Genetically modified mice- Methods, applications and outlook

Eskandarian Boroujeni M[1], Alizadeh R[2], Afkhami F[3], Tavakol Z[4], Shamsara M[5]

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 tengenerated 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, genetargeting, 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

Recevied: 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.

Copyright © 2019 the Author (s). Published by Kurdistan University of Medical Sciences. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-Non Commercial License 4.0 (CCBY-NC), where it is permissible to download, share, remix, transform, and buildup the work provided it is properly cited. The work cannot be used commercially without permission from the journal.

مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان / دوره بیست و چهارم / فروردین و اردیبهشت۱۳۹۸/۴۴-۲۴

موش‌های تراریخته - روش ها، کاربردها و چشم انداز

مهدی اسکندریان بروجنی[۱]، رفیعه علیزاده[۲]، فاطمه افخمی[۳]، زینب توکل[۴]، مهدی شمس‌آرا [۵]

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: ۴۴۷۸۷۴۱۴-۰۲۱، ایمیل: shamsa@nigeb.ac.ir

چکیده

زمینه وهدف: 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 اندازهای آتی درباره هدف‌گیری ژنها مطرح می شوند.

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 recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده است.

یافته ها: در این مطالعه به بررسی تغییرات ژنی در سطح وسیع، پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم های اختصاصی ژن، تغییرات ژنی القایی و موضعی ، سیستم Cre/loxP و برخی چشم اندازهای آتی پرداخته شده است.

نتیجه گیری: میزان موفقیت برای دست‌ورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است و استفاده از موشهای ناک اوت[۱] منجر به کسب دانش عظیمی در زمینه زیست شناسی انسان و بیماریها گردیده است.

واژه های کلیدی: موش‌های تراریخته، ژنتیک عملکردی ،هدف‌گیری ژنها، نوترکیبی همولوگ

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

[1] 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 جهش‌های ژنتیکی القایی درموجوداتی نظیر کرمها، حشرات، ماهی گوره خری[۲] 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 مزیت‌های ویژه‌ای را برای مطالعه بیماری‌ها 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، تقریبا ۹۹٪ ژنهای موش دارای همولوگ در انسان هستند؛ و بالاخره ، ژنوم موش دارای این ویژگی است، که از جهش‌زایی هدفمند در برخی از ژنهای ویژه که توسط نوترکیبی همولوگ در سلولهای بنیادی جنینی[۳] (ESCs) صورت می‌پذیرد، پشتیبانی می‌کند، که این امر باعث می‌شودکه ژنها بطور کارآمد و دقیقی تغییر داده شوند.

این مقاله مروری، ابتدا به بررسی مشکلات عمومی مرتبط با ایجاد موش‌های تراریخته می‌پردازد، و سپس، چندین روش جدید و پیشرفته را که برای غلبه بر مشکلات کنونی توسعه یافتند، 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 recombination در بازه زمانی ۲۰۱۸-۱۹۸۰ انجام شده است.

یافته ها

تغییرات ژنی در سطح وسیع

غیرفعال‌سازی ژن در سطح وسیع در موشها، بوسیله نوترکیبی همولوگ در ESCs صورت می‌پذیرد. در این روش، معمولا اگزون‌های مهم و یا کل ژن (بسته به اندازه آن) بوسیله یک نشانگر انتخابی، که در اکثر موارد کاست مقاومتی نئومایسین[۴] 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 گونه‌ها 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 مدلهای ناک اوت موشی، که در آنها ژنهای مسیر علامت دهی Wnt دست‌ورزی شده است، در طی جنین‌زایی و یا بلافاصله بعد از تولد می‌میرند، 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 استراتژی‌های هدفگیری ژن بصورت القایی و موضعی حل شده است. بعلاوه تجربیات ما در مورد موشهای هدف

[2] Zebrafish
[3] Embryonic Stem Cells
[4] 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

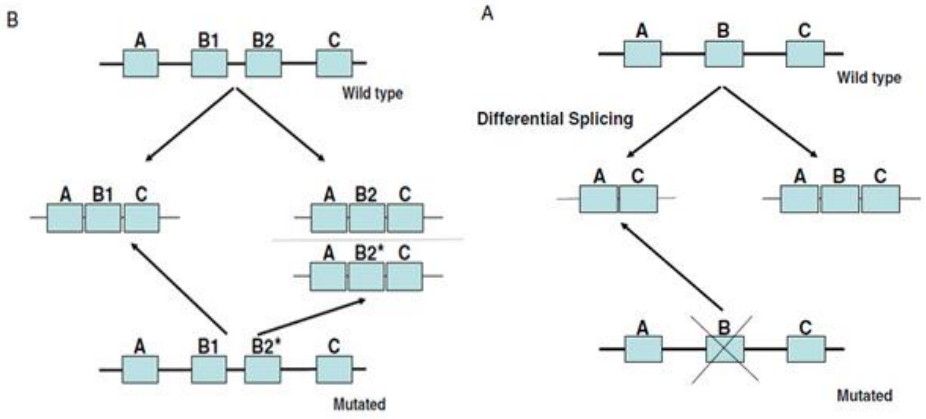
سابقه ژنتیکی موش‌های مدل، اغلب اثر قابل توجهی بروی فنوتیپ دارد. مسلما، بیان محصولات ژن‌های جبران کننده و تعدیل کننده، فنوتیپ اولیه که توسط روش هدف گیری ژن ایجاد شده، را بطور وسیعی تحت تاثیر قرار می دهد. اکثر ESCs موشی از سویه های ۱۲۹ مانند SV۱۲۹ مشتق شده‌اند. موش های این سویه همگی رنگ موی آگوتی دارند. برای تشخیص انتقال آلل جهش یافته به سلول های جنسی براساس رنگ موی موش، سلولهای بنیادی حامل آلل جهش یافته به بلاستوسیست‌های گرفته شده از موش سیاه رنگ (مثل C57BL/6) تزریق می شوند تا موش های کایمر متولد شوند. بک کراس[5] کایمرها، که حامل آلل جهش یافته هستند، با سویه ای که خواهان بررسی صفت در آن هستیم باعث می شود تا سابقه ژنتیکی مورد نظر بدست آید. برای رسیدن از یک رده با سابقه ژنتیکی مخلوط به رده ای با سابقه ژنتیکی نسبتا 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 موش هایی که سابقه ژنتیکی مخلوط کمتری دارند انجام شوند (۹-۷)

پردازش افتراقی و غیرفعال سازی ایزوفرم های 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 متغییر یک پروتئین را تولید کند. پردازش افتراقی رونوشت اولیه، فرایندی رایج و مختص سلول می باشد. این فرایند، منجر به تولید پروتئین‌هایی می گردد، که تعداد آنها از تعداد ژنهای موجود در ژنوم به مراتب بیشتر است. تخمین زده می شود که بیش از ٪۵۰ همه رونوشت‌های اولیه انسانی، فرایند پردازش افتراقی را پشت سر می گذرانند، 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 می کند، 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[6]، 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 اینترونی از رونوشت خارج شده، که در نهایت رونوشت‌های طبیعی، تغییر نیافته باقی می‌مانند(۷). متاسفانه، این روش غیرفعال کردن ایزوفرمها، امکان ایجاد جهش‌های دوتایی را بوسیله تولید جهشهای منفرد فراهم نمی‌سازد (بطور مثال غیرفعال کردن همزمان دو ایزوفرم). بعلت پیوستگی نزدیک گونه‌های مختلف یک اگزون مشخص، آلل جهش یافته همواره همراه اگزون(های) طبیعی متناوب است.

[5] Backcross

[6] Knockin



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 می‌کند و پردازش طبیعی رونوشتی محتوی اگزون‌های A و C را ایجاد میکند. **b**دراین مورد، دستگاه پردازش از گونه های مختلف اگزون B (B1و 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 می‌مانند(۷).

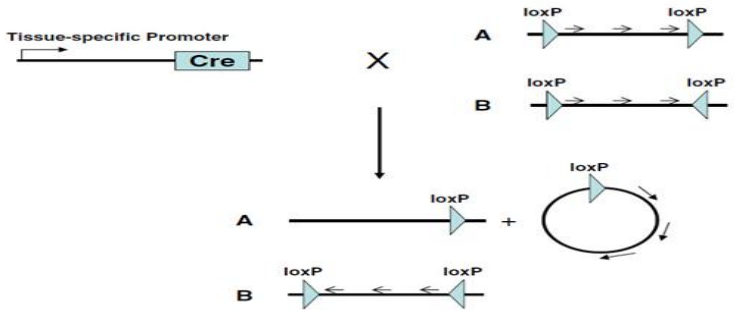
تغییرات ژنی القایی و موضعی

سیستم Cre/loxP و سایر سیستم‌های ریکامبیناز[۷] مشتق شده از فاژ با درنظر گرفتن مشکلات مرتبط با غیرفعال‌سازی ژن بطور وسیع، نظیر مرگ در حالت جنینی، روشهایی توسعه یافتند که جهش‌هایی که محدود به اندامها و بافتهای ویژه هستند، را امکان‌پذیر می‌سازند و در عین حال بیان ژن طبیعی را در بقیه بدن حفظ می‌کنند. این روشها براساس فعالیت ریکامبیناز مبتنی بر جایگاه ویژه هستند، که بیان آنها براساس پروموترهای اختصاصی بافتها کنترل می‌شود. ریکامبیناز Cre فراوانترین آنزیمی است، که بدین منظور استفاده می شود(۱۱). ریکامبیناز Cre یک توپوایزومراز ۱، گرفته شده از باکتریوفاژ P1 است، که نوترکیبی در جایگاه‌های ویژه DNA که بین توالی‌های شناسایی خاص قرار گرفته اند، را کاتالیز می نماید(۱۲). توالی ویژه Cre، یعنی loxP[۸] شامل یک توالی ژنتیکی ۲۴ بازی است که در ژنوم موش طبیعی وجود ندارند. همانطور که در شکل ۲ نشان داده شده، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاهای loxP منجر به حذف توالی ژنتیکی میانه شده (loxP در جهت‌های یکسان قرار میگیرد) و یا منجر به وارونه سازی توالی ژنتیکی قرار گرفته بین جایگاهای loxP می شود (loxP در جهت‌های مختلف قرار میگیرد). گرچه، این سیستم از پروکاریوتها گرفته شده است، ریکامبیناز 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 ریکامبیناز Cre را تحت کنترل یک پروموتر ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که ژن مورد نظر (و یا اگزون‌های مهم این ژن) در کنار جایگاه‌های loxP قرار گرفته‌اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. باوجود سادگی و قدرتمندی سیستم‌های Cre/loxP چندین اشکال وجود دارد. نخست، سیستم های Cre/loxP هیچگونه کنترلی روی زمان نوترکیبی در حین تکوین موش ندارند. دوم، بسیاری از

[7] Recombinase
[8] Locus of X-over of P1

پروموترهای اختصاصی بافتی، اجازه بیان ریکامبیناز Cre به میزان کافی را در تمام سلولهای یک بافت مشخص را نمی دهند، 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 می گردد. سوم، کارآمدی حذف ژنی، وابسته به جایگاه ژنتیکی است، که در آن، loxP واقع شده است. بنابراین، دسترسیریکامبیناز 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 پروموترهای 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[۹]" صورت می پذیرد. در این تکنیک، رده موشی با بیان Cre با رده موشی دیگر که در آن یک قطعه خارجی گزارشگر(نظیر بتا گلوکتوزیداز[۱۰]، پروتئین فلورسانس سبز[۱۱]) تحت کنترل پروموترهای قوی بیان می شود، آمیزش داده می شود (۱۳). در غیاب فعالیت Cre، بیان این گزارشگر توسط حضور یک توالی پایان که در کنار جایگاه loxP قرار گرفته است، بلوکه می شود. وقتیکه توالی پایان توسط ریکامبیناز Cre حذف می‌شود، گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می شود (شکل ۳). متاسفانه گرچه این روش مکان فعالیت 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 ریکامبینازهای گرفته شده از فاژها برای هدف‌گیری ژنها تنها محدود به ریکامبیناز Cre نیست. در واقع، ریکامبیناز Dre که از باکتریوفاژ D6 بدست آمده است بطور موثری نوترکیبی در جایگاهای rox در سلولهای یوکاریوتی و موش را انجام می دهد(۱۵, ۱۴). قابل ذکر است، که Dre و Cre با توالی شناسایی یکدیگر واکنش نمی دهند و بنابراین، این امر مزیتی برای انجام دو رویداد مستقل نوترکیبی در یک رده موشی می باشد. مشابه Dre، ادغامگر ΦC31[۱۲] که همچنین از باکتریوفاژ گرفته شده است، در حذف‌های ژنی در موش موفق عمل می کند (۱۶). بطورکلی ادغامگر ΦC31 وظیفه حذف توالی ژنتیکی که در کنار جایگاهای شناسایی attP و attB قرار گفته اند را برعهده دارد. زمانیکه سیگنال مکان‌یابی هسته[۱۳] به این ادغامگر وصل می شود به نظر می رسد کارآمدی آن در حذف توالی ژن هدف، مشابه ریکامبیناز Cre باشد (۱۷). با در نظر گرفتن تعداد اندک رده های موشی که توسط Dre و ΦC31 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.

[9] Reporter Mice
[10] β-galactosidase
[11] Green Fluorescent Protein(GFP)
[12] Integrase
[13] Nuclear Localization Signal

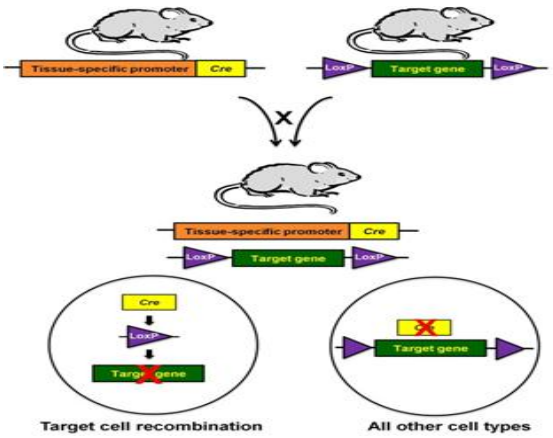


شکل ۲. سیستم Cre/loxP. ایجاد حذف ژنی بطور موضعی در موش مستلزم ایجاد دو رده موشی مستقل می باشد: یک رده ، که ریکامبیناز Cre را تحت کنترل یک پروموتر ویژه بافتی بیان می کند و رده موشی دوم، که در طرفین ژن مورد نظر جایگاه‌های loxP قرار گرفته‌اند. سپس این دو رده مستقل، با هم آمیزش داده می شوند، تا حذف ژنی بطور موضعی حاصل یابد. در مورد **a**، loxP در جهت‌های یکسان قرار میگیرد، نوترکیبی مبتنی بر Cre، بین جایگاهای 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 جایگاهای loxP می شود(۷).

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 قرارگرفته اند، استفاده می شود، که منجر به فعال سازی بیان گزارشگر در دودمان سلولی مورد نظر می گردد. 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[۱۴] را در طی تکوین جنینی بیان می کنند، مورد استفاده قرار گرفته است(۱۸).

[14]Protease Renin



شکل ۳. تولید موشهای Cre/loxP. در این روش، رده موشی با بیان Cre که تحت کنترل پروموترهای 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. وقتیکه توالی پایان توسط ریکامبیناز Cre حذف می‌شود، ژن گزارشگر در سلولهایی که دارای فعالیت Cre هستند، بیان می شود[۴۱].

سیستم Flp/FRT: آنالوگ یوکاریوتی سیستم Cre/loxP

سیستم Flp/FRT یک جایگزین برای سیستم Cre/loxP است. Flp، یک ریکامبیناز یوکاریوتی است، که از مخمر گرفته می شود.مشابه Cre، Flp می تواند برای حذف توالی ژنتیکی که در کنار هومولوگ loxP یعنی FRT قرار گرفته‌اند، استفاده شود. در مقایسه با Cre، کارآمدی نوترکیبی در سیستم Flp/FRT ضعیف است. از اینرو، با ایجاد جهش‌هایی در Flp، باعث پایداری بهتر آن در دمای ۳۷ °C و بهبود کارآمدی نوترکیبی در ژنوم موش شده اند(۱۷). تاکنون، مدل‌های 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 می‌رسد سیستمهای Flp/FRT و Cre/loxP با یکدیگر واکنش نمی‌دهند، و بنابراین این سیستم‌ها ممکن است امکان موفقیت در ایجاد 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، غیرفعال‌سازی ژن بطور موضعی را فراهم می سازند. هرچند، هیچ کنترلی روی زمان نوترکیبی وجود ندارد. چراکه بیان و فعالیت Cre کلا به پروموترهای اختصاصی بافت انتخابی بستگی دارد. از اینرو، فعالیتCre و متناوبا غیرفعال‌سازی ژن در بافت هدف ممکن است، در مراحل اولیه تکوین جنینی روی دهد، که منجر به فعال‌سازی سیستم‌های جبرانی می شود، که ممکن است تفسیر فنوتیپ حاصله را دشوار سازد. همچنین، غیرفعال‌سازی ژن در زمان جنینی منجر به مرگ می‌شود. بهره گیری از سیستم سنتی Cre برای حذف ژن بطور موضعی ممکن است منجر به پیچیده شدن شرایط شود، چراکه پروموتر اختصاصی بافتی که فعالیت Cre را در موش بالغ کنترل می کند، ممکن است این پروموتر، در طی

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 می‌توانند حذف ژنی را در زمان مشخص در موش انجام دهند: سیستم Cre/گیرنده استروژن و سیستم وابسته به تتراسایکلین[15].

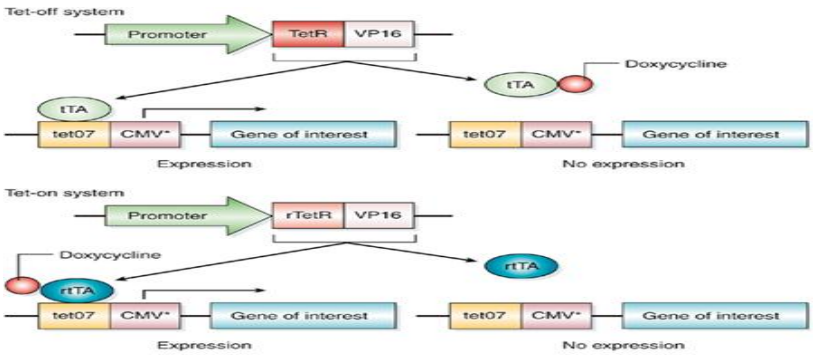
سیستم Cre/گیرنده استروژن، براساس ماهیت گیرنده‌های استروییدی استوار است، که بطور عمومی در سیتوپلاسم واقع شده‌اند. زمانیکه لیگاندهای مربوطه به گیرنده خود متصل می شوند، این کمپلکس به هسته سلولی منتقل می‌یابد تا رونویسی از ژن را القا کند. بنابراین، زمانیکه ریکامبیناز Cre به یک گیرنده استروییدی متصل می شود(مثل گیرنده استروژن)، انتقال ریکامبیناز Cre به هسته که محل انجام نوترکیبی است، توسط استروژنها هدایت می شود. درغیاب استروژنها، توانایی انتقال هسته‌ای ریکامبیناز Cre توسط گیرنده استروژنی بلوکه می شود. هرچند، انتقال هسته‌ای ریکامبیناز Creتوسط استرادیول[16] های داخلی نیز انجام می شود، که نمی توان آنها را بطور آزمایشگاهی دست‌ورزی 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-۴ تاموکسیفن[17] حساس است. بنابراین، رونویسی پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن در موشهای تراریخته، توسط یک پروموتر فراگیر و یا اختصاصی بافت کنترل می شود و عمل ترجمه در سیتوپلاسم روی میدهد. زمانیکه OH-۴ تاموکسیفن به موش تزریق می شود، Cre به هسته منتقل می شود و 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، ریکامبیناز Cre ممکن است، در غیاب OH-۴ 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، نهایتا به نیمه عمر پروتئین‌های هدف بستگی دارد، و پروتئین‌های پایدار با عمر بیشتر ممکن است، وقفه‌های زمانی قابل توجهی از زمانیکه ژن حذف می‌شود، تا زمانیکه پروتئین مورد نظر حذف می‌شود، را ایجاد کنند. اگرچه، این امر ممکن است، اهمیت ناچیزی در موش‌های بالغ داشته باشد، اما می‌تواند سنجش عملکردهای ژنی را در حین تکوین جنینی دچار اشتباه سازد. مشکل بعدی مربوط به اثرات جانبی اعمال OH-۴ تاموکسیفن در موشها برای تحریک نوترکیبی می باشد. معمولا، OH-۴ تاموکسیفن زمانیکه در یک دوز منفرد اعمال می‌شود، مشکلی ایجاد نمی کند. اما تزریق مکرر آن، در موشها باعث سمییت قابل توجهی بویژه در کبد می‌شود. ارزیابی اصولی اثرات جانبی دوزهای OH-۴ تاموکسیفن، برای انجام آزمایشات هدف‌گیری 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 پروموتر فراگیر و یا اختصاصی بافت بهره برده می‌شود، تا یک پروتئین ترکیبی، مرکب از قلمروهای اتصالی به DNA یعنی tTA یا rtTA و پروتئین فعال

[15] Tetracycline(tet)Dependent System
[16] Estradiol
[17] 4-OH-tamoxifen

کننده ترانس ویروس هرپس سیمپلکس[۱۸] به نام VP16 را بیان کند. این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در حضور (rtTA=tet ON) و یا غیاب (rTA=tet OFF) تتراسایکلین و یا آنالوگ آن دوکسی سایکلین[۱۹] عمل می‌کند. پروموتر هدف این پروتئین ترکیبی، متشکل از چندین جایگاه اپراتوری tet است، که به پروموتر سایتومگالوویروس[۲۰] وصل شده است و بیان ژن مورد نظر، در این مثال، ریکامبیناز Cre، را تسهیل می سازد(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 آللی که در کنار جایگاه loxP قرارگرفته است، و دیگری برای بیان پروتئین ترکیبی Cre/گیرنده استروژن است). در صورتیکه، سیستم tet نیازمند سه رده موش دست‌ورزی ژنتیکی است: یکی حامل آللی که در کنار جایگاه loxP قرارگرفته است، دیگری بیان کننده tTA/rtTA، و بالاخره رده موشی سوم بیان کننده Cre تحت کنترل اپراتور CMV/tet. باتوجه به اینکه این دست‌ورزی‌های ژنتیکی مستقل از همدیگر هستند، سیستم tet، مستلزم زمان بیشتری است.

[18] Herpes Simplex Virus Transactivator Protein
[19] Doxycycline
[20] Cytomegalovirus (CMV)



شکل ۴. سیستم‌های Tet-ON & Tet-OFF.در سیستم Tet-OFF،از یک پروموتر 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 می‌کند و باعث بیان ژن مورد نظر میگردد. پروموتر هدف پروتئین ترکیبی، متشکل از چندین جایگاه اپراتوری tet است، که به پروموتر سایتومگالوویروس وصل شده است و بیان ژن مورد نظر را تسهیل می سازد. در سیستم Tet-ON، TetR به rTetR جهش داده می‌شود که این پروتئین ترکیبی بعنوان یک فاکتور فعال کننده رونویسی در حضور دوکسی سایکلین عمل می‌کند و باعث بیان ژن مورد نظر میگردد[۴۱].

چشم اندازهای آتی

رویداد نوترکیبی همولوگ، در ESCs و تولید موشها با کمک این سلولهای دست‌ورزی شده، همچنان روش انتخابی برای ایجاد جهش‌های پوچ[۲۱] در یک ژن خاص می باشد. هرچند، این روش پایه، بسیار زمانبر و پرهزینه می‌باشد. از طرفی، برای انجام روشهای هدف‌گیری 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 می‌شود. روش‌هایی که در ادامه بحث خواهند شد، کارآیی روشهای هدف‌گیری ژن را بهبود می بخشند. این روشها عبارتند از: نخست، فناوری به دام اندازی ژن[۲۲]، که امکان هدف گیری تصادفی تمام ژنهای بیان شده در ESCs را فراهم می سازد؛ دوم، مداخله RNA[۲۳]، 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[۲۴](ZFN)، که برای هدف‌گیری ژنها استفاده می‌شود.

در این روش، mRNA هایی که نوکلئازهای انگشت روی را کد می‌کنند به جنین تک سلولی تزریق شده، تا بطور اختصاصی شکست‌هایی در محل DNA دو رشته‌ای هدف ایجاد کند؛ این روش نیز به دست‌ورزی ESCs نیازی ندارد؛ چهارم، نوکلئازهای اثرگرشبه فعال‌کننده رونویسی[۲۵] (TALENs)هستند؛ و پنجم، نوکلئازهای مهندسی‌شده تحت هدایت RNA[۲۶] (RGENs) که کاربرد وسیعی در مهندسی ژنوم دارند.

فناوری به دام اندازی ژن

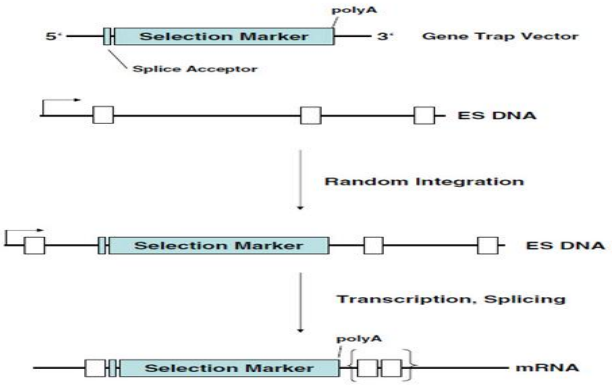
پیشرفته ترین روشی که تاکنون برای هدف‌گیری تصادفی ژن وجود دارد، فناوری به دام اندازی ژن است (شکل ۵). در این روش، ESCs بوسیله یک وکتور، آلوده می‌شوند. این وکتور، شامل یک توالی کد کننده برای یک مارکر انتخابی است، که باعث مقاومت به نئومایسن میشود، که در انتهای ۵′آنیکتوالیپذیرندهقوی پردازش واقع شده است. چون وکتور استفاده شده فاقد یک پروموتر داخلی است، برای بیان ژن مقاومت، نیاز به این است، که وکتور بطور

[21]Null mutations
[22]Gene Trap Technology
[23]Ribonucleic Acid (RNA) Interference
[24]Zinc Finger Nucleases
[25]Transcription activator-like effector nucleases
[26]RNA-guided engineered nucleases

تصادفی داخل چارچوپ یک ژن، ادغام شده باشد (در بیشتر موارد این محل، یک اینترون است)، تا بتواند، بطور فعالی رونویسی گردد. در این مورد، پروموتر داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل اگزونهای داخلی می باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومایسین می باشند. پروتئین حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئین هدف و پروتئینی که باعث مقاومت می‌شود، می باشد. ترجمه، معمولا در پایین دست مارکر انتخابی متوقف می‌گردد و منجر به از دست رفتن آمینو اسیدهایی می‌شوند که در پایین دست محل ورود وکتور واقع شده اند. سپس، کلونهای ESCs که مقاوم به نئومایسین می‌باشند بوسیله RACE-PCR و توالی‌یابی شناسایی می‌شوند. متاسفانه، چندین اشکال در این روش موجود است. نخست، چون انتخاب و شناسایی کلونهای ESCs که مقاوم به نئومایسین هستند، وابسته به بیان نشانگر انتخابی هستند، ازاینرو، تنها ژنهایی که در سلولهای بنیادی جنینی بیان میشوند، در این روش برای هدف‌گیری مناسب هستند. دوم، گرچه رونوشت ترکیبی منجر به ایجاد پروتئینی جهش یافته و فاقد عملکرد میشود، با اینحال، پروتئین 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[۲۷] و نه ناک اوت شده است. چهارم، زمانیکه جایگاه ادغام وکتور نزدیک به انتهای ۳´ ژن می باشد، نحوه عملکرد پروتئین ترکیبی باید معلوم گردد. پنجم، بعلت 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 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[۲۸] را ایجاد کنند، که هدف مشترکشان هدف‌گیری تمام ژنهای در دسترس می‌باشد (۲۱, ۲۲).

[27] Knockdown

[28] International Gene Trap Consortium



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'آنیکتوالیپذیرندهقوی پردازش واقع شده است. چون وکتور فاقد یک پروموتر 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، پروموتر داخلی ژن مربوطه، بیان یک رونوشت ترکیبی را هدایت می‌نماید. این رونوشت ترکیبی، شامل اگزونهای داخلی می باشند، که در بالا دست محل ورود وکتور واقع شده و همچنین شامل کاست مقاومتی نئومایسین می باشند. پروتئین حاصله، مرکب از بخشهایی از پروتئین هدف و پروتئینی که باعث مقاومت می‌شود، می باشد[۷].

مداخله اسید ریبونوکلئوییک

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 احتمالا بعنوان بخشی از سیستم دفاعی سلولی علیه RNA های دو رشته ای 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[۲۹](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 رشته ای کوتاه با طول ۵۰ جفت باز می‌شود. این RNA ها دارای همولوژی داخلی می باشند، که باعث می شود خودبخودی RNA های دو رشته ای کوتاه به طول ۲۱- ۲۳ جفت باز، به همراه یک ساختار سنجاق سری در یک انتها ایجاد می کنند(که به RNA سنجاق سری کوتاه[۳۰] معروفند). معمولا، از پروموترهای آنزیم پلی مراز III برای بیان این RNA های کوتاه استفاده می شود(۲۵). اولین رده موشی که shRNA خارجی را بیان می کرد، در سال ۲۰۰۲ گزارش شد. هاسووا[۳۱] و همکارانش با موفقیت توانستند، بیان GFP را در رده موشی که بطور فراوان GFP را بیان می کرد، 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 می دهد؛ نخست، گرچه بیان ژن هدف بصورت قابل توجهی سرکوب شد، با اینحال مدل موشی هنوز یک "ناک‌دان" محسوب می شود،

[29] ShortInterfering RNAs (siRNAs)

[30] Short Hairpin RNA

[31] Hasuwa

تا "ناک‌اوت". دوم، همانطور که در مورد موشهای تراریخته دیده می‌شود، اثر جایگاه کروموزومی[۳۲] 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: نوترکیبی 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 نوترکیبی همولوگ، عمدتا بر روی موشها انجام شده است، که این امر، بعلت محدودیت در دسترسی به ESCs سازگار در سایر گونه‌ها است. با این حال، چون در روش مداخله RNA از ESCs استفاده نمی شود، این روش در سایر گونه‌ها نیز قابل استفاده خواهد بود.

همانطور که در موشهای ناک اوت تولید شده بوسیله روش‌های سنتی دیده می شود، موشهای تراریخته shRNA می توانند، منجر به ناک‌دان ژن هدف بطور وسیعی گردند، چراکه در آن از پروموترهای آنزیم پلی مراز 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 می شود که در آن یک رده موشی Cre را تحت کنترل پروموترهای اختصاصی بافتی بیان می‌کند، و رده دیگر حامل یک کاست بیانی نئومایسین که است که در طرفین آن جایگاه loxP قرارگرفته است و این مجموعه، همگی در داخل پروموتری واقع شده است، که رونویسی shRNA را هدایت می کند. در حالت عادی کاست بیانی نئومایسین فعالیت پروموتر بیان کننده shRNA را بلوکه میکند. اما وقتی که کاست بیانی نئومایسین توسط Cre برداشته می شود، shRNA در سلولهایی که Cre را بیان 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-neo-loxP-Fgfr2shRNA[۳۳] بود، با موش EIIa-Cre کراس داده شد. موش EIIa-Cre، Cre 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$^{-/-}$ دیده می‌شود، موش U6-Fgfr2/EIIa-Cre در اواسط بارداری می‌میرد. در حالیکه موش U6-loxP-neo-loxp-Fgfr2/Cre^{-} که کنترل محسوب می شود، زنده می ماند. اگر موش loxP-neo-loxP-Fgfr2 را با موشی که بیان Cre در آن محدود به اندام خاصی می باشد، کراس داده شود، موش Fgfr2 shRNAزنده 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 تزریقsiRNAs خارجی انجام‌پذیر است. رایج‌ترین مسیر اعمال siRNA بر اساس روشی بنام تزریق هیدرودینامیکی[۳۴]استوار است،که در طی آن، 1.5-2.5 mL محلول نمک ایزوتونیک محتوی ۵۰۰–۵۰ 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، لویس[۳۵] 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

[32] ChromosomalPosition Effects

[33] Fibroblast Growth Factor Receptor 2

[34] Hydrodynamic Injection

[35] Lewis

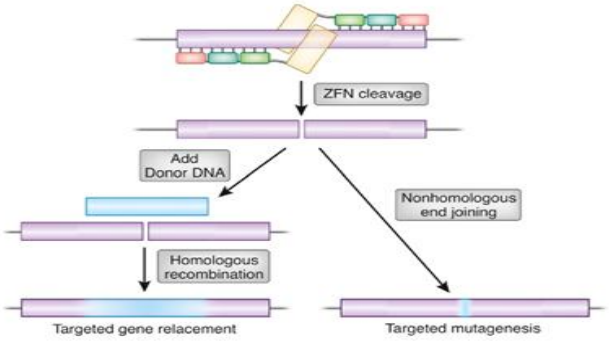
کرد، که این امر بیانگر کاربرد این شیوه برای اهداف درمانی است(۲۹).

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 می‌کند. زمانیکه این دستگاه به شدت فعال شود، تاثیر مهمی بر متابولیسم سلولی می گذارد و باعث آپوپتوز می‌شود. بعلاوه، اثرات غیر اختصاصی (نظیر مهار mRNA هایی بجز mRNA هدف)، باید همچنین در نظر گرفته شوند. از اینرو، انتخاب کنترل‌های صحیح بسیار مهم است. یک روش این است، که از الیگونوکلئوتیدهای تصادفی که بطور پیش فرض هیچ mRNA ای را هدف قرار نمی گیرند، استفاده کنیم تا بتوان اثرات siRNA مستقل از توالی‌هایشان بررسی کرد. یک روش بهتر، استفاده از کنترل‌های siRNA که دارای جهش های تک نقطه‌ای می باشند، گرچه باید توجه شود، که siRNA جهش یافته با mRNA هدف تداخل ایجاد نکند (۳۰).

نوکلئازهای انگشت روی

نوکلئاز 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 اتصالZFN را به توالی DNA هدف تسهیل می‌سازد. یک هترودایمر، متشکل از دو ZFN منفرد هست، که در جهت ویژه‌ای قرار گرفته‌اند، و این فاصله منجر به فعال‌سازی قلمرو کاتالیتیکی شده و نتیجتا باعث ایجاد شکاف درDNA 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 می‌شود. حالت دوم، باعث باعث تغییر توالی DNA (حذف یا ورود) در محل ترمیم می شود که برای هدف گیری ژن مناسب می‌باشد. ZFNs، بطور موفقیت آمیزی برای هدف‌گیری ژنها در دروزوفیلا[36]، ماهی گوره خری[37] و سلولهای پستانداران استفاده شده‌اند(۳۱). متاسفانه، ZFNs، سمیت قابل توجهی در برخی از سلولها ایجاد میکنند. این مسئله بطور نسبی با طراحی FokIجهش 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. هدف‌گیری 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 نوکلئاز انگشت روی، یک ابزار امید بخشی برای دست‌ورزی‌های ژنتیکی در پستانداران می‌باشد. در مقایسه با سایر روش های رایج برای غیر فعالسازی ژن، که تقریبا کاربردشان محدود به موش می‌باشد، این روش جدید دو مزیت کلیدی دارد: نخست آنکه، چون ESCs در این روش به کار برده نمی‌شوند بنابراین، این روش جدید، مناسب سایر گونه‌ها هم می‌باشد. و دوم آنکه، این روش از نظر هزینه و زمان مطلوب می‌باشد.

[36]Drosophila



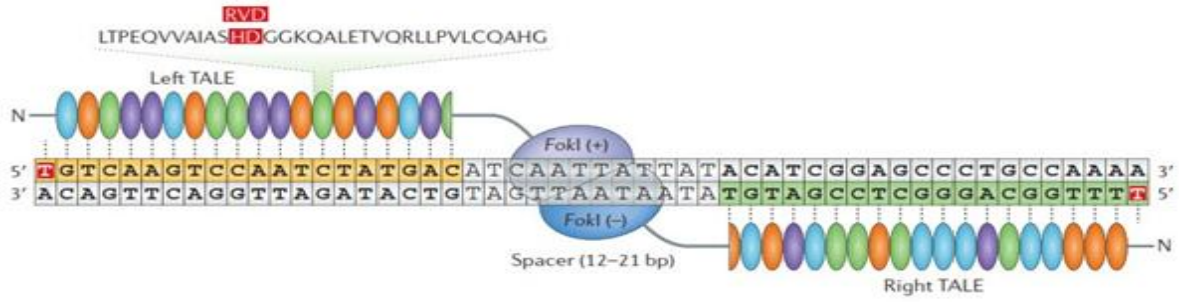
شکل ۶. نوکلئاز انگشت روی. نوکلئاز انگشت روی، متشکل از دو دومین می باشد. اول، دومین شکافت آنزیم محدود کننده FokI است، دوم، یک دومین شناسایی DNA می‌باشد، که شامل تعدادی موتیف انگشت روی می‌باشد، که اتصال نوکلئاز انگشت روی را به توالی DNA تسهیل می‌سازد. یک هترودایمر، متشکل از دو نوکلئاز انگشت روی منفرد هست، که در جهت ویژه‌ای قرار گرفته‌اند، و این فاصله منجر به فعال‌سازی دومین کاتالیتیکی شده و نتیجتا باعث ایجاد شکاف در DNA دورشته‌ای می گردد. این شکاف دو رشته‌ای، در سلول توسط نوترکیبی همولوگ (بهره گیری از آلل سالم بعنوان الگو) ترمیم می‌شود[۴۲].

نوکلئازهای اثرگر شبه فعال‌کننده رونویسی

TALENsبرای تغییر ژن‌ها در گونه‌های مختلفی نظیر ویروس‌ها، 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 پروتئین‌های متصل شونده به DNA بنام TALEs[۳۸] بهره می‌برند که از باکتری بیماریزا Xanthomonas spp گرفته شده است.

TALEs از ردیف‌های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه‌ای تشکیل شده‌اند که هریک از این ردیف‌ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می‌کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف‌ها توسط دو اسیدآمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته‌اند تعیین می‌شود که به آنها جایگاه‌های متغیر دو اسید آمینه‌ای [۳۹] (RVDs) گفته می‌شود (شکل ۷). چهار RVD مختلف بنام Asn-Asn, Asn-Ile, His-Asp و Asn-Gly بطور وسیعی به‌ترتیب 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 می‌باشد(۳۳).

[38] Transcription activator-likeeffectors
[39] Repeatvariable diresidues

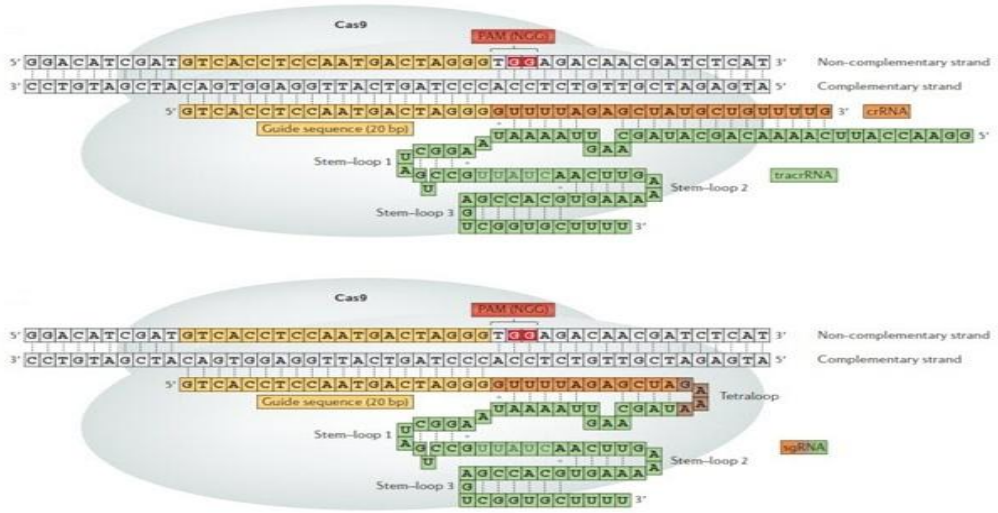


شکل ۷- TALEs از ردیف‌های پشت سرهم تکرارهای ۳۳-۳۵ اسید آمینه‌ای تشکیل شده‌اند که هریک از این ردیف‌ها یک جفت باز منفرد را در شیار بزرگ شناسایی می‌کنند. ویژگی اختصاصی هر یک از این ردیف‌ها توسط دو اسیدآمینه که در جایگاههای ۱۲ و ۱۳ قرار گرفته‌اند تعیین می‌شود که به آنها جایگاه‌های متغیر دو اسید آمینه‌ای (RVDs) گفته می‌شود[۴۳].

نوکلئازهای مهندسی‌شده تحت هدایت RNA

در ابتدا این نوکلئازها برای ایجاد جهش‌زایی هدفمند در باکتری، جنین‌های ماهی گوره خری و سلولهای پستانداران مورد استفاده قرار گرفتند. بعد آن زمان به بعد، این روش در سیستم‌های مختلفی نظیر گیاهان، نماتودها، مگس سرکه، موش و پرایمات‌ها توسعه یافته اند. در باکتری‌ها، سیستم‌های برش DNA تحت هدایت RNA، نوعی ایمنی اکتسابی علیه پلاسمیدها و فاژهای مهاجم فراهم می‌سازند. باکتریها، اغلب قطعات کوچک DNA خارجی (بطول ۲۰ جفت‌باز) را گرفته و این قطعات که protospacer نامیده می‌شوند را وارد ژنوم خود نموده تا گروه منظمی از تکرارهای پالیندرومیک کوتاه به نام CRISPR[۴۰] را بوجود آورند. این نواحی CRISPR، رونویسی شده تا RNA پیش‌ساز CRISPR به نام pre-crRNA را ایجاد کنند و سپس مورد پردازش قرار گرفته تا crRNA های هدفمند را بوجود آورند. crRNA های فعال‌کننده ترانس (tracrRNA)[۴۱] که همواره ثابت هستند نیز رونویسی شده و در پردازش pre-crRNA شرکت می‌کنند. هر دو crRNA و tracrRNA با پروتئین ۹ وابسته به CRISPR (Cas9) تشکیل کمپلکس داده و یک DNA آندونوکلئاز فعال را تشکیل می دهد. آندونوکلئاز حاصله، توالی ۲۳ جفت بازی DNA را که مرکب از توالی ۲۰ جفت بازی راهنما (که protospacer نامیده می‌شود) و ′5-NGG-3′ و یا ′5-NAG-3′ (که موتیف کناری protospacer[۴۲] نامیده می‌شود) است را شناسایی می‌نماید. crRNA و tracrRNA می‌توانند بهم دیگر متصل شوند و تشکیل RNA راهنمای تک رشته‌ای[۴۳] (sgRNA) نمایند که باعث ساده‌ترشدن ساختار CRISPR می‌شود. برتری اصلی RGENs نسبت به سایر نوکلئازها، آماده‌سازی و طراحی ساده آنها می‌باشد(۳۳).

[40] clustered regularly interspaced short palindromic repeat
[41] Trans-activating crRNA
[42] Protospacer adjacent motif
[43] single-chain guide RNA



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 ´3-NGG-´5 و یا ´3-NAG-´5 (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 ساده‌ترشدن ساختار CRISPR می‌شود [۴۳].

بحث

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[۴۴] 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[۴۵] به درون پیش هسته [۴۶]جنین تک سلولی می باشند، که این قطعه بطور تصادفی در ژنوم موش ادغام می گردد(۳۸). این روش عمدتا برای افزایش بیان ژنهای خودی و یا بیان ژن‌های هترولوگ که در ژنوم موش طبیعی[۴۷] وجود ندارند،مورد استفاده قرار میگیرد. دسته دوم ، موشهای تراریخته شده، می توان با تزریق ESCs، که ژنوم آنها دست‌ورزی شده، به داخل بلاستوسیست تولید نمود (۳۹). برای این منظور، ابتدا سلولهای جنینی کشت داده می شوند و توسط یک قطعه DNA آلوده می شوند. این قطعه حاوی توالی از DNA است، که شبیه ژنی می باشد، که قرار است دچار تغییر شود (۴۰). سپس، آندسته از سلولهای جنینی که دچار نوترکیبی همولوگ می شوند، انتخاب می‌گردند. برخلاف موشهای تراریخته کلاسیک، رده‌های موشی حاصل از نوترکیبی در سلولهای جنینی، موشهای هدف گیری شده ژنی[۴۸] نامگذاری می شوند، و بیانگر این امر هستند که یک ژن ویژه، دست‌ورزی شده است. در اغلب موارد این

[44] Knockout Mice
[45] Transgene
[46] Pronuclear
[47] Wild Type
[48] Gene Targeted

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

نتیجه گیری

طی سالیان گذشته، دو روش ذکر شده پیشرفت کرده‌اند و میزان موفقیت برای دست‌ورزی ژنی در ژنوم موش بطور چشمگیری افزایش یافته است. هرچند به موازات تعداد روبه رشد مدل‌های موشی تراریخته، نقاط ضعف این روشها بیشتر نمایان شده‌اند، ولی باعث بهبود فنی این روشها شده است.

تشکر و قدردانی

اززحمات کلیه اساتید و دوستانی در تیم تحقیق، گردآوری، تنظیم منابع ومطالب تشکر و قدردانی میگردد.

Reference

1. 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.

2. Amirrasouli MM, Shamsara M. Comparing the in vivo and in vitro effects of hypoxia (3% O2) on directly derived cells from murine cardiac explants versus murine cardiosphere derived cells. J Stem Cells Regen Med 2017;13:35-44.

3. Austin CP, Battey JF, Bradley A, Bucan M, Capecchi M, Collins FS, et al. The knockout mouse project. Nat Genet 2004;36: 921-4.

4. van Amerongen R, Nusse R. Towards an integrated view of Wnt signaling in development. Development 2009;136:3205-14.

5. 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.

6. 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.

7. Castrop H. Genetically modified mice-successes and failures of a widely used technology. Pflugers Arch 2010;459:557-67.

8. 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.

9. Saeedinia 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 animaltissue samples. Iran J Biotechnol 2008; 6: 222-8.

10. 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.

11. 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 heterospecificCre 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, mammaliancells 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 FLPe 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-inducibleCre 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 Wnt3agene 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 ingene 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, KimJS. A guide to genome engineering with programmable nucleases. Nat Rev Genet 2014;15:321-34.