم‌های مختلف یک پروتئین را که مشتق شده از یک رونوشت اولیه هستند، را غیر فعال سازد. همانطور که در شکل ۱ شرح داده شده است، حداقل دو وضعیت مختلف بایستی در نظر گرفته شود. نخست، اگر پردازش افتراقی منجر به ایجاد یک اگزون اضافه شود، روش هدف‌گیری بایستی این اگزون را نشانه گرفته و آن را حذف کند. دوم، اگر دستگاه پردازش از گونه‌های مختلف یک اگزون مشخص استفاده می‌کند، تعداد اگزونها در رونوشت‌ها باید برای همگی یکسان باشد. برای این منظور، استراتژی برای غیرفعال کردن یک رونوشت منفرد توسعه یافته است. با کمک روش ناک این<sup>۶</sup>، یک کدون پایان در چارچوب خواندن اگزون مربوطه وارد میشود که منجر به پایان زودرس ترجمه می‌شود. در بقیه ایزوفرم‌ها، اگزون جهش یافته بعنوان یک توالی ایترونی از رونوشت خارج شده، که در نهایت رونوشت‌های طبیعی، تغییر نیافته باقی می‌مانند (۷). متأسفانه، این روش غیرفعال کردن ایزوفرم‌ها، امکان ایجاد جهش‌های دوتایی را بوسیله تولید جهش‌های منفرد فراهم نمی‌سازد ( بطور مثال غیرفعال کردن همزمان دو ایزوفرم). بعلا پیوستگی نزدیک گونه‌های مختلف یک اگزون مشخص، آلل جهش یافته همواره همراه اگزون(های) طبیعی متناوب است.

## پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم‌های اختصاصی ژن

برای هدف‌گیری ژن، بررسی کاملی از ساختار ژن و رونوشت‌های متعدد و محتمل آن مورد نیاز است. بنابراین، رابطه "یک ژن، یک پروتئین" اغلب نادرست است، چرا که یک ژن ممکن است، چندین رونوشت و یا گونه‌های متغیر یک پروتئین را تولید کند. پردازش افتراقی رونوشت اولیه، فرایندی رایج و مختص سلول می‌باشد. این فرایند، منجر به تولید پروتئین‌هایی می‌گردد، که تعداد آنها از تعداد

<sup>6</sup> Knockin

<sup>5</sup>Backcross



**شکل ۱. پردازش افتراقی.** a. در این مثال، پردازش افتراقی منجر به ایجاد یک اگزون اضافه شده است (exon B). در این مورد، روش هدفگیری، اگزون B را نشانه گرفته و آن را حذف می کند و پردازش طبیعی رونوشتی محتوی اگزون های A و C را ایجاد میکند. b. در این مورد، دستگاه پردازش از گونه های مختلف اگزون B (B1 و B2) استفاده می کند. بطور مثال، برای غیرفعال اختصاصی رونوشت حاوی اگزون B2، یک آلل جهش یافته دارای کدون پایان در چارچوب خواندن اگزون B2 (B2\*) وارد میشود، که منجر به پایان زودرس ترجمه می شود. رونوشت حاوی B1، B2\* بعنوان یک توالی اینترونی از رونوشت خارج شده، که در نهایت رونوشت طبیعی دارای اگزون B1، باقی می ماند (v).

### تغییرات ژنی القایی و موضعی

سیستم Cre/loxP و سایر سیستم های ریکامیناز<sup>۷</sup> مشتق شده از فاژ با در نظر گرفتن مشکلات مرتبط با غیرفعال سازی ژن بطور وسیع، نظیر مرگ در حالت جنینی، روشهای توسعه یافتند که جهش هایی که محدود به اندامها و بافت های ویژه هستند، را امکان پذیر می سازند و در عین حال بیان ژن طبیعی را در بقیه بدن حفظ می کنند. این روشها براساس فعالیت ریکامیناز مبتنی بر جایگاه ویژه هستند، که بیان آنها براساس پروموتورهای اختصاصی بافتها کنترل می شود. ریکامیناز Cre فراوانترین آنزیمی است، که بدین منظور استفاده می شود (۱۱). ریکامیناز Cre یک توپوایزومراز<sup>۱</sup> گرفته شده از باکتریوفاژ P1 است، که نوترکیبی در جایگاه های ویژه DNA که بین توالی های شناسایی خاص قرار گرفته اند، را کاتالیز می نماید (۱۲). توالی ویژه Cre، یعنی loxP<sup>۸</sup> شامل یک توالی ژنتیکی ۲۴ بازی است که در ژنوم موش طبیعی وجود ندارند. همانطور که در شکل ۲

<sup>7</sup> Recombinase

<sup>8</sup> Locus of X-over of P1

نشان داده شده، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاه های loxP منجر به حذف توالی ژنتیکی میانه شده (loxP) در جهت های یکسان قرار میگیرد) و یا منجر به وارونه سازی توالی ژنتیکی قرار گرفته بین جایگاه های loxP می شود (loxP) در جهت های مختلف قرار میگیرد). گرچه، این سیستم از پروکاریوتها گرفته شده است، ریکامیناز Cre در سلولهای یوکاریوتی هم فعال است، و به سهولت به هسته سلول انتقال می یابد و نیازی به کوفاکتور ندارد. بنابراین، ایجاد حذف ژنی بطور موضعی در موش مستلزم ایجاد دو رده موشی مستقل می باشد: یک رده موشی، که ریکامیناز Cre را تحت کنترل یک پروموتور ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که ژن مورد نظر (و یا اگزون های مهم این ژن) در کنار جایگاه های loxP قرار گرفته اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. با وجود سادگی و قدرتمندی سیستم های Cre/loxP چندین اشکال وجود دارد. نخست، سیستم های Cre/loxP هیچگونه کنترلی روی زمان نوترکیبی در حین تکوین موش ندارند. دوم، بسیاری از

Cre را مشخص می‌سازد، ولی الزاما مشخص نمی‌کند که موشی با بیان Cre برای حذف سایر توالی که در جایگاه loxP قرار گرفته اند مناسب می باشد یا نه. بنابراین یک موش با بیان Cre ممکن است، بخوبی توالی که در جایگاه loxP قرار گرفته (مثل توالی پایان در گونه گزارشگر) را حذف نماید، ولی برای توالی‌های دیگر موفق عمل نکند. بهره‌گیری از ریکامینازهای گرفته شده از فاژها برای هدف‌گیری ژنها تنها محدود به ریکامیناز Cre نیست. در واقع، ریکامیناز Dre که از باکتریوفاژ D6 بدست آمده است بطور موثری نوترکیبی در جایگاه‌های rox در سلولهای یوکاریوتی و موش را انجام می‌دهد (۱۵، ۱۴). قابل ذکر است، که Dre و Cre با توالی شناسایی یکدیگر واکنش نمی‌دهند و بنابراین، این امر مزیتی برای انجام دو رویداد مستقل نوترکیبی در یک رده موشی می باشد. مشابه Dre، ادغامگر  $\Phi C31^{12}$  که همچنین از باکتریوفاژ گرفته شده است، در حذف‌های ژنی در موش موفق عمل می‌کند (۱۶). بطور کلی ادغامگر  $\Phi C31$  وظیفه حذف توالی ژنتیکی که در کنار جایگاه‌های شناسایی attP و attB قرار گرفته اند را برعهده دارد. زمانیکه سیگنال مکان‌یابی هسته<sup>۱۳</sup> به این ادغامگر وصل می‌شود به نظر می‌رسد کارآمدی آن در حذف توالی ژن هدف، مشابه ریکامیناز Cre باشد (۱۷). با در نظر گرفتن تعداد اندک رده‌های موشی که توسط Dre و  $\Phi C31$  ایجاد شده اند، هنوز بسیار زود است که یک قضاوت روشنی در مورد اینکه آیا این سیستم‌های جایگزین، کارآمدی سیستم Cre/loxP را دارند، داشته باشیم.

پروموتورهای اختصاصی بافتی، اجازه بیان ریکامیناز Cre به میزان کافی را در تمام سلولهای یک بافت مشخص را نمی‌دهند، تا فرایند حذف ژنی بطور موثر رخ دهد. بنابراین، ممکن است نوترکیبی به میزان متفاوت در یک بافت مشخص رخ دهد، که این امر منجر به ایجاد الگوهای حذف ژنی بطور موزاییکی می‌گردد. سوم، کارآمدی حذف ژنی، وابسته به جایگاه ژنتیکی است، که در آن، loxP واقع شده است. بنابراین، دسترس‌ریکامیناز Cre به جایگاه loxP، وابسته به ساختار سوم DNA است. برخی از مناطق DNA ژنومیک به نوترکیبی مبتنی بر Cre نسبتا مقاوم است و باعث کارآمدی کم نوترکیبی میشود. متاسفانه، این مسئله کاملا غیرقابل پیش‌بینی است. همانطور که در موشهای تراریخته کلاسیک دیده می‌شود، بیان Cre، تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی، وابسته به جایگاه ادغام قطعه خارجی است. روش رایج این است که چندین رده موشی که Cre را بیان می‌کنند، ایجاد شود و سپس میزان بیان و مکان Cre ارزیابی گردد، تا موثرترین رده برای آمیزشهای آتی با رده موشی دارای جایگاه loxP، شناسایی گردد. ارزیابی مکان و فعالیت Cre در بدن موجود زنده، توسط "موشهای گزارشگر"<sup>۹</sup> صورت می‌پذیرد. در این تکنیک، رده موشی با بیان Cre با رده موشی دیگر که در آن یک قطعه خارجی گزارشگر (نظیر بتا گلوکتوزیداز<sup>۱۰</sup>، پروتئین فلورسانس سبز<sup>۱۱</sup>) تحت کنترل پروموتورهای قوی بیان می‌شود، آمیزش داده می‌شود (۱۳). در غیاب فعالیت Cre، بیان این گزارشگر توسط حضور یک توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، بلوکه می‌شود. وقتی که توالی پایان توسط ریکامیناز Cre حذف می‌شود، گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می‌شود (شکل ۳). متاسفانه گرچه این روش مکان فعالیت

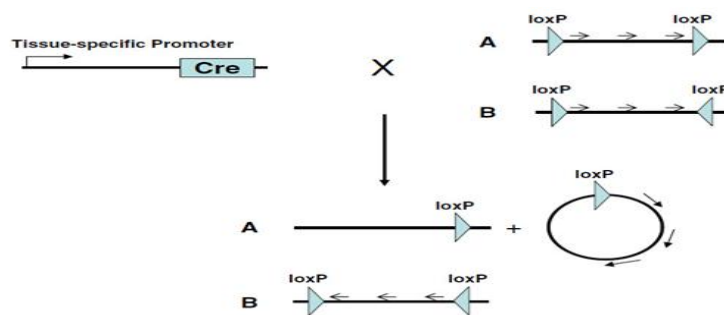
<sup>12</sup>Integrase

<sup>13</sup>Nuclear Localization Signal

<sup>9</sup>Reporter Mice

<sup>10</sup> $\beta$ -galactosidase

<sup>11</sup>Green Fluorescent Protein(GFP)



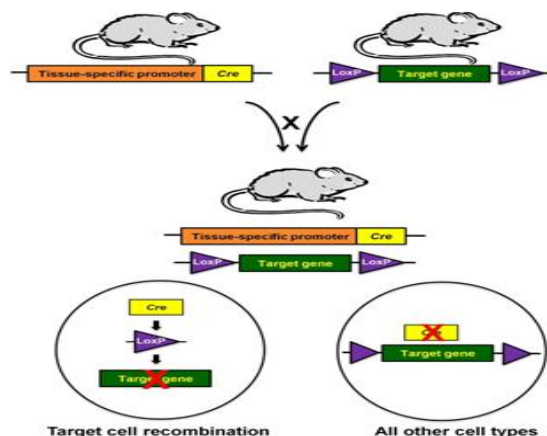
شکل ۲. سیستم Cre/loxP. ایجاد حذف ژنی بطور موضعی در موش مستلزم ایجاد دو رده موشی مستقل می باشد: یک رده، که ریکامیناز Cre را تحت کنترل یک پرموتور ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که در طرفین ژن مورد نظر جایگاه‌های loxP قرار گرفته‌اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند، تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. در مورد a، loxP در جهت‌های یکسان قرار می‌گیرد، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاه‌های loxP منجر به حذف توالی ژنتیکی میانه شده است. در مورد b، loxP در جهت‌های مختلف قرار می‌گیرد، و نوترکیبی مبتنی بر Cre منجر به وارونه سازی توالی ژنتیکی قرار گرفته بین جایگاه‌های loxP می شود (v).

## سیستم Cre/loxP: روشی مفید برای دنبال کردن

### دودمان سلولی

جدا از سودمندی این سیستم در هدف‌گیری ژن‌ها، می‌توان از سیستم Cre/loxP برای دنبال کردن دودمان سلولی در حین رشد و تکوین بهره برد. بدین منظور، Cre برای حذف غیر قابل برگشت توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته اند، استفاده می‌شود، که منجر به فعال سازی بیان گزارشگر در دودمان سلولی مورد نظر می‌گردد. بنابراین، در طی تکوین هر زمان Cre فعال شد، همه سلولهایی که از آن سلول ویژه منشا می‌گیرند، ژن گزارشگر را بیان می‌کنند، صرف نظر از اینکه آیا هنوز بیان Cre در آن سلولها وجود دارد یا ندارد. این روش برای دنبال کردن سرنوشت سلولهایی که پروتئاز رنین<sup>۱۴</sup> را در طی تکوین جنینی بیان می‌کنند، مورد استفاده قرار گرفته است (۱۸).

<sup>14</sup>Protease Renin



**شکل ۳. تولید موشهای Cre/loxP.** در این روش، رده موشی با بیان Cre که تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی است با رده موشی دیگر که حاوی یک قطعه خارجی گزارشگر (نظیر پروتئین فلورسانس سبز) است، آمیزش داده می شود. در غیاب فعالیت Cre، بیان این گزارشگر توسط حضور یک توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، بلوکه می شود. وقتی که توالی پایان توسط ریکامیناز Cre حذف می شود، ژن گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می شود [۴۱].

دو دست‌ورزی ژنتیکی مستقل در یک رده موشی منفرد را فراهم سازند.

### غیرفعال سازی ژن بصورت القایی ( گیرنده های استروژنی، سیستم tet)

سیستم های Cre و Flp، غیرفعال سازی ژن بطور موضعی را فراهم می سازند. هرچند، هیچ کنترلی روی زمان نوترکیبی وجود ندارد. چراکه بیان و فعالیت Cre کلا به پروموتورهای اختصاصی بافت انتخابی بستگی دارد. از اینرو، فعالیت Cre و متناوبا غیرفعال سازی ژن در بافت هدف ممکن است، در مراحل اولیه تکوین جنینی روی دهد، که منجر به فعال سازی سیستم های جبرانی می شود، که ممکن است تفسیر فنوتیپ حاصله را دشوار سازد. همچنین، غیرفعال سازی ژن در زمان جنینی منجر به مرگ می شود. بهره گیری از سیستم سنتی Cre برای حذف ژن بطور موضعی ممکن است منجر به پیچیده شدن شرایط شود، چراکه پروموتور اختصاصی بافتی که فعالیت Cre را در موش بالغ کنترل می کند، ممکن است این پروموتور، در طی

### سیستم Flp/FRT: آنالوگ یوکاریوتی سیستم Cre/loxP

سیستم Flp/FRT یک جایگزین برای سیستم Cre/loxP است. Flp، یک ریکامیناز یوکاریوتی است، که از مخمر گرفته می شود. مشابه Cre، Flp می تواند برای حذف توالی ژنتیکی که در کنار همولوگ loxP یعنی FRT قرار گرفته اند، استفاده شود. در مقایسه با Cre، کارآمدی نوترکیبی در سیستم Flp/FRT ضعیف است. از اینرو، با ایجاد جهش هایی در Flp، باعث پایداری بهتر آن در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  و بهبود کارآمدی نوترکیبی در ژنوم موش شده اند (۱۷). تاکنون، مدل های موشی کمی با استفاده از سیستم Flp/FRT تولید شده اند، و هنوز مشخص نیست، این مسئله بعلت کارآمدی ضعیف سیستم Flp/FRT است و یا اینکه این روش جدید بایستی با سیستم شناخته شده Cre/loxP رقابت کند. با اینحال، بنظر می رسد سیستمهای Flp/FRT و Cre/loxP با یکدیگر واکنش نمی دهند، و بنابراین این سیستم ها ممکن است امکان موفقیت در ایجاد



عملیات حذف قطعه ژنتیکی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، را انجام می دهد. گرچه، در اصل این روش کنترل زمانی را برای تحریک رویداد نوترکیبی فراهم می سازد، اما بسته به نوع سلول و سایر عوامل ناشناخته نقاط ضعفی در این سیستم وجود دارد. بعنوان مثال، ریکامیناز Cre ممکن است، در غیاب OH-4 تاموکسیفن وارد هسته سلولی شود. گزارشاتی موجود است که این فعالیت پیش زمینه Cre، بوسیله اتصال Cre به دو جایگاه گیرنده استروژن رفع شده است (۱۹). همچنین، گرچه این روش کنترل زمانی خوبی را برای تحریک رویداد نوترکیبی فراهم می سازد، اثرات زیستی حذف ژن، نهایتاً به نیمه عمر پروتئین های هدف بستگی دارد، و پروتئین های پایدار با عمر بیشتر ممکن است، وقفه های زمانی قابل توجهی از زمانیکه ژن حذف می شود، تا زمانیکه پروتئین مورد نظر حذف می شود، را ایجاد کنند. اگرچه، این امر ممکن است، اهمیت ناچیزی در موش های بالغ داشته باشد، اما می تواند سنجش عملکردهای ژنی را در حین تکوین جنینی دچار اشتباه سازد. مشکل بعدی مربوط به اثرات جانبی اعمال OH-4 تاموکسیفن در موشها برای تحریک نوترکیبی می باشد. معمولاً، OH-4 تاموکسیفن زمانیکه در یک دوز منفرد اعمال می شود، مشکلی ایجاد نمی کند. اما تزریق مکرر آن، در موشها باعث سمیت قابل توجهی بویژه در کبد می شود. ارزیابی اصولی اثرات جانبی دوزهای OH-4 تاموکسیفن، برای انجام آزمایشات هدف گیری ژنی بسیار مفید می باشد (۲۰).

برخلاف سیستم Cre/گیرنده استروژن، سیستم tet رونویسی ژن Cre را کنترل می کند. سیستم tet به دو دسته tet-on و tet-off تقسیم می شود. در هر دو این سیستم ها، از یک پروموتور فراگیر و یا اختصاصی بافت بهره برده می شود، تا یک پروتئین ترکیبی، مرکب از قلمروهای اتصال به DNA یعنی tTA یا rtTA و پروتئین فعال

تکوین در بافتهایی بجز آن بافتهایی که در مرحله بالغ وجود دارند فعال باشد؛ و این مسئله موجب حذف ناگهانی ژن در تمام سلولهای آن دودمان سلولی می شود.

این مشکلات منجر به توسعه روشهای جایگزین برای حذف ژن بصورت وسیع و یا موضعی شده است. در حال حاضر، دو روش وجود دارد که می توانند حذف ژنی را در زمان مشخص در موش انجام دهند: سیستم Cre/گیرنده استروژن و سیستم وابسته به ترانسایکلین<sup>۱۵</sup>.

سیستم Cre/گیرنده استروژن، براساس ماهیت گیرنده های استرویدی استوار است، که بطور عمومی در سیتوپلاسم واقع شده اند. زمانیکه لیگاندهای مربوطه به گیرنده خود متصل می شوند، این کمپلکس به هسته سلولی منتقل می یابد تا رونویسی از ژن را القا کند. بنابراین، زمانیکه ریکامیناز Cre به یک گیرنده استرویدی متصل می شود (مثل گیرنده استروژن)، انتقال ریکامیناز Cre به هسته که محل انجام نوترکیبی است، توسط استروژنها هدایت می شود. درغیاب استروژنها، توانایی انتقال هسته ای ریکامیناز Cre توسط گیرنده استروژنی بلوکه می شود. هرچند، انتقال هسته ای ریکامیناز Cre توسط استرادیول<sup>۱۶</sup> های داخلی نیز انجام می شود، که نمی توان آنها را بطور آزمایشگاهی دست ورزی نمود. این مسئله بوسیله جهشی در جایگاه اتصال استروژن در پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن حل شده است. از اینرو، جایگاه گیرنده به استرادیولهای داخلی غیرحساس است، ولی به OH-4 تاموکسیفن<sup>۱۷</sup> حساس است. بنابراین، رونویسی پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن در موشهای تراریخته، توسط یک پروموتور فراگیر و یا اختصاصی بافت کنترل می شود و عمل ترجمه در سیتوپلاسم روی میدهد. زمانیکه OH-4 تاموکسیفن به موش تزریق می شود، Cre به هسته منتقل می شود و

<sup>15</sup> Tetracycline(tet)Dependent System

<sup>16</sup> Estradiol

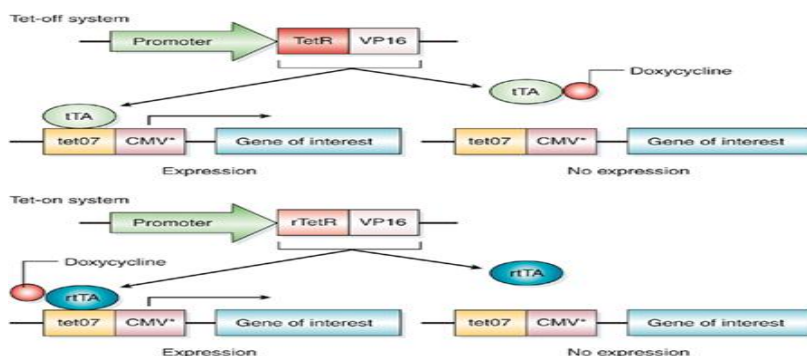
<sup>17</sup> 4-OH-tamoxifen

کننده ترانس ویروس هرپس سیمپلکس<sup>۱۸</sup> به نام VP16 را بیان کند. این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در حضور (rtTA=tet ON) و یا غیاب (rtTA=tet OFF) تتراسایکلین و یا آنالوگ آن دوکسی سایکلین<sup>۱۹</sup> عمل می‌کند. پروموتور هدف این پروتئین ترکیبی، متشکل از چندین جایگاه اپراتوری tet است، که به پروموتور سایتومگالوویروس<sup>۲۰</sup> وصل شده است و بیان ژن مورد نظر، در این مثال، ریکامیناز Cre، را تسهیل می‌سازد (شکل ۴). بنابراین، بیان Cre وابسته به حضور یا غیاب دوکسی سایکلین است. دوزهای کم دوکسی سایکلین، برای تحریک/سرکوب سیستم کافی می‌باشد، که بروز اثرات جانبی و سمی این دارو را غیرممکن می‌سازد. سیستم Cre/گیرنده استروژن، نیاز به ایجاد دو رده موشی تراریخته دارد (یکی حاوی آلی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، و دیگری برای بیان پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن است). در صورتیکه، سیستم tet نیازمند سه رده موش دست‌ورزی ژنتیکی است: یکی حامل آلی که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، دیگری بیان کننده tTA/rtTA، و بالاخره رده موشی سوم بیان کننده Cre تحت کنترل اپراتور CMV/tet. با توجه به اینکه این دست‌ورزی‌های ژنتیکی مستقل از همدیگر هستند، سیستم tet، مستلزم زمان بیشتری است.

<sup>18</sup> Herpes Simplex Virus Transactivator Protein

<sup>19</sup> Doxycycline

<sup>20</sup> Cytomegalovirus (CMV)



**شکل ۴. سیستم های Tet-ON & Tet-OFF.** در سیستم Tet-OFF، از یک پروموتور فراگیر و یا ویژه بافتی استفاده میشود تا یک پروتئین ترکیبی مرکب از قلمرو TetR متصل شونده به DNA و همچنین قلمرو فعال کننده ترانس ویروس هرپس سیمپلکس را بیان کند. این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در غیاب دوکسی سایکلین عمل می کند و باعث بیان ژن مورد نظر میگردد. پروموتور هدف پروتئین ترکیبی، متشکل از چندین جایگاه اپراتوری tet است، که به پروموتور سایتومگالوویروس وصل شده است و بیان ژن مورد نظر را تسهیل می سازد. در سیستم Tet-ON، به TetR، rTetR جهش داده می شود که این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در حضور دوکسی سایکلین عمل می کند و باعث بیان ژن مورد نظر میگردد [۴۱].

### چشم اندازهای آتی

رویداد نوترکیبی همولوگ، در ESCs و تولید موشها با کمک این سلولهای دست ورزی شده، همچنان روش انتخابی برای ایجاد جهش های پوچ<sup>۲۱</sup> در یک ژن خاص می باشد. هرچند، این روش پایه، بسیار زمانبر و پرهزینه می باشد. از طرفی، برای انجام روشهای هدف گیری ژنها بطور پیشرفته، از سیستم Cre/loxP استفاده می شود، که خود این سیستم مستلزم انجام مراحل بیشتری است، که باعث افزایش زمان انجام پروژه می شود. روش هایی که در ادامه بحث خواهند شد، کارآیی روشهای هدف گیری ژن را بهبود می بخشند. این روشها عبارتند از: نخست، فناوری به دام اندازی ژن<sup>۲۲</sup>، که امکان هدف گیری تصادفی تمام ژنهای بیان شده در ESCs را فراهم می سازد؛ دوم، مداخله RNA<sup>۲۳</sup>، که می تواند بیان ژن را بدون نیاز به انجام نوترکیبی همولوگ در ESCs تحت تاثیر قرار دهد؛ سوم، نوکلئازهای قابل برنامه ریزی مانند نوکلئازهای انگشت روی (ZFN)<sup>۲۴</sup>، که برای هدف گیری ژنها استفاده می شود.

در این روش، mRNA هایی که نوکلئازهای انگشت روی را کد می کنند به جنین تک سلولی تزریق شده، تا بطور اختصاصی شکست هایی در محل DNA دو رشته ای هدف ایجاد کند؛ این روش نیز به دست ورزی ESCs نیازی ندارد؛ چهارم، نوکلئازهای اثرگرشبه فعال کننده رونویسی<sup>۲۵</sup> (TALENs) هستند؛ و پنجم، نوکلئازهای مهندسی شده تحت هدایت RNA<sup>۲۶</sup> (RGENs) که کاربرد وسیعی در مهندسی ژنوم دارند.

### فناوری به دام اندازی ژن

پیشرفته ترین روشی که تاکنون برای هدف گیری تصادفی ژن وجود دارد، فناوری به دام اندازی ژن است (شکل ۵). در این روش، ESCs بوسیله یک وکتور، آلوده می شوند. این وکتور، شامل یک توالی کد کننده برای یک مارکر انتخابی است، که باعث مقاومت به نئومايسن میشود، که در انتهای ۵' آنیکتوالییدیرندهقوی پردازش واقع شده است. چون وکتور استفاده شده فاقد یک پروموتور داخلی است، برای بیان ژن مقاومت، نیاز به این است، که وکتور بطور

<sup>21</sup>Null mutations

<sup>22</sup>Gene Trap Technology

<sup>23</sup>Ribonucleic Acid (RNA) Interference

<sup>24</sup>Zinc Finger Nucleases

<sup>25</sup>Transcription activator-like effector nucleases

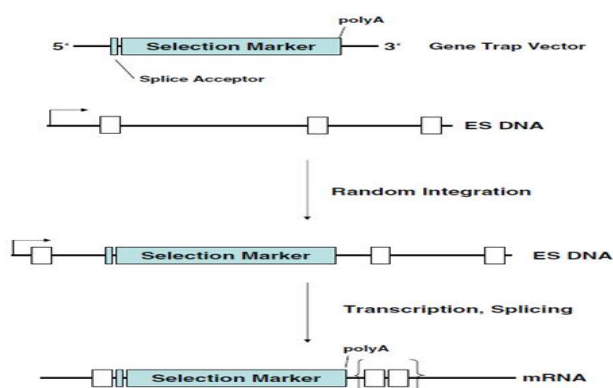
<sup>26</sup>RNA-guided engineered nucleases

که از لحاظ هزینه و زمان مطلوب می‌باشد. در حال حاضر چندین موسسه با هم توافق کرده‌اند که کنسرسیوم بین المللی به دام اندازی ژن<sup>۲۸</sup> را ایجاد کنند، که هدف مشترکشان هدف‌گیری تمام ژنهای در دسترس می‌باشد (۲۱، ۲۲).

تصادفی داخل چارچوب یک ژن، ادغام شده باشد (در بیشتر موارد این محل، یک اینترون است)، تا بتواند، بطور فعالی رونویسی گردد. در این مورد، پروموتور داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل اگزونهای داخلی می‌باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومايسين می‌باشند. پروتئين حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئين هدف و پروتئينی که باعث مقاومت می‌شود، می‌باشد. ترجمه، معمولاً در پایین دست مارکر انتخابی متوقف می‌گردد و منجر به از دست رفتن آمینو اسیدهایی می‌شوند که در پایین دست محل ورود وکتور واقع شده‌اند. سپس، کلونهای ESCs که مقاوم به نئومايسين می‌باشند بوسیله RACE-PCR و توالی‌یابی شناسایی می‌شوند. متأسفانه، چندین اشکال در این روش موجود است. نخست، چون انتخاب و شناسایی کلونهای ESCs که مقاوم به نئومايسين هستند، وابسته به بیان نشانگر انتخابی هستند، از اینرو، تنها ژنهایی که در سلولهای بنیادی جنینی بیان میشوند، در این روش برای هدف‌گیری مناسب هستند. دوم، گرچه رونوشت ترکیبی منجر به ایجاد پروتئينی جهش یافته و فاقد عملکرد میشود، با اینحال، پروتئين ترکیبی ممکن است، بخشی از عملکرد خود را حفظ کرده باشد. سوم، مواردی دیده شده است، که در آنها توالی وکتور بطور نسبی دچار پردازش شده است و منجر به تولید رونوشتهای طبیعی و جهش یافته گشته است، که این امر، باعث ایجاد مدل‌های موشی ناک دان<sup>۲۷</sup> و نه ناک اوت شده است. چهارم، زمانیکه جایگاه ادغام وکتور نزدیک به انتهای ۳ ژن می‌باشد، نحوه عملکرد پروتئين ترکیبی باید معلوم گردد. پنجم، بعلاوه ادغام تصادفی وکتور در داخل ژن هدف، هیچ راهی برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی مشروط، نظیر قرارگیری ویژه جایگاه loxP، وجود ندارد. باوجود همه این اشکالات، تکنولوژی به دام اندازی ژن روشی است

<sup>28</sup>International Gene Trap Consortium

<sup>27</sup>Knockdown



**شکل ۵. فناوری به دام اندازی ژن.** سلولهای بنیادی جنینی بوسیله یک وکتور، آلوده می‌شوند. این وکتور، شامل یک توالی کد کننده برای یک مارکر انتخابی است، که باعث مقاومت به نئومایسن میشود، که در انتهای ۵' آنیکتوالیپدیرندهقوی پردازش واقع شده است. چون وکتور فاقد یک پروموتور داخلی است، برای بیان ژن مقاومت، نیاز به آن است، که وکتور بطور تصادفی داخل چارچوپ یک ژن، ادغام شده باشد تا بتواند، بطور فعالی رونویسی گردد. در این مورد، پروموتور داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل آگزونهای داخلی می‌باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومایسن می‌باشند. پروتئین حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئین هدف و پروتئینی که باعث مقاومت می‌شود، می‌باشد [۷].

### مداخله اسید ریونوکلئوبیک

روش مداخله RNA براساس تخریب RNA پیغامبر است، که با یک مولکول RNA دو رشته‌ای کوتاه همولوگ، هیبرید می‌شود. مداخله RNA، یک فرایندی طبیعی است، که احتمالاً بعنوان بخشی از سیستم دفاعی سلولی علیه RNA های دو رشته‌ای ویروسی شکل گرفته است. شواهد اخیر بیانگر این است، که مداخله RNA، ابزاری تنظیمی رایجی است که سلول برای تنظیم بیان ژن در سطح mRNA از آن بهره می‌برد (۲۳، ۲۴). بنابراین، میتوان از روش مداخله RNA برای تغییر بیان ژن استفاده نمود. آلوده سازی سلول با RNA های کوتاه مداخله گر<sup>۲۹</sup> (siRNAs) روشی رایج برای ناک‌دان کردن mRNA های هدف می‌باشد. برای استفاده آنها در بدن موجود زنده (موش) siRNA ها می‌توانند یا بصورت خارجی تزریق شوند، و یا اینکه بعنوان یک ژن خارجی در سلول بیان شوند، که منجر به تولید RNA های تک رشته‌ای کوتاه با طول ۵۰ جفت باز می‌شود. این RNA ها دارای همولوژی داخلی می

باشند، که باعث می‌شود خودبخودی RNA های دو رشته‌ای کوتاه به طول ۲۱-۲۳ جفت باز، به همراه یک ساختار سنجاق سری در یک انتها ایجاد می‌کنند (که به RNA سنجاق سری کوتاه<sup>۳۰</sup> معروفند). معمولاً، از پروموتورهای آنزیم پلی مرز III برای بیان این RNA های کوتاه استفاده می‌شود (۲۵). اولین رده موشی که shRNA خارجی را بیان می‌کرد، در سال ۲۰۰۲ گزارش شد. هاسووا<sup>۳۱</sup> و همکارانش با موفقیت توانستند، بیان GFP را در رده موشی که بطور فراوان GFP را بیان می‌کرد، سرکوب سازند. این امر با کراس دادن موش بیان کننده GFP با رده موشی حامل کاست anti-GFP-shRNA بود، صورت پذیرفت. نتایج نشان داد که بسته به رده‌های متفاوت موشی حامل anti-GFP-shRNA، بیان GFP نسبت به نمونه های کنترل تا ۷۶-۹۶٪ سرکوب شد (۲۶). این نتایج، دو مشکل عمومی مرتبط با این روش را نشان می‌دهد؛ نخست، گرچه بیان ژن هدف بصورت قابل توجهی سرکوب شد، با اینحال مدل موشی هنوز یک "ناک‌دان" محسوب می‌شود،

<sup>30</sup>Short Hairpin RNA

<sup>31</sup>Hasuwa

<sup>29</sup>Short Interfering RNAs (siRNAs)

می کنند، بیان شده و در نتیجه، mRNA هدف بطور موضعی تخریب میگردد. در اولین گزارش مربوط به این روش، موش تراریخته‌ای که حامل ترکیب U6-loxP-EIIa-Cre<sup>+</sup>shRNA<sup>33</sup> neo-loxP-Fgfr2<sup>+</sup> بود، با موش Cre<sup>-</sup>EIIa-Cre<sup>-</sup> را در تمام سلولها کراس داده شد. موش Cre<sup>-</sup>EIIa-Cre<sup>-</sup> را در تمام سلولها بیان می کند، و در نتیجه توالی بین جایگاه‌های loxP، در همه سلولها حذف می‌شود. همانطور که در موش کلاسیک Fgfr2<sup>-</sup>/U6-Fgfr2/EIIa-Cre<sup>-</sup> موش دیده می‌شود، موش U6-loxP- neo-loxP-Fgfr2/Cre<sup>-</sup> که کنترل محسوب می شود، زنده می ماند. اگر موش loxP-neo-loxP-Fgfr2 با موشی که بیان Cre در آن محدود به اندام خاصی می باشد، کراس داده شود، موش Fgfr2 shRNA<sup>34</sup> زنده می ماند، اما دارای ناهنجاری‌های برجسته ساختاری در اندام و انگشت‌ها می‌باشد (۲۷).

با کمک روش مداخله RNA، میتوان بیان ژن هدف را در موشهای بالغ، هم تنظیم کرد. این امر با تزریق siRNAs خارجی انجام پذیر است. رایج‌ترین مسیر اعمال siRNA بر اساس روشی بنام تزریق هیدرودینامیکی<sup>34</sup> استوار است، که در طی آن، 1.5-2.5 mL محلول نمک ایزوتونیک محتوی ۵۰-۵۰۰ µg بهرگدمی، بمدت 10-20 s تزریق می گردد (۲۸). این روش سخت، بطور شگفت انگیزی توسط موش تحمل می‌شود. در اولین گزارش مربوط به این روش، لوئیس<sup>35</sup> و همکارانش موفق شدند بیان لوسیفراز و EGFP را تا ۸۰-۹۰٪ در کبد، طحال، شش و پانکراس موش کاهش دهند. این اثر زودگذر بود و تنها چندین روز بطول کشید. بطور مشابهی، تزریق پر فشار داخل رگی پلاسمیدهایی که shRNA را بیان می کردند، بطور موفقیت آمیزی ویروس هپاتیت B، را در موش سرکوب

تا "ناک‌اوت". دوم، همانطور که در مورد موشهای تراریخته دیده می‌شود، اثر جایگاه کروموزومی<sup>32</sup> بیان ژن خارجی را تحت تاثیر قرار می‌دهد، و باعث سرکوب شدن بیان ژن بطور کم و بیش می‌شود. مزایای روش مداخله RNA بسیار روشن است: نو ترکیبی همولوگ در ESCs صورت نمی پذیرد، تولید موشهای تراریخته به این روش از لحاظ هزینه و زمان نسبت به روشهای سنتی ناک‌اوت به صرفه‌تر می‌باشد. تاکنون، روشهای هدف‌گیری ژن مبتنی بر نو ترکیبی همولوگ، عمدتاً بر روی موشها انجام شده است، که این امر، بعلاوه محدودیت در دسترسی به ESCs سازگار در سایر گونه‌ها است. با این حال، چون در روش مداخله RNA از ESCs استفاده نمی‌شود، این روش در سایر گونه‌ها نیز قابل استفاده خواهد بود.

همانطور که در موشهای ناک اوت تولید شده بوسیله روش‌های سنتی دیده می‌شود، موشهای تراریخته shRNA می‌توانند، منجر به ناک‌دان ژن هدف بطور وسیعی گردند، چراکه در آن از پروموتورهای آنزیم پلی مرز III نظیر U6 or H1 که در تمام سلولها فعال هستند، استفاده شده است. بنابراین، روشهایی توسعه یافتند، که بیان shRNA را محدود به بافت یا سلولهایی خاص کند. یک روش، استفاده از سیستم Cre/loxP است. در این سیستم برای ناک‌دان کردن موضعی بیان ژن مورد نظر، از دو رده موشی تراریخته استفاده می‌شود که در آن یک رده موشی Cre را تحت کنترل پروموتورهای اختصاصی بافتی بیان می‌کند، و رده دیگر حامل یک کاست بیانی نئومایسین است که در طرفین آن جایگاه loxP قرار گرفته است و این مجموعه، همگی در داخل پروموتوری واقع شده است، که رونویسی shRNA را هدایت می‌کند. در حالت عادی کاست بیانی نئومایسین فعالیت پروموتور بیان کننده shRNA را بلوکه میکند. اما وقتی که کاست بیانی نئومایسین توسط Cre برداشته می‌شود، shRNA در سلولهایی که Cre را بیان

<sup>33</sup>Fibroblast Growth Factor Receptor 2

<sup>34</sup>Hydrodynamic Injection

<sup>35</sup>Lewis

<sup>32</sup>Chromosomal Position Effects

کرد، که این امر بیانگر کاربرد این شیوه برای اهداف درمانی است (۲۹).

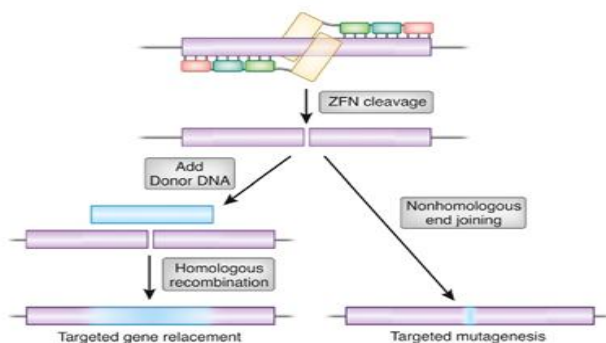
روش مداخله RNA دارای چندین اشکال عمومی می باشد. یک اشکال این است، که آلوده ساختن سلولها با RNA دو رشته‌ای، دستگاه دفاعی سلولی ضد ویروسی را تحریک می کند. زمانیکه این دستگاه به شدت فعال شود، تاثیر مهمی بر متابولیسم سلولی می گذارد و باعث آپوپتوز می شود. بعلاوه، اثرات غیر اختصاصی (نظیر مهار mRNA هایی بجز mRNA هدف)، باید همچنین در نظر گرفته شوند. از اینرو، انتخاب کنترل های صحیح بسیار مهم است. یک روش این است، که از الیگونوکلوئوتیدهای تصادفی که بطور پیش فرض هیچ mRNA ای را هدف قرار نمی گیرند، استفاده کنیم تا بتوان اثرات siRNA مستقل از توالی هایشان بررسی کرد. یک روش بهتر، استفاده از کنترل های siRNA که دارای جهش های تک نقطه‌ای می باشند، گرچه باید توجه شود، که siRNA جهش یافته با mRNA هدف تداخل ایجاد نکند (۳۰).

### نوکلنازهای انگشت روی

نوکلناز انگشت روی (ZFN)، متشکل از دو قلمرو می باشد؛ یکی، قلمرو کاتالیتیکی که شامل شکافت آنزیم محدود کننده FokI است، و دیگری، قلمرو شناسایی DNA، که از تعدادی موتیف انگشت روی تشکیل شده است، و اتصال ZFN را به توالی DNA هدف تسهیل می سازد. یک هتروداایمر، متشکل از دو ZFN منفرد هست، که در جهت ویژه‌ای قرار گرفته‌اند، و این فاصله منجر به فعال سازی قلمرو کاتالیتیکی شده و نتیجتاً باعث ایجاد شکاف در DNA دورشته‌ای می گردد (شکل ۶). این شکاف دو رشته‌ای، به دو روش ترمیم می شود. در روش اول، نوترکیبی همولوگ (با بهره گیری از آلل سالم بعنوان الگو DNA را ترمیم می کند)، اما در روش دوم که در غیاب آلل سالم اتفاق می افتد شکست DNA به وسیله

مکانیسم اتصال غیر همولوگ انتهای آزاد DNA تعمیر می شود. حالت دوم، باعث باعث تغییر توالی DNA (حذف یا ورود) در محل ترمیم می شود که برای هدف گیری ژن مناسب می باشد. ZFNs، بطور موفقیت آمیزی برای هدف گیری ژنها در دروزوفیلا<sup>۳۶</sup>، ماهی گوره خری<sup>۳۷</sup> و سلولهای پستانداران استفاده شده‌اند (۳۱). متأسفانه، ZFNs، سمیت قابل توجهی در برخی از سلولها ایجاد میکنند. این مسئله بطور نسبی با طراحی FokI جهش یافته رفع شده است. ZFN، بطور موفقیت آمیزی در موش برای حذف عملکرد ژنهای هدف شده استفاده است. تزریق mRNA رمزکننده ZFN و یا پلاسمیدهای بیانی ZFN، به داخل پیش هسته و جنین تک سلولی، منجر به ایجاد حذف‌هایی با طول متغیر ۳ تا ۱۸۷ باز شده است. هدف گیری در بسیاری از موارد محدود به یک آلل بوده است، ولی حذف‌های دو آللی هم مشاهده شده است (۳۲). طبق نتایج حاصله از موجودات مختلف، حذف DNA بوسیله ZFN، غیرقابل برگشت بوده و آلل جهش یافته میتواند، به سلولهای دیگر انتقال یابد. بنابراین، فناوری نوکلناز انگشت روی، یک ابزار امید بخشی برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی در پستانداران می باشد. در مقایسه با سایر روش های رایج برای غیر فعال سازی ژن، که تقریباً کاربریشان محدود به موش می باشد، این روش جدید دو مزیت کلیدی دارد: نخست آنکه، چون ESCs در این روش به کار برده نمی شوند بنابراین، این روش جدید، مناسب سایر گونه‌ها هم می باشد. و دوم آنکه، این روش از نظر هزینه و زمان مطلوب می باشد.

<sup>36</sup>Drosophila



**شکل ۶. نوکلئاز انگشت روی.** نوکلئاز انگشت روی، متشکل از دو دومین می باشد. اول، دومین شکافت آنزیم محدود کننده FokI است، دوم، یک دومین شناسایی DNA می باشد، که شامل تعدادی موتیف انگشت روی می باشد، که اتصال نوکلئاز انگشت روی را به توالی DNA تسهیل می سازد. یک هتروداایمر، متشکل از دو نوکلئاز انگشت روی منفرد هست، که در جهت ویژه ای قرار گرفته اند، و این فاصله منجر به فعال سازی دومین کاتالیتیکی شده و نتیجتاً باعث ایجاد شکاف در DNA دورشته ای می گردد. این شکاف دو رشته ای، در سلول توسط نوترکیبی همولوگ (بهره گیری از آلل سالم بعنوان الگو) ترمیم می شود [۴۲].

(RVDs) گفته می شود (شکل ۷). چهار RVD مختلف بنام Asn-Gly و Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp بطور وسیعی به ترتیب برای شناسایی گوانین، آدنین، سیتوزین و تیمین استفاده میشوند. TALENs را میتوان طوری طراحی نمود که هر توالی از DNA را مورد هدف قرار دهد که مزیت عمده TALENs نسبت به سایر نوکلئازها می باشد (۳۳).

### نوکلئازهای اثرگر شبه فعال کننده رونویسی

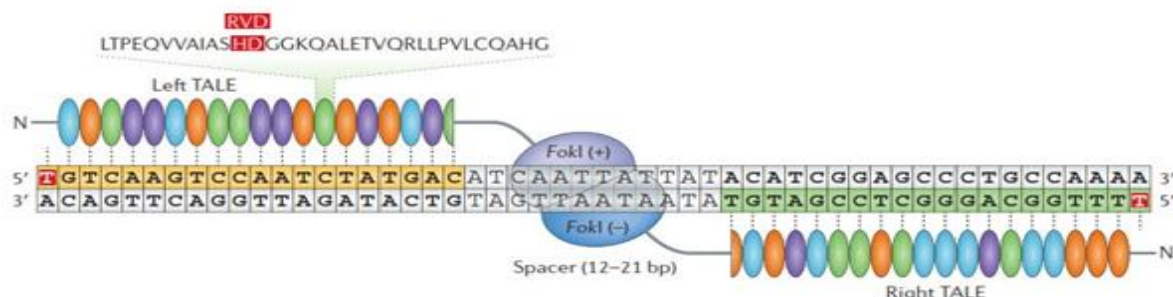
TALENs برای تغییر ژن ها در گونه های مختلفی نظیر ویروس ها، مخمر، گیاهان، نماتودها، حشرات و پستاندارانی نظیر موش و خوک مورد استفاده قرار گرفته است. ساختار کلی TALENs، مشابه ZFNs است. همانند ZFNs، TALENs دارای قلمرو نوکلئازی FokI در انتهای ناحیه کربوکسی هستند. با اینحال، آنها از دسته متفاوتی از پروتئین های متصل شونده به DNA بنام TALEs<sup>۳۸</sup> بهره می برند که از باکتری بیماریزا *Xanthomonas spp* گرفته شده است.

TALES از ردیف های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه ای تشکیل شده اند که هر یک از این ردیف ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف ها توسط دو اسید آمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته اند تعیین می شود که به آنها جایگاه های متغیر دو اسید آمینه ای<sup>۳۹</sup>

<sup>38</sup> Transcription activator-like effectors

<sup>39</sup> Repeatvariable diresidues





شکل ۷- TALEs از ردیف های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه ای تشکیل شده اند که هریک از این ردیف ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف ها توسط دو اسید آمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته اند تعیین می شود که به آنها جایگاه های متغیر دو اسید آمینه ای (RVDs) گفته می شود [۴۳].

و در پردازش pre-crRNA شرکت می کنند. هر دو crRNA و tracrRNA با پروتئین ۹ وابسته به DNA CRISPR (Cas9) تشکیل کمپلکس داده و یک آندونوکلاز فعال را تشکیل می دهد. آندونوکلاز حاصله، توالی ۲۳ جفت بازی DNA را که مرکب از توالی ۲۰ جفت بازی راهنما (که protospacer نامیده می شود) و ۳'-NGG-5' و یا ۳'-NAG-5' (که موتیف کناری protospacer<sup>۴۲</sup> نامیده می شود) است را شناسایی می نماید. crRNA و tracrRNA می توانند بهم دیگر متصل شوند و تشکیل RNA راهنمای تک رشته ای<sup>۴۳</sup> (sgRNA) نمایند که باعث ساده تر شدن ساختار CRISPR می شود. برتری اصلی RGENs نسبت به سایر نوکلئازها، آماده سازی و طراحی ساده آنها می باشد (۳۳).

### نوکلئازهای مهندسی شده تحت هدایت RNA

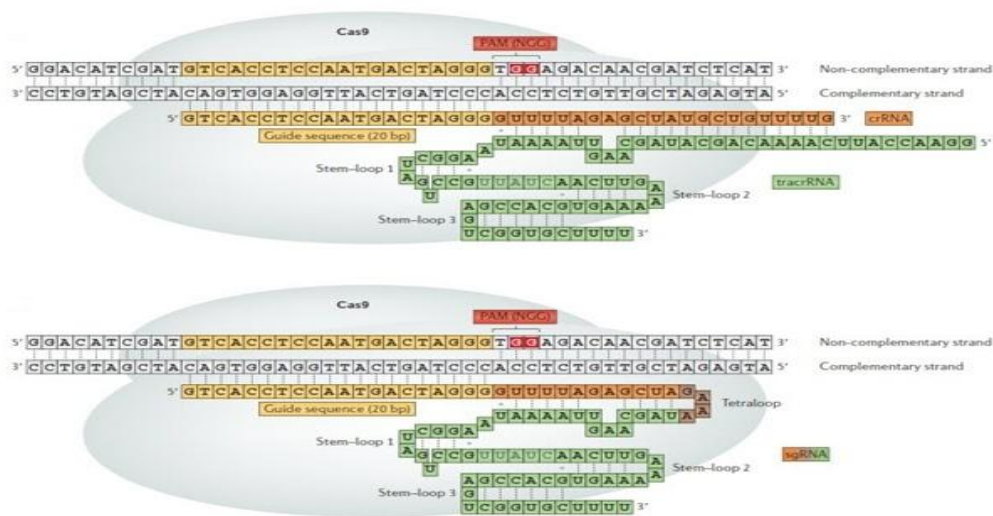
در ابتدا این نوکلئازها برای ایجاد جهش زایی هدفمند در باکتری، جنین های ماهی گوره خری و سلولهای پستانداران مورد استفاده قرار گرفتند. بعد آن زمان به بعد، این روش در سیستم های مختلفی نظیر گیاهان، نماتودها، مگس سرکه، موش و پرایمات ها توسعه یافته اند. در باکتری ها، سیستم های برش DNA تحت هدایت RNA، نوعی ایمنی اکتسابی علیه پلاسمیدها و فازهای مهاجم فراهم می سازند. باکتریها، اغلب قطعات کوچک DNA خارجی ( بطول ۲۰ جفت باز) را گرفته و این قطعات که protospacer نامیده می شوند را وارد ژنوم خود نموده تا گروه منظمی از تکرارهای پالیندرومیک کوتاه به نام CRISPR<sup>۴۰</sup> را بوجود آورند. این نواحی CRISPR، رونویسی شده تا RNA پیش ساز CRISPR به نام pre-crRNA را ایجاد کنند و سپس مورد پردازش قرار گرفته تا crRNA های هدفمند را بوجود آورند. crRNA های فعال کننده ترانس (tracrRNA)<sup>۴۱</sup> که همواره ثابت هستند نیز رونویسی شده

<sup>۴۲</sup> Protospacer adjacent motif

<sup>۴۳</sup> single-chain guide RNA

<sup>۴۰</sup> clustered regularly interspaced short palindromic repeat

<sup>۴۱</sup> Trans-activating crRNA



**شکل ۸-** هر دو crRNA و tracrRNA با پروتئین ۹ وابسته به CRISPR (Cas9) تشکیل کمپلکس داده و DNA آندو نوکلئاز فعال را تشکیل میدهد. اندونوکلئاز حاصله، توالی ۲۳ جفت بازی DNA را که مرکب از توالی ۲۰ جفت بازی راهنما (که protospacer نامیده می‌شود) و ۳'-NGG-5' و یا 5'-NAG-3' (که موتیف کناری protospacer نامیده می‌شود) است را شناسایی می‌نماید. crRNA و tracrRNA می‌توانند بهم دیگر متصل شوند و تشکیل RNA راهنمای تک رشته‌ای (sgRNA) نمایند که باعث ساده‌تر شدن ساختار CRISPR می‌شود [۴۳].

### بحث

ژنوم موش طبیعی<sup>۴۷</sup> وجود ندارند، مورد استفاده قرار می‌گیرد. دسته دوم، موشهای تراریخته شده، می‌توان با تزریق ESCs، که ژنوم آنها دست‌ورزی شده، به داخل بلاستوسیست تولید نمود (۳۹). برای این منظور، ابتدا سلولهای جنینی کشت داده می‌شوند و توسط یک قطعه DNA آلوده می‌شوند. این قطعه حاوی توالی از DNA است، که شبیه ژنی می‌باشد، که قرار است دچار تغییر شود (۴۰). سپس، آندسته از سلولهای جنینی که دچار نوترکیبی همولوگ می‌شوند، انتخاب می‌گردند. برخلاف موشهای تراریخته کلاسیک، رده‌های موشی حاصل از نوترکیبی در سلولهای جنینی، موشهای هدف گیری شده ژنی<sup>۴۸</sup> نامگذاری می‌شوند، و بیانگر این امر هستند که یک ژن ویژه، دست‌ورزی شده است. در اغلب موارد این

توانایی در دست‌ورزی کردن و یا حذف یک ژن خاص در ESCs در اواخر ۱۹۸۰ ایجاد شد، که باعث توسعه هزاران رده موشی جدیدی شد، که دارای تغییرات ژنتیکی بودند. استفاده از موشها به ویژه موشهای ناک اوت<sup>۴۴</sup> منجر به کسب دانش عظیمی در زمینه زیست شناسی انسان و بیماریها گردید (۳۴-۳۷). طی سالیان گذشته روشهای مختلفی برای دست‌ورزی ژنوم موش توسعه یافته‌است، که می‌توان تمام این روشها را به دو دسته اساسی تقسیم نمود. دسته اول شامل موشهای تراریخته کلاسیک است، که حاصل از تزریق قطعه DNA خارجی به نام تراژن<sup>۴۵</sup> به درون پیش هسته<sup>۴۶</sup> جنین تک سلولی می‌باشند، که این قطعه بطور تصادفی در ژنوم موش ادغام می‌گردد (۳۸). این روش عمدتاً برای افزایش بیان ژنهای خودی و یا بیان ژنهای هترولوگ که در

<sup>۴۷</sup>Wild Type  
<sup>۴۸</sup>Gene Targeted

<sup>۴۴</sup>Knockout Mice  
<sup>۴۵</sup>Transgene  
<sup>۴۶</sup>Pronuclear

رشد مدل های موشی تراریخته، نقاط ضعف این روشها بیشتر نمایان شده اند، ولی باعث بهبود فنی این روشها شده است.

دستورزی به منظور غیرفعال کردن ژن مورد نظر صورت می پذیرد.

### نتیجه گیری

طی سالیان گذشته، دو روش ذکر شده پیشرفت کرده اند و میزان موفقیت برای دستورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است. هرچند به موازات تعداد روبه

### تشکر و قدردانی

از زحمات کلیه اساتید و دوستانی در تیم تحقیق، گردآوری، تنظیم منابع و مطالب تشکر و قدردانی می گردد.

### Reference

- Ahmadian H, Hashemi E, Akhavan O, Shamsara M, Hashemi M, Farmany A, et al. Apoptotic and anti-apoptotic genes transcripts patterns of graphene in mice. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl* 2017; 71:460-4.
- Amirrasouli MM, Shamsara M. Comparing the in vivo and in vitro effects of hypoxia (3% O<sub>2</sub>) on directly derived cells from murine cardiac explants versus murine cardiosphere derived cells. *J Stem Cells Regen Med* 2017;13:35-44.
- Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, et al. The knockout mouse project. *Nat Genet* 2004;36: 921-4.
- van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. *Development* 2009;136:3205-14.
- Kozar K, Ciemerych MA, Rebel VI, Shigematsu H, Zagozdzon A, Sicinska E, et al. Mouse development and cell proliferation in the absence of D-cyclins. *Cell* 2004; 118: 477-91.
- Silva AJ, Simpson EM, Takahashi JS, Lipp HP, Nakanishi S, Wehner JM. Mutant mice and neuroscience: recommendations concerning genetic background. *Banbury Conference on genetic background in mice. Neuron* 1997;19:755-9.
- Castrop H. Genetically modified mice-successes and failures of a widely used technology. *Pflugers Arch* 2010;459:557-67.
- Esmaelizad M, Ahmadian G, Aghaiypour K, Shamsara M, Paykari H, Tebianian M. Induction of prominent Th1 response in C57Bl/6 mice immunized with an E. coli-expressed multi T-cell epitope EgA31 antigen against *Echinococcus granulosus*. *Folia Parasitol* 2013;60:28-34.
- Saedinia A, Shamsara M, Zeinoddini M, Sadeghi V, Maghsoudi N. Evaluation of nucleic acid sequence based amplification (NASBA) and reverse transcription polymerase chain reaction for detection of coxsackievirus b3 in cell culture and animal tissue samples. *Iran J Biotechnol* 2008; 6: 222-8.
- Kan Z, Rouchka EC, Gish WR, States DJ. Gene structure prediction and alternative splicing analysis using genomically aligned ESTs. *Genome Res* 2001;11:889-900.
- Sauer B. Inducible genetargeting in mice using the Cre/lox system. *Methods* 1998;14:381-92.

12. Sternberg N, Hamilton D. Bacteriophage P1 site-specific recombination. I. Recombination between loxP sites. *J Mol Biol* 1981;150:467-86.
13. Mao X, Fujiwara Y, Orkin SH. Improved reporter strain for monitoring Cre recombinase-mediated DNA excisions in mice. *Proc Natl Acad Sci* 1999;96:5037-42.
14. Sauer B, McDermott J. DNA recombination with a heterospecific Cre homolog identified from comparison of the pac-c1 regions of P1-related phages. *Nucleic Acids Res* 2004;32:6086-95.
15. Anastassiadis K, Fu J, Patsch C, Hu S, Weidlich S, Duerschke K, et al. Dre recombinase, like Cre, is a highly efficient site-specific recombinase in *E. coli*, mammalian cells and mice. *Dis Model Mech* 2009;2:508-15.
16. Andreas S, Schwenk F, Küter-Luks B, Faust N, Kühn R. Enhanced efficiency through nuclear localization signal fusion on phage PhiC31-integrase: activity comparison with Cre and FLP<sub>e</sub> recombinase in mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 2002;30:2299-306.
17. Raymond CS, Soriano P. High-efficiency FLP and PhiC31 site-specific recombination in mammalian cells. *PLoS One* 2007;2:e162.
18. Sequeira Lopez ML, Pentz ES, Nomasa T, Smithies O, Gomez RA. Renin cells are precursors for multiple cell types that switch to the renin phenotype when homeostasis is threatened. *Dev Cell* 2004;6:719-28.
19. Sohal DS, Nghiem M, Crackower MA, Witt SA, Kimball TR, Tymitz KM, et al. Temporally regulated and tissue-specific gene manipulations in the adult and embryonic heart using a tamoxifen-inducible Cre protein. *Circ Res* 2001;89:20-5.
20. Wogan GN. Review of the toxicology of tamoxifen. *Semin Oncol* 1997; 24: S1-87-S1-97.
21. Nord AS, Chang PJ, Conklin BR, Cox AV, Harper CA, Hicks GG, et al. The International Gene Trap Consortium Website: a portal to all publicly available gene trap cell lines in mouse. *Nucleic Acids Res* 2006;34:D642-8.
22. Skarnes WC, von Melchner H, Wurst W, Hicks G, Nord AS, Cox T, et al. A public gene trap resource for mouse functional genomics. *Nat Genet* 2004;36:543-4.
23. Bagasra O, Prilliman KR. RNA interference: the molecular immune system. *J Mol Histol* 2004;35:545-53.
24. Rao M, Sockanathan S. Molecular mechanisms of RNAi: implications for development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 2005;75:28-42.
25. Xia XG, Zhou H, Ding H, Affar el B, Shi Y, Xu Z. An enhanced U6 promoter for synthesis of short hairpin RNA. *Nucleic Acids Res* 2003; 31: e100.
26. Hasuwa H, Kaseda K, Einarsdottir T, Okabe M. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett* 2002; 532: 227-30.
27. Coumoul X, Shukla V, Li C, Wang RH, Deng CX. Conditional knockdown of Fgfr2 in mice using Cre-LoxP induced RNA interference. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: e102.
28. Wolff JA, Budker V. The mechanism of naked DNA uptake and expression. *Adv Genet* 2005; 54: 3-20.
29. McCaffrey AP, Kay MA. A story of mice and men. *Gene Ther* 2002; 9: 1563.
30. Wang Y, Juranek S, Li H, Sheng G, Tuschl T, Patel DJ. Structure of an argonaute silencing complex with a seed-containing guide DNA and target RNA duplex. *Nature* 2008; 456: 921-6.
31. McCammon JM, Amacher SL. Using zinc finger nucleases for efficient and heritable gene disruption in zebrafish. *Methods Mol Biol* 2010; 649: 281-98.

32. Geurts AM, Cost GJ, Freyvert Y, Zeitler B, Miller JC, Choi VM. Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases. *Science* 2009; 325: 433.
33. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014; 15: 321-34.
34. Kazemi P, Dashtizad M, Shamsara M, Mahdavinezhad F, Hashemi E, Fayazi S, et al. Effect of blastocoel fluid reduction before vitrification on gene expression in mouse blastocysts. *Mol Reprod Dev* 2016;83:735-42.
35. Gharib S, Dashtizad M, Farokhi F, Shamsara M. Effect of artificial collapse of mouse blastocyst on viability and Wnt3a gene expression. *J Cell Mol Res* 2016; 19: 102-13. [In Persian]
36. Mahdavinezhad F, Dashtizad M, Shamsara M, Kazemi P, Fathalizade P, Zandi GH. Effect of blastocoelic fluid reduction on quality and expression of developmentally important genes in mouse blastocysts. *Int J Fertil Steril* 2015; 9: 63.
37. Zandi G, Dashtizad M, Assadi Tehrani G, Shamsara M. Expression levels of pluripotency specific markers, oct4 and nanog in ivf derived mouse blastocysts. *NCMBJ* 2016;6:65-72. [In Persian]
38. Gordon JW, Scangos GA, Plotkin DJ, Barbosa JA, Ruddle FH. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980. 77: 7380-4.
39. Thomas KR, Capecchi MR. Site-directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells. *Cell* 1987; 51: 503-12.
40. Thomas KR, Deng C, Capecchi MR. High-fidelity gene targeting in embryonic stem cells by using sequence replacement vectors. *Mol Cell Biol* 1992;12:2919-23.
41. Kohan DE. Progress in gene targeting: using mutant mice to study renal function and disease. *Kidney Int* 2008;74:427-37.
42. Carroll D. Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* 2011;188:773-82.
43. Kim H, Kim JS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. *Nat Rev Genet* 2014;15:321-34.