ترجمه: دکتر محمدرضا نوری دلویی
بخش بیوشیمی - دانشکده پزشکی
دانشگاه علوم پزشکی تهران
آذین نوروزی
کارشناس ارشد شیمی تجزیه

جایگزینی ژن

نشانه‌گیری شده

«قسمت اوّل»

مقدمه:

در سالهای اخیر پیشرفتهای عظیم به دست آمده در دانش زیست شناسی بویژه در زمینه مولکولی با سرعتی حیرت‌انگیز، تحولات و نوآوریهای زیستی - صنعتی بیشماری را ایجاد کرده است. از جمله در زمینه علوم پزشکی و دارویی با ابداع روشهای کاملاً جدید و یا تکمیلی در مسیر شناسایی و تشخیص مولکولی و دقیق مکانیسمهای بیماریزایی و درمان نسبی، اما اساسی بسیاری از بیماریهای ارثی قدمهای بلندی برداشته شده است که به عنوان نقطه عطفی در تاریخ علم پزشکی و مبارزه با بیماریهای انسان، سرفصل جدیدی را به نام پزشکی مولکولی به ارمغان آورده است. و می‌توان گفت که پزشکی آینده بیشترین توجه را به زمینه تشخیصی و پیشگیری معطوف خواهد نمود.

نویسنده برجسته و دانشمند مقاله حاضر، پروفسور ماریو کاپچی و همکارانش با پژوهشهای ارزنده و مستمر خود در طی چندین دهه، اخیراً روش نشانه‌گیری ژنی را برای ایجاد تغییر ویژه و دلبخواه در هر ژن شناخته شده از ژنوم موش ابداع کرده‌اند و بدین ترتیب توفیق یافته‌اند تا خدمات برجسته‌ای به جامعه بشری ارائه کنند. کاربردهای فراوان این روش در زمینه‌های مختلف علوم زیستی و بویژه علوم پزشکی که در مقاله حاضر به تفضیل به آن اشاره شده است، سبب ایجاد تحولات اساسی در این قلمروها گردیده است.

لازم به یادآوری است که ماریو کاپچی که در ورونای ایتالیا متولد شده است پژوهشگر انستیتو پزشکی هوارد هیوز و پروفسور ژنتیک انسانی در دانشگاه پزشکی یوتا میباشد. پژوهشهای وی علاوه بر ابداع فنون

تشریح شده در این مقاله، به روشن شدن مکانیسم سنتز پروتئین کمک کرده است. کاپچی همچنین در کشف ردیفهای افزایش دهندهٔ واقع در بخش تنظیمی مولکول DNA و توسعه فن بسیار متداول کنونی برای تزریق مستقیم DNA به هسته سلولها، سهیم میباشد.

نشانه‌گیری ژنی:

هریک از سلولهای بدن آدمی در درون هسته خود حاوی دستورالعملی است که فعالیت آنرا رقم میزند. گرچه هر سلول دارای دستور کار یکسانی است، اما انواع مختلف سلولها مانند کبد یا پوست، برای تعیین و انجام اعمال خود، قسمتهای متفاوتی از این برنامه کار را بکار می‌برند. اطلاعات موجود در دستور کار که به یک جنین تک سلولی، یعنی تخم بارور شده، این امکان را می‌دهد که بتواند مراحل مختلف جنینی را سپری کرده و سپس به یک نوزاد تبدیل شود، شاید برجسته‌ترین این رویدادها به حساب آید. (توضیح مترجمین: دوران زندگی داخل رحمی معمولاً به دو مرحله کلی تقسیم می‌شود. مرحله نخست که جنین به نام امبریو نامیده می‌شود. در خلال این مرحله که برحسب برخی مراجع علمی هشت هفته اول و برابر بعضی مراجع دیگر دوازده هفته اول را شامل می‌باشد. با تقسیم و تکثیر سلولی، بافتها، اعضاء و اندامهای مختلف بدن شکل می‌گیرد. البته در سه هفته نخست این مرحله، تنها تقسیم سلولی انجام می‌گیرد. مرحله دوم، پس از هفته هشتم، برابر برخی منابع - و یا پس از هفته دوازدهم - برحسب بعضی مراجع - آغاز و تا هنگام تولد ادامه می‌یابد. در این مرحله که به آن فتال می‌گویند، جنین بنام فتوس خوانده می‌شود و با رشد و تکامل سریع آن، اعضاء، اندامها و دستگاههای گوناگون بدن تشکیل می‌شود. در مجموع، تقریباً کمتر از یک سوم نخست دوران بارداری مرحله امبریونیک و بقیه آن تا هنگام تولد مرحله فتال جنین را شامل می‌باشد).

کودک، در خلال بلوغ فیزیکی و فکری، هنوز از اطلاعات موجود در آن دستورالعمل استفاده می‌کند. هریک از انسانها، دستور کار یا گنجینه وراثتی خاص خود را داشته و از این نظر بی‌همتایند، بنابراین، دستورالعمل در هر یک از آدمیان - نسبت به دیگران - اندکی متفاوت است. این برنامه کار دربردارنده اکثر خصوصیات فیزیکی و بسیاری از ویژگیهای رفتاری هر فرد بوده که (جایگاه) تک تک افراد را در میان آدمیان متمایز می‌سازد.

دستورالعمل خارق‌العاده مورد اشاره در بالا، که به ژنوم معروف است، در شکل یا ترکیب نوکلئوتیدها نوشته شده است. الفبای کامل این دستورالعمل - چهارحرفی - از چهار نوکلئوتید تشکیل شده است - آدنیلات (A)، سیتیدیلات (C)، گوانیلات (G)، و تیمیدیلات (T). در واقع، ردیف دقیق نوکلئوتیدها در مولکول DNA است که اطلاعات را منتقل میسازد، بسیار شبیه ردیف حرفها در یک کلمه که معنی آن کلمه را به ذهن انسان متبادر می‌کند. در خلال هر تقسیم سلولی، تمام

دستور کار همانندسازی شده و از سلول مادر، یک نسخه (از آن) به هرکدام از دو سلول دختر به ارث می‌رسد. در انسان و موش، برنامه کار مورد بحث دارای سه میلیارد نوکلئوتید است. برای درک بهتر عظمت کار لازم است اشاره شود که چنانچه تنها حروفِ نمایانگر نوکلئوتیدها، به دنبال هم در یک صفحه که میتواند ۳۰۰۰ عدد از آنها را دربرگیرد، نوشته شوند، دستورالعمل یا برنامه کار مشتمل بر هزار جلد و هر جلد به تعداد هزار صفحه خواهد بود. بنابراین، برای هماهنگی و «هدایت» ایجاد یک انسان یا یک موش از یک تخم بارور شده یک دستورالعمل بسیار پیچیده مورد نیاز است.

نویسنده مقاله حاضر و همکاران در دانشگاه یوتا، اخیراً روشی را برای ایجاد تغییر ویژه در یکی از حروف، یک جمله یا چندین پاراگراف دستورالعمل موجود در درون هر سلول زنده موش ابداع کرده‌اند. با دوباره نویسی قسمتهایی از برنامه کار وارزیابی نتایج حاصل از دستورات تغییر یافته در ارتباط با اعمال فرآیندهای توسعه و تکوین یا پس از مراحل تکوینی موش، می‌توان پیرامون برنامه‌هایی که این فرآیندها را تحت سلطه خود دارند بصیرتها و اطلاعات ارزشمندی بدست آورد.

واحدهای فعال درون دستور کار، ژنها هستند. پژوهشگران قادر هستند به طرزی اختصاصی ردیف نوکلئوتیدی مربوط به یک ژن مورد نظر خود را تغییر داده و به این ترتیب عمل آن ژن را نیز تغییر دهند. برای نمونه، اگر به درگیری یک ژن ویژه در مراحل توسعه و تکوین مغز مظنون باشیم، میتوانیم جنینهای موشی تولید کنیم که در آنها ژن طبیعی مورد اشاره در بالا ویران یا به طور کامل غیرفعال شده باشد. چنانچه این غیرفعال شدن باعث شود که مخچه موشهای تازه متولد شده غیرطبیعی باشد، درخواهیم یافت که ژن مورد سوال در شکل‌گیری آن بخش مغز نقش اساسی و ضروری داشته است. فرآیند یا روشی که توسط آن، یک سری تغییرات اختصاصی در درون ردیف نوکلئوتیدی یک ژن انتخاب شده (مورد نظر) صورت می‌گیرد، نشانه (هدف)گیری‌ژنی نامیده می‌شود.

بیشتر آنچه که از تجارب نشانه‌گیری ژنی در موش آموخته می‌شود، می‌تواند برای انسان سودمند واقع گردد، زیرا تخمین‌های بعمل آمده نشان داده است که حدود ۹۹ درصد یا حتی بیشتر ژنهای موجود در موش و انسان یکسان بوده و اعمال کاملاً مشابهی را انجام می‌دهند. استفاده از این تکنولوژی در موش، چندی است روشن ساخته است که نه تنها از چگونگی مراحل توسعه و تکوین جنین انسان نیز می‌توان پرده برداشت بلکه راههایی را که توسط آن سیستم ایمنی شکل گرفته و برای مبارزه با عفونت به کار رفته است، هم آشکار نموده است. نشانه‌گیری ژنی می‌تواند تا دوردست سیر کرده از اسراری مانند چگونگی عمل مغز انسان پرده برداشته و چگونگی پیدایش - دقایق مولکولی - بیماری توسط نواقص ژنی را توضیح دهد. برای رسیدن به

هدف اخیر، با استفاده از این فن، هم اکنون الگوهای موش واجد اختلالات انسانی مانند فیبروزکیستیک ، سرطان و تصلب شرائین ، در دست تولید است.

هیجان در مورد نشانه‌گیری ژنی منبع دیگری نیز دارد زیرا پژوهشهای پیرامون نشانه‌گیری ژنی گسترش دانش حاصل از طرح ژنوم را تضمین می‌کند. هدف طرح عظیم و وسیع ژنوم انسانی تعیین ردیف نوکلئوتیدی کامل تمام ژنهای موجود در ژنومهای موش و انسان (حدود ۲۰۰،۰۰۰ ژن در هر یک) میباشد. امروزه، وظایف و اعمال درصد کوچکی از این ژنها در این دو گونه از موجودات شناسایی شده است. ردیف نوکلئوتیدی یک ژن، اسیدهای آمینه‌ای را که باید به هم متصل شده و یک پروتئین ویژه را بسازند، مشخص می‌کند (اکثر فعالیتهای سلولها توسط پروتئینها انجام می‌یابد). ردیف اسیدهای آمینه یک پروتئین، نشانه‌ها و کلیدهای مهمی در مورد نقش آنزیمی، اجزا ساختمانی، علامت دهنده و مانند آن برای هر پروتئین ارائه می‌کند. با وجود این، ردیف اسیدآمینه‌ای به تنهایی برای آشکار نمودن وظایف ویژه‌ای که توسط یک پروتئین در خلال زندگی یک موجود انجام می‌شوند، کافی نیست. برعکس، نشانه‌گیری ژنی میتواند این اطلاعات را فراهم ساخته و بنابراین درک و فهم ما را در مورد اعمال ژنها و پروتئینهای حاصل از آنها، بمراتب عمیق‌تر نماید.

نشانه‌گیری ژنی در مسیر مطالعه ژنتیک پستانداران و اینکه چگونه با واسطه ژنها فرآیندهای متنوع زیستی انجام می‌گیرند، راه جدیدی پیش روی پژوهشگران می‌گذارد و از آنجا که روشهای کلاسیک ژنتیک، که در تجزیه و تحلیل فرآیندهای زیستی موجودات ساده‌تر بسیار موفقیت‌آمیز بوده‌اند، برای مطالعه موجودات پیچیده‌ای مانند پستانداران قابلیت اجرا و سازگاری مناسب نداشته و ندارند، ابداع روش نشانه‌گیری ژنی یک ضرورت بود.

برای مثال، اگر ژنتیکدانها بخواهند نحوه همانند سازی مولکول DNA در موجودات تک سلولی مانند باکتری یا مخمر را فراگیرند، می‌توانند یک میلیارد یا حتی بیشتر باکتری را در معرض مواد شیمیائی آسیب‌زای DNA (یک ماده جهش‌زا) قرار دهندو با انتخاب میزان درست ماده جهش‌زا، از وجود یک جهش در یک ژن یا بیشتر از یک ژن از اعضای جمعیت اطمینان حاصل کنند و بدنبال آن از میان این جمعیت باکتری یا مخمر جهش یافته شده، آنهایی را که قادر به همانند سازی DNA خود نیستند شناسایی کنند. بالطبع، استفاده از چنین جمعیت بزرگ جهش یافته شده، براحتی امکان می‌دهد که سویه‌های متفاوت حاوی جهشهایی در هرکدام از ژنهای مورد نیاز برای همانند سازی DNA پیدا شوند (برای فرآیند پیچیده‌ای مانند همانندسازی ژنوم باکتری یا مخمر، بیش از ۱۰۰ ژن درگیر می‌باشند). بدین ترتیب، پس از شناسایی ژنهای منفرد، نقش اختصاصی آنها در همانندسازی DNA، از قبیل اینکه در فرآیند نسخه‌برداری از DNA چه

ژنهایی امر تصمیم‌گیری و چه ژنهایی درستی و میزان آن را کنترل می‌کنند، می‌توانند تعیین هویت گردند.

راههای مشابه آنچه در بالا ذکر شد در موجودات پرسلولی که از باکتریها بسیار پیچیده‌تر هستند نیز مورد استفاده قرار گرفته است. دو موجود مورد علاقه متخصصین ژنتیک‌عبارتند از Caenorhabditis elegans، یک کرم کوچک زمینی و Drosophila melanogaster که یک مگس سرکه معمولی می‌باشد. اما حتی در این اشکال نسبتاً ساده موجودات پرسلولی، شناسایی همه ژنهای درگیر در یک فرآیند زیستی ویژه، احتیاج به کار به مراتب بیشتری دارد.

چندین عامل در این مشکل فزاینده سهیم هستند که یکی از آنها اندازه ژنوم است. در حالیکه ژنوم کلی باسیل تنها ۳۰۰۰ ژن دارد، ژنوم مگس سرکه حاوی حداقل ۲۰۰۰۰ ژن است. ژنوم موش دارای ده برابر این عدد (یا ۲۰۰،۰۰۰)، ژن میباشد. با زیاد شدن تعداد ژنها، پیچیدگی نیز افزایش می‌یابد زیرا ژنها سازمانها و شبکه‌های پیچیده‌ای را می‌سازند. ردیابی اثر هریک از ژنها در یک چنین شبکه پیچیده‌ای کار دشواری است.

بعلاوه، جثه بزرگتر موجودات پرسلولی در ارتباط با شرکت تعداد نمونه‌هایی از آنها در یک آزمایش جهش‌زایی عملاً محدودیتهایی ایجاد می‌کند. جستجوی انواع بخصوصی از جهش یافته‌ها در بین یک میلیارد باکتری یا مخمر جهش یافته شده، مستلزم انجام یک آزمایش بزرگ خواهد بود. در مقام مقایسه، حد عملی غربال کردن موش برای یک جهش ویژه، - حداکثر - در حدود هزار حیوان امکانپذیر است.

مشکلات منطقی پیرامون شناسایی و مطالعه ژنها در موجودات پرسلولی با این واقعیت که اکثر آنها دیپلوئید هستند - یعنی سلولها از بیشتر ژنها دارای دو نسخه بوده که یکی از پدر و دیگری از مادر به ارث رسیده است - تشدید می‌شود. البته، از نقطه نظر بقا، داشتن دو نسخه از اکثر ژنها، امری ارزشمند میباشد. زیرا چنانچه یک نسخه دچار یک جهش زیان‌بار گردد، نسخه دیگر معمولاً میتواند (نقص را) جبران کند، تا در نتیجه هیچ خطر جدی برای موجود پیش نیاید. با این وجود، داشتن دو نسخه از هر ژن به این معنی است که یک جهش، تنها وقتی منجر به ایجاد یک نقص آناتومیک یا فیزیولوژیک خواهد شد که هر دو نسخه از ژن صدمه دیده باشد. (توضیح مترجمین: این رفتار البته در مورد ژنهایی صادق است که براساس قوانین مندل، رابطه غالب و مغلوبی با هم داشته و مثلاً بیماری از الگوی ساده اتوزومی پیروی کند. در بسیاری موارد دیگر که این نحوه توارث حاکم نیست، این مطلب صحت نداشته و بحث مربوط به خود را می‌طلبد). پژوهشگران اینگونه افراد را از طریق آمیزش والدینی که در یکی از نسخه‌های ژن خود حامل جهش هستند تولید می‌کنند. تقریباً یک چهارم فرزندان این گونه آمیزشها دو نسخه ناقص و معیوب از ژن را دارا خواهند بود. طبیعتاً نیاز به جفت‌گیری

باعث تأخیر در تجزیه و تحلیل می‌گردد.

علیرغم این چالشها، شناسایی جهشهای انتخاب شده در حیوانات کامل بدون شک بهترین راه آغازین جهت جمع‌آوری اطلاعات برای آشکار سازی و تفکیک مراحلی است که توسط آن فرآیندهای زیستی تحقق می‌پذیرند. علاوه بر این، درک فرآیندهایی که تنها در موجودات پیچیده رخ می‌دهند، مانند به اوج رسیدن یک پاسخ ایمنی پیچیده، مستلزم آن است که تجارت در موجودات پیچیده دنبال و پی‌گیری شوند. بنا به این دلایل است که ژنتیکدانهای علاقمند به مطالعه نحوه رشد و نمو و مراحل تکوینی پستانداران، طرز عمل اعصاب، پاسخ ایمنی و فیزیولوژی و بیماری، به مطالعه وسیع در موش پرداخته‌اند. از نقطه نظر علمای وراثت، موش بدلیل داشتن جثه کوچک، زاد و ولد زیاد و همچنین بعنوان یک مشابه فوق‌العاده خوب برای فرآیندهای زیستی انسان، پستانداران ایده‌آل است.

از طرف دیگر، وسعت و دامنه دست کاریهای ژنتیکی که می‌توان روی موش انجام داد، نسبت به عملیاتی که روی موجودات ساده‌تر امکانپذیر است، فوق‌العاده محدود می‌باشد. به طور مثال، به علت مشکلاتی که قبلاً شرح داده شد، استفاده از فنون کلاسیک روی موشها ممکن نیست. برای شناسایی موشی که در وی جهش روی داده است و روی ژنهای مربوط به برخی از فرآیندهای مورد نظر پژوهشگران حامل نقایصی است، متخصصین باید ۱۰،۰۰۰ تا ۱۰۰،۰۰۰ موش را به بهای گزاف، غربال کنند. در عوض، متخصصین ژنتیک موش، به طور تاریخی حیوانات جهش‌یافته‌ای را که به طور خودبخودی در درون کلنی‌ها و گروههای موشها ایجاد شده است، مطالعه نموده‌اند. در نتیجه مشاهدات دقیق و صبر و حوصله این پژوهشگران، مجموعه (کلکسیون) ایجاد شده از جهش یافته‌های موشی، که در حال حاضر موجود است، به طور تعجب‌آوری وسیع بوده و منبع ارزشمندی برای پژوهشهای مداوم می‌باشد.

با وجود آنچه ذکر شد، حتی این موشهای جهش یافته، به سختی بدست می‌آیند و کمبودها و پس‌گیریهایی دارند. بعلاوه، مجموعه فعلی موشهای جهش یافته، نمونه‌ای تصادفی از جهشهای ژنوم موش نیست بلکه دارای تعداد بی‌تناسبی از جهشهایی است که منجر به ناهنجاریها یا اختلالات فیزیولوژیک یا رفتاری قابل مشاهده می‌شوند. در نتیجه، در این مجموعه جهشهای زیادی که روی رنگ بدن (پوست موش) اثر می‌گذارند، وجود دارند، در حالی که جهشهایی که مراحل اولیه رشد و تکوین بدن را تحت تاثیر قرار می‌دهند (بدلیل آنکه اغلب منجر به مرگ غیرتشخیصی جنین می‌شوند)، کم می‌باشند.

علاوه بر آنچه ذکر شد، جداسازی ژنهای مسئول نواقص عمومی و واضح در موش جهش یافته کار بسیار دشواری است که اغلب، سالها تلاش دسته جمعی و هماهنگ را می‌طلبد. پژوهشگران البته می‌توانند مراحل زیادی از پدیده‌های زیستی را، بدون پیداکردن ژنهای

درگیر، شناسایی کنند. اما، بدون جداسازی این ژنها، قادر نیستند که در سطح مولکولی پیشرفت حاصل کنند. بویژه، قادر نیستند طبیعت پروتئینهای رمزدهی شده توسط ژنهای جهش یافته و همچنین سلولهایی را که در آنها ژنها فعال هستند، تعیین و شناسایی نمایند.

هدف گیری ژنی به پژوهشگران فرصت می‌دهد که بر مشکلات ذکر شده در بالا فائق آیند. امروزه پژوهشگران، ژنی را که قصد تغییر آن را دارند، انتخاب می‌کنند. آنها همچنین کنترل کامل روی نحوه جرح و تعدیل ژن دارند، بنابراین، برای سوالهای دقیقی که در مورد (عمل یا) اعمال ژن مطرح می‌کنند، جهش دلخواه را طراحی می‌کنند. معیار انتخاب اینکه چه ژنی تحت جهش قرار گیرد براساس دانش بدست آمده از پژوهش روی موش یا سایر گونه‌ها صورت گیرد. برای نمونه، امروزه جداسازی یک ردیف از ژنهای فعال در موشی که مراحل تکوین شکل‌گیری قلب خود را می‌گذارند، نسبتاً ساده و مستقیم است. بدنبال آن، استفاده از روش نشانه‌گیری ژنی امکان تعیین نقش هرکدام از آن ژنها را در مراحل توسعه و تکوین قلب فراهم می‌سازد. به عنوان مثال دیگر می‌توان از وجود یک دسته از ژنهایی که درگیری آنها در هدایت مسیرهای رشد وتوسعه نورونها در مگس سرکه ملانوگاستر شناخته شده می‌باشد بهره گرفت و با استفاده از روش نشانه‌گیری ژنی از این امر که آیا این ژنها در موش نیز عمل مشابهی را انجام می‌دهند یا خیر، اطمینان حاصل کرد.

یک روش ابتدایی اغلب شامل غیرفعال کردن یک ژن به منظور ارزیابی فقدان محصول آن در موجود زنده است. پیامدها ممکن است پیچیده بوده و مسیرهای متعددی را تحت تاثیر قرار دهد. بصیرت بیشتر در مورد عمل ژن را می‌توان توسط ایجاد جهشهای دقیقتر و محدودتری که تنها یکی از این نقشهای چندگانه را تحت تأثیر قرار می‌دهد، بدست آورد. در آینده‌ای نزدیک، ژنتیکدانها خواهند توانست ژنها را تحت کنترل یک کلید قرار دهند. این نوع کلیدها به پژوهشگران امکان خواهد داد که در موش و در خلال مراحل تکوینی و توسعه رویانی و پس از تولد، یک ژن را روشن یا خاموش نمایند. برای مثال، یک ژن فرضی ممکن است مسئول تولید و عملکرد مناسب دسته‌ای از سلولهای عصبی باشد. غیرفعال کردن چنین ژنی طبیعتاً باعث نبود این نورونها در خلال شکل‌گیری مغز شده و مطالعه و ارزیابی فعالیت ژن در فرد بالغ را مانع می‌شود. با این وجود، چنانچه این ژن، تحت کنترل یک کلید قرار می‌گرفت، کلید می‌توانست در خلال مراحل تکوین و توسعه روشن نگهداشته شده و نورونها نیز شکل گیرند، سپس با خاموش کردن کلید در فرد بالغ، ارزیابی عمل ژن در نورونهای افراد بالغ، توسط پژوهشگران صورت می‌گرفت.

تکنولوژی نشانه‌گیری ژنی در خلال پانزده سال که از ظهور آن می‌گذرد، پیشرفت و تکامل یافته است. نویسنده مقاله حاضر در اواخر دهه

۱۹۷۰ بـا اسـتفاده از سـوزنهای فـوق‌العـاده کوچک شیشه‌ای، تزریق مستقیم DNA به درون هسته‌های سـلولهای پسـتانداران را آزمـایش می‌کرد. سوزنها توسط دست ورزنده‌های پیش بـرنده هـیدرولیکی (آبکـافت) و بـه کـمک یک میکروسکوپ قوی به هسته‌ها هدایت می‌شدند. بازدهی این روش فوق‌العاده بود. به این معنی که از هر سه یا پنج سلول، DNA را در یک شکل فعال دریافت می‌کرد و به تقسیم شدن و انتقال DNA به سلولهای دختر خود نیز ادامه می‌داد.

هنگامی که نویسنده این مـقاله سـرنوشت مولکولهای DNA تـزریق شـده بـه هسـته در سلولها را دنبال کرد، پدیده تعجب‌آوری توجه وی را به خود جلب نمود. گـرچـه مـولکولهای DNA تازه وارد شده به طور تصادفی به یکی از کروموزومهای سلول گیرنده ادغام (وارد) شده بود، بیش از یک مولکول و همگی با جهت‌گیری یکسان می‌توانست در آن جایگاه ادغام گـردد. همانطور که در هر زبان - خواندن یا نوشتن - کـلمات، جـهتدار هسـتند (بـه طـور مـثال در انگـلیسی کـلمات ازچپ بـه راست خـوانـده می‌شود)، مولکولهای DNA نیز چنین هسـتند. ظاهراً قبل از ایـنکه (کـروموزومهای) سـلولها ادغام تصادفی انجام دهند، نوعی مکانیسم در هسته سلول تقریباً همه مولکولهای DNA را در یک جهت به هم دوخته و اتصال می‌دهد.

پژوهشگران در ادامه کار نشان دادنـد کـه سـلولها بـرای ایـجاد ایـن گـونه پـیوستگی از فرآیندی به نام نـوترکیبی هـم شـناخت (یـا هـمساخت) اسـتفاده مـی‌کنند. نـوترکیبی هـم شـناخت تـنها در روی مـولکولهای DNA کـه ردیـف نـوکلئوتیدی یکسـان دارنـد، انـجام می‌گیرد. این مولکولها پهلو به پهلوی یکـدیگر قرار می‌گیرند. سپس هر دو مولکول بریده شده و در انـتهاهای بـریده شـده بـه هـم مـتصل می‌گردند. این اتصال با چـنان دقـتی صـورت مـی‌گیرد کـه ردیـف نـوکلئوتیدی در نـقاط پیوستگی تغییر نمی‌کند.

مشاهده غیرمنتظره بالا مؤید این مطلب بود که تمام سلولهای موش و احتمالاً همه سلولهای پسـتانداران، دسـتگاه و تشکـیلات انـجام نـوترکیبی هـم شـناخت را داشـتند. در هـمان زمـان، دلیـلی بـرای مـظنون شـدن بـه ایـنکه سلولهای پیکری (سلولهایی کـه در تـولیدمثل جنسی دخالت نـدارنـد) نـیز ایـن تشکـیلات را داشته باشند، وجود نداشت. بعلاوه، نشان داده شده بود که این تشکیلات نسبتاً کارآمـد است زیرا پژوهشگران می‌توانستند با استفاده از فن تزریق میکرو بـیش از ۱۰۰ مـولکول DNA بـا ردیـف یکسـان را بـه کـروموزومهای سـلول تزریق کنند. سلول همه آنها را در یک جهت به هم متصل می‌کرد. با این مشـاهدات نـویسنده مقاله بلافاصله متوجه این نکـته شـد کـه اگـر امکان مهار این تشکیلات بـود، بـه نـحوی کـه بتوان بین مولکول DNAای که مورد نظر بوده و قصد ادغام آن در کروموزوم سلول هست بـا ردیف DNA همانند آن در کروموزوم سـلول، نـوترکیبی هـم شـناخت بـرقرار کـرد، در آن صـورت پـژوهشگران را بـه دوبـاره نـویسی دستورالعمل براساس تمایل واراده آنها، قـادر

می‌ساخت.

در حالی که پژوهشگران از طرح چنین احتمالی هیجان زده شده بودند، در ۱۹۸۰ نویسنده مقاله - با ارائه طرحی پژوهشی - از دولت متبوع خود درخواست اعتبار کرد تا امکان تحقق نشانه‌گیری ژنی را آزمایش کند. متأسفانه، دانشمندانی که پروژه پژوهشی پیشنهادی او را ارزیابی کردند، آنرا نپذیرفتند، زیرا در نظر آنها احتمال اینکه یک ردیف DNA تازه وارد بتواند ردیف مشابه خود را در درون ۱۰۰۰ جلد از دستورکار ژنتیکی پیدا کند، فوق‌العاده ناچیز بود.

علیرغم عدم پذیرش طرح مورد اشاره، مؤلف مقاله حاضر تصمیم گرفت با استفاده از اعتباراتی که از طرح پژوهشی دیگری دریافت می‌کرد، به کار در این زمینه ادامه دهد. این تصمیم البته نوعی ریسک و قمار به حساب می‌آمد زیرا اگر تجارب شکست می‌خوردند، در هنگام تمدید اعتبار این پروژه، اطلاعات معنی‌دار بسیار کمی برای ارائه کردن در دست می‌بود. اما خوشبختانه، آزمایشها موفقیت‌آمیز بودند. در سال ۱۹۸۴، وقتی که پژوهشگران مورد بحث برای ادامه دادن پژوهش درخواست اعتبار کردند، مدارک و شواهد کافی برای اثبات اینکه نشانه‌گیری ژنی در سلولها واقعاً امکانپذیر است، در دست داشتند. شایان ذکر است که تعداد زیادی از همان دانشمندانی که طرح پژوهشی اولیه را ارزیابی کرده - و به باد انتقاد گرفته - بودند، این بار علاقه نشان دادند. نقد طرح جدید با این جمله شروع می‌شد، «از اینکه به نصایح و توصیه‌های ما عمل نکردید، خرسندیم».

در سلولها نشانه‌گیری ژنی چگونه انجام می‌شود؟ اولین مرحله، کلون کردن ژن مورد نظر و تکثیر آن در باکتری است. این روش منبع خالصی از DNA واجد ژن مورد نظر را فراهم می‌کند. سپس، در یک لوله آزمایش و براساس هدف آزمایش، ردیف نوکلئوتیدی ژن تغییر داده می‌شود. ژن تغییر یافته، ناقل نشانه‌گیری نامیده می‌شود.

ناقل نشانه‌گیری، توسط راههای متفاوت به داخل سلولهای زنده وارد می‌شود. این ناقل در درون هسته سلول، با پروتئینهای تشکیل دهنده تشکیلات سلولی برای نوترکیبی هم شناخت، یک کمپلکس تشکیل می‌دهد. به کمک این پروتئینها، ناقل نشانه‌گیری به منظور یافتن همتا (هدف) خود، تمام ردیفهای ژنوم را جستجو می‌کند. چنانچه ناقل نشانه‌گیری واقعاً موفق شود که همتای خود را بیابد، کنار آن ژن قرار گرفته و جایگزین آن می‌شود.

متأسفانه، این جایگزینی هدف‌گیری شده تنها در بخش کوچکی از سلولهای تیمار شده رخ می‌دهد. زیرا ناقل نشانه گیری اغلب مواقع به طور تصادفی در جایگاههای نامربوط وارد شده و یا هرگز ادغام نمی‌شود. بنابراین، بررسی سلولها به منظور شناسایی سلولهایی که هدف‌گیری در آنها موفقیت‌آمیز بوده است، امری ضروری است. به طور تقریب از هریک میلیون سلول تیمار شده، تنها یک سلول واجد ژن جایگزینی هدف‌گیری شده مورد نظر

می‌باشد.

برای تسهیل هرچه بیشتر جستجو برای چنین سلولی، پژوهشگران از دو «نشانگر قابل انتخاب» که از ابتدا به داخل ناقل هدف‌گیری وارد شده است، استفاده می‌کنند. گنجانیدن یک نشانگر قابل انتخاب «مثبت» باعث تحریک بقا و رشد سلولهایی می‌شود که ناقل هدف‌گیری در آنها، یا در جایگاه هدف، یا در محلهای تصادفی در درون ژنوم، وارد شده است. گنجانیدن نشانگر قابل انتخاب «منفی» به از بین بردن و حذف اکثر سلولهاییکه ناقل هدف‌گیری در آنها در یک محل تصادفی ادغام شده است، کمک می‌کند.

محل نشانگر مثبت که معمولاً ژن مقاومت به نئومایسین (Neo^r) است، به نحوی تعیین می‌شود که توسط DNAای که در ژن هدف نیز وجود دارد، در میان قرار می‌گیرد. نشانگر منفی، که به طور معمول ژن تیمیدین کیناز (tk) مربوط به یک ویروس تبخال است، به انتهای ناقل نشانه‌گیری متصل می‌شود. هنگام رخداد نوترکیبی هم شناخت، قطعات تغییر نیافته ژن کلون شده، همراه با ژن Neo^r ساندویچ شده بین آنها، جایگزین ردیف هدف در کروموزوم می‌شود. اما ژن tk که در بیرون منطقه ردیفهای همتا قرار دارد، وارد کروموزوم نشده و توسط سلول تخریب می‌گردد. برعکس، وقتی سلولها به صورت تصادفی ناقل هدف گیری را در خود وارد نمایند. کل ناقل را به همراه ژن tk به DNA دوخته و متصل می‌کنند. در شرایطی که هیچ ادغامی صورت نگیرد، ناقل و هردو نشانگر آن ناپدید می‌شوند.

برای تشخیص و شناسایی دو نتیجه متفاوت تشریح شده در بالا، آزمایش مستقیم DNA لازم نیست. در عوض، می‌توان سلولها را در یک محیط حاوی دو دارو، یکی مشابه نئومایسین بنام G418 و دیگری داروی ضدتب خال، گانسیکلویر ، رشد داد. G418 سلولهایی را که در کروموزوم خود فاقد ژن محافظ Neo^r هستند یعنی سلولهایی که در ادغام ناقل DNA شکست خورده‌اند، می‌کُشد. اما به سلولهایی که یا به صورت تصادفی یا در محل هدف خود، ژن مورد نظر را دریافت کرده باشند، اجازه بقا و رشد می‌دهد. در عین حال، گانسیکلویر، هر سلولی را که حاوی ژن tk می‌باشد و به طور عمده آنهایی را که حاوی ادغام تصادفی هستند، می‌کشد. در پایان، در واقع تنها سلولهایی باقی می‌مانند که ادغام هدف گیری شده را دارا باشند (سلولهای حاوی ژن Neo^r «قابل انتخاب مثبت»و فاقد ژن tk «قابل انتخاب منفی»).

تا سال ۱۹۸۴، نویسنده مقاله و همکارانش نشان داده بودند که در سلولهای کشته شده موش، مورد هدف قرار دادن ژنهای ویژه امکانپذیر است. بدنبال آن به منظور تغییر ژنوم موش زنده، تکنولوژی خود را گسترده‌تر کردند. بدنبال آن به منظور تغییر ژنوم موش زنده، تکنولوژی خود را گسترده‌تر کردند. برای نیل به این هدف، آنان از سلولهای مخصوصی که در سال ۱۹۸۱ توسط ماتیوکافمن و

مارتین ایوانز از دانشگاه کمبریج تولید شده بودند، استفاده کردند. این سلولها، سلولهای بنیادی (پایه‌ای) مغز استخوان مشتق از جنین (یا به اختصار ES) هستند که از یک جنین نارس موش بدست می‌آیند و می‌توانند در ظروف کشت به طور نامحدودی کشت شوند. بعلاوه، این سلولها، چندتوانی می‌باشند، یعنی قادر هستند همه نوع سلولی را ایجاد نمایند.

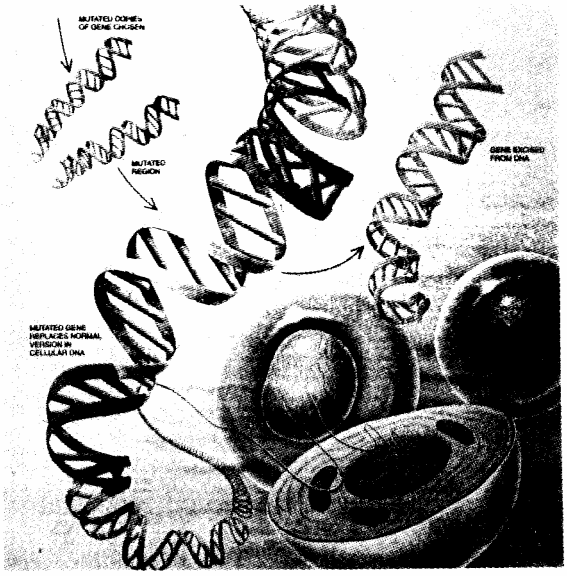
به طور خلاصه، با استفاده از روشی که قبلاً شرح داده شد، این پژوهشگران سلولهای ESای تولید کردند که در یک نسخه از ژنی انتخاب شده، حامل یک جهش هدفدار شده بودند. سپس، سلولهای ES را در جنین‌های نارس موش قرار داده و اجازه دادند تا جنین به رشد کامل برسد. برخی از موشهای حاصله، هنگام بلوغ، اسپرمی تولید کردند که از سلولهای ES مشتق شده‌اند. با جفت‌گیری این موشها با موشهای طبیعی، این پژوهشگران موشهایی ایجاد کردند که از نظر جهش ناخالص هستند، بدین معنی که در یکی از دو نسخه ژن موجود در هر سلول، واجد جهش هستند.

اکثریت موشهای ناخالص، سالم هستند زیرا دومین نسخه از ژن آنها که صدمه ندیده است بدرستی عمل می‌کند. اما، آمیزش این موشهای ناخالص با برادرها یا خواهرهایی که همان نوع جهش را دارند، موشهای خالص تولید می‌کند: حیواناتی که جهش مورد نظر را در هر دو نسخه از ژن خود حمل می‌کنند. این نوع حیوانات ناهنجاریهایی نشان می‌دهند که اعمال طبیعی ژن هدف را در تمام بافتها نشان می‌دهد.

البته خلاصه نمودن (نظری) روش بمراتب آسانتر از عمل به آن می‌باشد. در عمل، پروهشگران با تزریق سلولهای ES تغییر یافته خود به جنین مرحله بلاستوسیست که هنوز به رحم مادر متصل نشده است، کار را شروع می‌کنند. از آنجائیکه برای نشان دادن اینکه مراحل عملیات برابر برنامه پیش می‌رود یا خیر، به فنوتیپ رنگ پوست وابسته هستند، بنابراین، بلاستوسیستهایی انتخاب می‌کنند که طبیعتاً به بچه موشهایی تبدیل خواهند شد که رنگ پوست آنها با رنگ پوست بچه موشهای تولید شده از گونهٔ موشی که سلولهای ES از آنها گرفته شده است فرق داشته باشد.

سلولهای بنیادی مغز استخوان از یک موش قهوه‌ای حامل دو نسخه از ژن آگوتی گرفته شده‌اند. این ژن حتی وقتی که تنها یک نسخه از آن حضور دارد باعث ایجاد رنگ قهوه‌ای می‌شود زیرا در پیاز مو موجب قرار گرفتن رنگدانه‌های زرد در نزدیک رنگدانه‌های سیاه می‌شود (تولید خود رنگدانه‌ها تحت کنترل ژنهای دیگر می‌باشد). از این رو پژوهشگران معمولاً بلاستوسیستهایی انتخاب می‌کنند که به طور طبیعی به موش سیاه تبدیل می‌شوند. رنگ پوست در موش وقتی سیاه می‌شود که ژن آگوتیِ به ارث برده شده متعلق به هر دو والد، معیوب بوده باشد. سپس آنان اجازه می‌دهند که جنینهای حاوی سلولهای ES تغییر یافته، در

جهش نشانه گیری شده می‌تواند در یک ژن سلولی انتخاب شده، از راه وارد ساختن نسخه‌های جهش یافته ژن (نوارهای سبز و طلایی در طرف چپ) به داخل سلولها و جانشین کردن یک نسخه به جای نسخه ژن اولیه سالم (قطعه طلایی در طرف راست) در روی کروموزوم، تولید شود. چنین سلولهایی تغییر داده شده، پژوهشگران را در ایجاد موشهای حامل جهشهای ژنتیکی ویژه کمک می‌کنند. مشاهده یک دم مارپیچی همراه با اختلال تعادل و شنوایی در یکی از موشهای تغییر یافته (شکل روبرو) منجر به این کشف شد که ژن معیوب، یعنی int-2، در تکوین دم و گوش میانی موش دخالت دارد.



یک مادر نایب یا جانشین به جنین کامل تبدیل گردند.

اگر همه چیز درست پیش برود، در طول این زمان، سلولهای ES تغییر یافته پیاپی تولید مثل کرده و نسخه‌های کاملی از همه ژنها را به سلولهای دختر خود منتقل می‌کنند. این سلولها با سلولهای جنین آمیخته شده و در تشکیل اکثر بافتهای موش سهمی را به خود اختصاص می‌دهند. در نتیجه، موشهای تازه متولد شده کای‌مرا[۴۶] یا دورگه می‌باشند. (توضیح مترجمین: کای‌مرا موجودی دارای مولکول DNAی نوترکیب است که از قطعات DNA بیش از یک ارگانیسم تشکیل شده است. این نامگذاری مبتنی بر نام جانوری اسطوره‌ای است): این موشها از سلولهایی منشاء می‌گیرند که هم از سلولهای ES بیگانه و هم از جنین اولیه تشکیل شده‌اند و دارای DNA متعلق به هر دو نوعِ سلولی هستند. با مشاهده باریکه‌ها یا

نوارهای پهن قهوه‌ای در پوست سیاه این موشها، شناسایی موشهای دورگه به آسانی امکانپذیر است. موشهایی که در آنها هیچ سلول مشتق شده از ES وجود نداشته باشد، بدلیل نداشتن ژنهای آگوتی فعالِ، پوست کاملاً سیاه خواهند داشت.

طبیعتاً، با مشاهده ظاهر موشها نمی‌توان به ایجاد سلولهای جنسی توسط سلولهای ES پی برد و می‌دانیم که سلولهای جنسی وسیله انتقال جهش مورد هدف به نسلهای آینده هستند. فهم این مطلب مستلزم تولید موشهای ناخالص است که دارای یک نسخه از جهش در همه سلولهای خود می‌باشند. برای تولید چنین حیواناتی، بین موش نر دورگه و ماده سیاه پوست که فاقد ژن آگوتی است، آمیزش صورت می‌گیرد. در نتیجه‌چنانچه اسپرمی که تخمک را بارور کرده است از سلولهای ES مشتق شده باشد، بدلیل آنکه همه اینگونه اسپرمها واجد ژن آگوتی هستند، رنگ پوست نوزاد حاصله قهوه‌ای خواهد بود و چنانچه اسپرم بارور کنندهٔ تخمک از سلولهای بلاستوسیست اولیه مشتق شده باشد، چون این سلولها فاقد ژنهای آگوتی فعال هستند، طبیعتاً رنگ پوست نوزاد حاصله سیاه خواهد بود.

بنابراین، مشاهده نوزادان موش قهوه‌ای رنگ بیانگر آن است که ژنهای حمل شده توسط سلولهای ES - از طریق اسپرم - راه خود را برای انتقال به نسلهای بعدی پیدا کرده‌اند. سپس، به منظور تولید موشهای واجد دو نسخهٔ جهش یافته (معیوب) از ژن هدف، می‌توان بین خواهرها و برادرهای ناخالص آمیزش برقرار کرد. اما قبل از این اقدام باید تشخیص داد که کدام یک از نوزادان قهوه‌ای رنگ، نسخه‌ای از ژن جهش یافته را حمل می‌کند. با آزمون مستقیم DNA، می‌توان جهش مورد هدف را در آن شناسایی کرد: ۱/۴ فرزندان حاصل از آمیزش بین خواهرها و برادرهای ناخالص، دو نسخه معیوب از ژن مورد مطالعه را خواهند داشت. شناسایی افراد خالص بدست آمده، دوباره با آزمون مستقیم DNA آنها صورت می‌گیرد و به طور منطقی این افراد بایستی دو نسخه از جهش مورد هدف را دارا باشند. پس از آن، برای شناسایی هر نوع ناهنجاری آناتومیکی، فیزیولوژیکی و رفتاری در این موشها، بررسیهای دقیق صورت می‌گیرد. روشن است که هریافته‌ای در این زمینه‌ها می‌تواند شواهد و مدارکی در مورد ژن گسیخته شده ارائه دهد. لازم به ذکر است که مجموع عملیات مربوط به کلون سازی ژن تا موش حاملِ جهش مورد هدف، حدود یک سال طول می‌کشد. روش نشانه‌گیری ژنی در موش، امروزه در آزمایشگاههای سراسر جهان برای مطالعه انواع مختلف مسائل زیست شناختی استفاده می‌شود. از سال ۱۹۸۹، بیش از ۲۵۰ نمونه موش حامل نواقص انتخاب شده ژنتیکی، تولید شده‌اند. نمونه‌هایی از یافته‌های در حال ظهور، بصیرتهایی را که این حیوانات می‌توانند ارائه دهند، نشان می‌دهد.