

ТЕОРЕТИЧНА МЕДИЦИНА

“Журнал НАМН України”, 2014, т. 20, № 1. — С. 11-24.

УДК 578.1.001.53:57.08

Н. А. Утко, И. Ф. Лабунец, Г. М. Бутенко

Государственное учреждение “Институт генетической и регенеративной медицины НАМН Украины”, 04114 Киев

ТРАНСГЕННЫЕ МЫШИ В МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ (обзор литературы)

Проанализованы основные методы получения трансгенных животных и их применение в биомедицинских исследованиях. Показано, что наиболее предпочтительной системой создания трансгенных животных может быть тетрациклиновая система, обладающая наиболее широкими возможностями для индуцируемой регуляции экспрессии трансгена. Однако благодаря относительной дешевизне и скорости получения трансгенных животных методом прямой инъекции ДНК в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки до сих пор считается наиболее популярным способом. Чаще всего трансгенные мыши применяются для исследований ткане-специфичной экспрессии и генной регуляции, специфичной на определенных стадиях развития, а также для экспериментов по фенотипическим проявлениям трансгенной экспрессии (например, для получения моделей различных заболеваний, обусловленных измененной генной экспрессией). Обсуждены перспективы развития трансгенных технологий. Новые достижения в области трансгенеза безусловно окажут позитивное влияние на лечение болезней человека с применением генной терапии и стволовых клеток. Вместе с тем, используемые экспериментальные модели должны быть максимально адекватными. Кроме того, существуют определенные ограничения при интерпретации данных, полученных в опытах с использованием трансгенных животных, поскольку остаются недостаточно изученными особенности геномного гомеостаза и механизмы его регуляции.

Ключевые слова: трансген, трансгенные животные, обусловленный трансгенез, *Cre*, *tet-on*, *tet-off*, трансгенные модели заболеваний человека.

Технология создания трансгенных животных является одной из наиболее бурно развивающихся биотехнологий в последние 20 лет. На генномодифицированных лабораторных животных проводятся обширные исследования по изучению регуляции, экспрессии и фенотипическому проявлению генов. Различные биомедицинские исследования направлены на моделирование заболеваний человека для изучения их патогенеза и поиска новых терапевтических средств. Трансгенные модели также удобны для обнаружения и изучения влияния канцерогенных и химических агентов.

Трансгенным называют животное, которое было получено в результате генетической модификации, выполненной при помощи генетической вставки (инсерции), удаления (делеции) либо замещения гена. При этом полученные генетические изменения устойчиво передаются потомкам. Сегмент введенной в геном рекомбинантной двухцепочечной ДНК называется “трансгеном”. Трансгенез, т. е. процесс переноса трансгенов, можно подразделить на 2 категории: происходящий при случайном встраивании в геном (обычно посредством микроинъекции ДНК или вирусной транс-

Г. М. Бутенко — директор института, академик НАМН Украины

Лаборатория экспериментального моделирования

И. Ф. Лабунец — зав. лаб., д.м.н.

Н. А. Утко — вед. н.с., к.б.н. (natautko@yahoo.com)

© Н. А. Утко, И. Ф. Лабунец, Г. М. Бутенко, 2014.

фекции) и получаемый при направленной гомологичной (общей) рекомбинации в определенные локусы с использованием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) [1, 6, 9, 59, 71].

Способы получения трансгенных животных

Метод микроинъекции ДНК в пронуклеус зиготы. Микроманипуляционную систему в своих экспериментах впервые использовал *T. P. Lin* в 1966 г. [50]. Он показал, что мышинные зиготы могут выживать после введения иглы в пронуклеус. Кроме того, было продемонстрировано, что возможно получение жизнеспособного потомства после подсадки псевдобеременным самкам зигот, в которые предварительно вводили с помощью микроинъекции бычий сывороточный альбумин [50]. Пионерские работы *T. P. Lin* опередили время, поскольку тогда еще не существовало технологии рекомбинантных ДНК.

В 1980 г. *J. Gordon* и *F. Ruddle* [30] опубликовали первые данные о получении трансгенных мышей с помощью инъекции ДНК в пронуклеус. Годом позже появились публикации об интеграции, переносе в зародышевую линию и экспрессии введенных генов у трансгенных мышей [9, 59, 71].

Выявлено что, после микроинъекции введенная ДНК случайным образом встраивается в единственный локус хромосомы в виде tandemных повторов. Сайты интеграции трансгена, возможно, являются следствием двухцепочечных разрывов ДНК, происходящих в S-фазе клеточного цикла. Данный вид продукции трансгенных животных обычно используется для гиперэкспрессии эндогенных генов, в исследованиях с приобретением новой функции либо для введения гена, кодирующего маркерные белки (β -галактозидазы, флуоресцирующие белки) [2-4, 6, 9, 59, 71]. Несмотря на то что сейчас эта техника прочно укоренилась и широко применяется во многих лабораториях мира, она имеет ряд ограничений, связанных в основном с неконтролируемым встраиванием чужеродной ДНК в случайные локусы, что часто приводит к нарушению экспрессии собственных генов.

Введение трансгена в ЭСК. Целенаправленная модификация генов (в частности, нокаут либо их повреждение) с целью исследования их функций стала возможной после разработки *M. Caprecchi*, *M. Evans* и *O. Smithies* метода с применением гомологичной рекомбинации [21]. Фрагмент ДНК, содержащий трансген, вводят путем трансфекции в линию плюрипотентных стволовых клеток, выделенных из эмбриона на ранней стадии развития. Клеткам дают возможность размножаться. С помощью Саузерн-блоттинга определяют колонии

клеток, в которых гомологическая рекомбинация привела к замене гена. Эти клетки вводят в мышинный эмбрион, который затем имплантируют псевдобеременным самкам. Мышей, у которых произошла замена гена в клетках зародышевой линии, скрещивают и получают гетерозиготы. При скрещивании гетерозигот получают гомозиготы [1, 3, 6, 9, 29, 59, 71].

Данный метод получил наиболее широкое распространение, поскольку обладает рядом преимуществ по сравнению с микроинъекцией ДНК. Стало возможно прицельно вводить трансген в определенные локусы хромосом (*knock-in*-метод), контролировать интеграцию трансгена в геном с помощью селекции трансформированных клеток, нарушать экспрессию либо вызывать полное удаление интересующих генов (нокаут).

Регулируемое включение и выключение трансгена (conditional transgenesis). Изменение генной экспрессии либо полное удаление генов во всех клетках организма часто является недопустимым в ряде исследований, особенно если затрагиваются гены, экспрессия которых необходима на ранних этапах эмбрионального развития. Например, делеция гена *sonic hedgehog* приводит к ранней эмбриональной гибели, связанной с нарушениями развития головного и спинного мозга, что делает невозможным исследование функции гена в тканях, которые еще не сформированы [19]. Некоторые мутантные животные выживают в эмбриональном периоде, но погибают вскоре после рождения [20, 24].

Таким образом, возникла необходимость разработки систем, которые бы позволяли контролировать экспрессию трансгена в пространстве и времени, регулировать включение и выключение генов *in vivo*. "Обусловленный трансгенез" (*conditional transgenesis*) часто основывается на применении бинарной системы: гена-эффектора (элиминатора), и респондера (гена, экспрессию которого нужно модифицировать). Эффектор действует на респондер, вызывая либо его активацию, либо выключение. Разработанные системы эффектор/респондер включают в себя ряд рекомбиназ, которые узнают специфические последовательности и катализируют реципрокную рекомбинацию между ними. Суть ее такова. Создают две линии трансгенных мышей. В геном мыши первой линии вводят генетическую конструкцию гена рекомбиназы с ткане-специфическим промотором, а в геном другой — специфические последовательности, которые ограничивают (фланкируют) участок ДНК, подлежащий удалению. При скрещивании этих трансгенных мышей получают в потомстве двойных мутантов, у которых экспрессия рекомбиназы

приводит к вырезанию участка ДНК между специфическими последовательностями.

Наиболее популярной является система с использованием рекомбиназы *Cre*, узнающей последовательности *LoxP*, разработанная *M. Lako* в 1992 г. [6, 51, 69]. *LoxP*-последовательность состоит из двух инвертированных повторов длиной 13 пар нуклеотидов (п. н.), разделенных спейсерным участком длиной 8 п. н. У двойных мутантов делеция гена происходит только в тех клетках или тканях, где экспрессируется рекомбиназа (рис. 1).

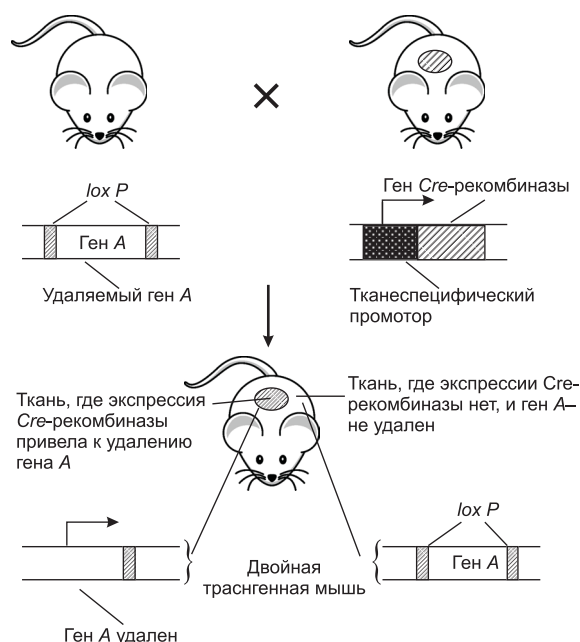


Рис. 1. Применение рекомбиназы *Cre* для направленной делеции гена в определенных клетках/тканях организма.

Сначала создают две линии трансгенных мышей. В геном первой линии вводят последовательности *LoxP*, фланкирующие ген, который подлежит удалению (ген *A*). Другая линия трансгенных мышей содержит ген рекомбиназы *Cre*, экспрессия которого находится под контролем тканеспецифического промотора. При скрещивании этих трансгенных мышей получают двойных мутантов, у которых экспрессия рекомбиназы *Cre*, узнающей специфические последовательности *LoxP*, приводит к удалению гена *A* только в тех тканях, где экспрессируется рекомбиназа.

Известны многие ткане- и клеточно-специфичные промоторы, использование которых позволяет выключать гены в определенных клетках. Например, используя α P2-промотор можно удалить ген только в адипоцитах, α MHC-промотор — для делеции в кардиомиоцитах, *ALB* — в гепатоцитах, *nestin* — в нейронах, *K5* — в эпителиальных

клетках и коже, *CD19* — в *B*-лимфоцитах, *Cola* — в остеобластах [16, 73].

Одним из примеров применения специфического промотора было исследование функции гена *SOX2*, который является фактором транскрипции, необходим для роста остеобластов, при эмбриональном развитии, а также для сохранения плюрипотентности в ЭСК. Его делеция во всех клетках организма приводила к гибели зиготы на стадии имплантации [10], а делеция только в остеобластах (при экспрессии *Cre*-рекомбиназы под контролем коллагенового промотора) — к уменьшению размеров тела и нарушению остеогенеза [11].

Для дополнительной регуляции включения-выключения генов применяют индуцируемые эффекторы, которые активизируются при введении индуктора. Таким образом достигается временной контроль регуляции экспрессии трансгена. Группа исследователей под руководством *P. Chambon* модернизировала систему *Cre-Lox*, объединив ген рекомбиназы *Cre* с ДНК, кодирующей модифицированный лигандсвязывающий домен эстрогенового рецептора (*Cre-ERT*), который может связываться только с тамоксифеном (но не эстрогеном). Тамоксифен (лекарственное вещество) является антагонистом эстрогена и применяется при лечении рака молочной железы. Химерный белок *Cre-ERT* приобретает рекомбиназную активность только при соединении с тамоксифеном [6, 39, 42, 69, 71].

Еще одной популярной системой индуцированной экспрессии являются *tet-on*- и *tet-off*-системы, которые модулируются введением тетрациклина или доксициклина (более стабильного аналога тетрациклина). Этот надежный инструмент для регулирования трансгенной экспрессии был разработан *H. Bujard* и *M. Gossen* [14]. Они использовали регуляторные элементы, контролирующей экспрессию гена устойчивости *E. coli* к антибиотик тетрациклину, подавление транскрипции которого происходит при связывании тетрациклинового репрессора (*tetR*) с последовательностью в промоторе гена — тетрациклиновым оператором (*tetO*). Тетрациклин блокирует связывание *tetR* с *tetO*, что приводит к инициации транскрипции данного гена. Для того чтобы их сделать пригодными для регуляции трансгенной экспрессии, были произведены две модификации (рис. 2). В-первых, *tetR* был превращен в транскрипционный активатор посредством его соединения с доменом активации транскрипции вируса простого герпеса VP16. Гибридную молекулу назвали тетрациклиновым транскрипционным активатором (*tTA*). Второй модификацией является использование минимального промотора цитомегаловируса, соединенного с *tetO*-последовательностью для конт-

роля транскрипции. Этот промотор транскрипционно неактивен при наличии *tTA* и доксициклина. Доксициклин инактивирует *tTA* и вызывает подавление экспрессии трансгена (*tet-off*-система). А в *tet-on*-системе мутантная версия *tTA* — обратный (*reverse*) *rtTA* — связывается с *tetO* только при наличии доксициклина и активирует транскрипцию гена-мишени [6, 59, 69, 85].

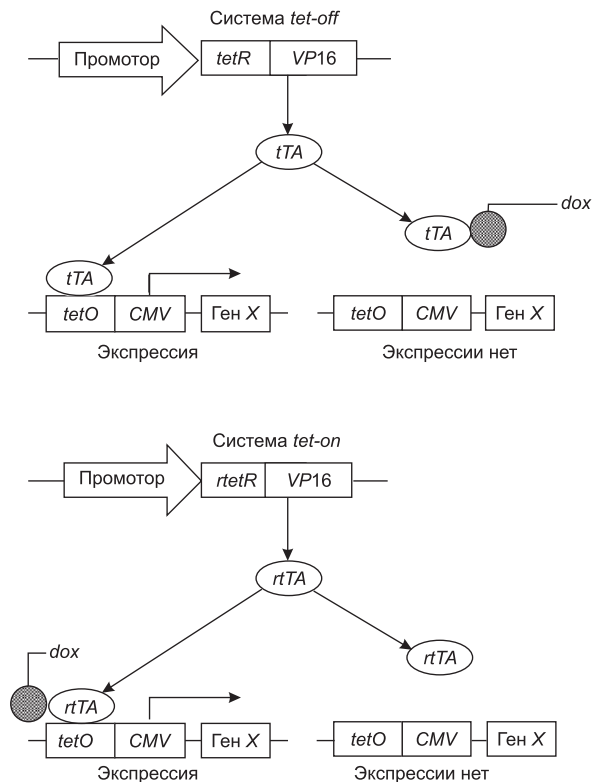


Рис. 2. Механизм действия систем *tet-on* и *tet-off*, применяемых при индуцируемом трансгенезе.

Система *tet-off*: при отсутствии доксициклина *tTA* взаимодействует с операторной областью *tetO* и активирует транскрипцию целевого гена *X* с промотора *CMV*; доксициклин блокирует связывание *tTA* с *tetO* и активации транскрипции гена *X* не происходит.

Система *tet-on*. *rtTA* связывается с *tetO* и активирует экспрессию гена *X* только при наличии доксициклина.

Условные обозначения: *tetR* — тетрациклиновый репрессор, *rtetR* — обратный (*reverse*) тетрациклиновый репрессор, *tTA* — тетрациклиновый транскрипционный активатор, *rtTA* — обратный (*reverse*) тетрациклиновый транскрипционный активатор, *dox* — доксициклин, *tetO* — тетрациклиновый оператор, *CMV* — минимальный промотор цитомегаловируса, *VP16* — домен активации транскрипции вируса простого герпеса.

Главным преимуществом *tet-on*-системы является то, что генетическая индукция происходит

быстро, поскольку для активации транскрипции необходим низкий уровень доксициклина. Напротив, кинетика генетической индукции с помощью *tTA* несколько медленнее, поскольку изменения клиренса доксициклина могут занять несколько дней. Однако ограничением *tet-on* системы является то, что *rtTA* сохраняет аффинность к *tetO* даже в отсутствие доксициклина. Это приводит к фоновой экспрессии, которая может быть неприемлемой в исследованиях [69].

Таким образом, анализ рассмотренных выше основных способов получения трансгенных мышей позволяет сделать вывод о том, что наибольшими возможностями обладают *tet-on*- и *tet-off*-системы, позволяющие контролировать экспрессию трансгена в определенных тканях и клетках организма, а также дают возможность включать и выключать экспрессию трансгена при введении или выведении индуктора (табл. 1). Вместе с тем, изначально разработанные системы для введения трансгена в зиготу при микроинъекции, остаются популярными из-за сравнительной простоты и дешевизны моделирования.

Применение трансгенных животных в биологии и медицине

Широкое применение трансгенных мышей в биомедицинских исследованиях началось в 80-х годах прошлого столетия. Наиболее часто генномодифицированные мыши применяются для исследований функций генов и особенностей регуляции их экспрессии в различных клетках и тканях организма, на разных стадиях развития экспериментальных животных. Они также используются при изучении этиологии и патогенеза заболеваний, поиска и тестирования новых терапевтических приемов [1, 5, 16, 28, 71].

Одной из областей применения трансгенных организмов является регенеративная медицина. Экспрессия маркерных белков позволяет легко идентифицировать донорские стволовые клетки в организме реципиента [7, 80, 81].

Примеры применения трансгенных мышей в биомедицинских исследованиях представлены в табл. 2. Ниже изложены некоторые известные модели заболеваний, полученные на трансгенных животных.

Онкология. Одной из наиболее популярных областей медицины и биологии, где используются модели на трансгенных мышях, является онкология, так как множество злокачественных новообразований легко моделируется введением соответствующих онкогенов [22]. Первые трансгенные мыши с новообразованиями были созданы несколькими независимыми группами в начале 80-х

Таблица 1

Характеристика методов получения трансгенных мышей

Тип трансгенеза	Управление экспрессией трансгена	Типы трансгенных систем	Достоинства	Недостатки	Источник
Введение ДНК в пронуклеус зиготы	Неуправляемая экспрессия	Гиперэкспрессия трансгена	Дешевизна, относительно простой, быстрый метод, возможность контролировать количество введенной ДНК, точность доставки	Спонтанное неконтролируемое встраивание трансгена, ограниченные возможности модификации генома реципиента, низкий уровень трансформации	[4, 9, 50, 59, 66]
Введение трансгена в эмбриональные стволовые клетки (ЭСК)	Неуправляемая экспрессия	<i>Targeted knock-down, knock-out, knock-in</i> (прицельное повреждение, удаление гена, генетическая вставка)	Возможность направленного изменения генной экспрессии с помощью генетической рекомбинации, различные способы введения трансгена в ЭСК	Дорогостоящий и длительный метод, необратимое включение/выключение гена во всех тканях организма	[19, 29]
		Система <i>Cre-ERT -LOX</i> с тканеспецифичным промотором	Позволяет регулировать выключение гена в определенных тканях и контролировать момент его выключения	Необратимое выключение гена	[11, 39, 51]
		Системы <i>tet-on</i> и <i>tet-off</i> с тканеспецифичным промотором	Позволяет регулировать включение и выключение гена в определенных тканях и дает возможность временного контроля экспрессии трансгена	Побочный эффект индуктора (тетрациклина или доксициклина), скорость регулирования экспрессии трансгена лимитируется введением или выведением индуктора	[6, 14, 35, 69, 85]
		<i>Tet-on</i>	Быстрая активация трансгена при низкой концентрации индуктора	Для экспрессии трансгена необходимо постоянное введение антибиотика	
	<i>Tet-off</i>	При кратковременной экспрессии трансгена не требуется введение индуктора	Замедленная индукция транскрипции, поскольку клиренс доксициклина (тетрациклина) может занять несколько суток		

годов [33]. Так, *R. L. Brinster* [13] и *R. D. Palmiter* [62] с помощью введения участка ДНК SV-40 (*simian virus 40* — вакуолизирующий обезьяний вирус) создали трансгенную мышь с опухолью мозга [13]. Так, впервые было показано, что для развития опухоли достаточно введение ДНК из ранней области вируса SV-40 — энхансерной/промоторной области и участка, кодирующего большой T-антиген. Немного позднее *D. Hanahan* из *Cold Spring Harbor Laboratories* смоделировал рак поджелудочной железы путем введения трансгена из SV40, соединенного с геном инсулина крысы с целью экспрессии ранней области SV40 в инсулин-

продуцирующих β -клетках [32]. *T. A. Stewart* и соавт. создали трансгенную модель рака молочной железы введением *MMTV (mouse mammary tumor virus)* — вируса рака молочной железы млекопитающих [75]. *E. Wagner* введением онкогена *Fos* создал модель опухоли костной ткани [67]. Модель рака кожи была получена с помощью *Bovine papilloma virus* [46].

Недавно была предложена новая модель трансгенной мыши немелкоклеточного рака легких с гиперэкспрессией циклина *E* в альвеолярных клетках [25]. Дисплазия, гиперплазия и аденокарцинома, развивающиеся в данной модели, воспроизводили ос-

Таблица 2

Примеры применения трансгенных мышей в биологии и медицине

Применение трансгенных мышей	Примеры		Источники
Моделирование заболеваний	Нейропатология	Болезнь Альцгеймера	[8, 26, 44, 82]
		Болезнь Гантингтона	[34, 41]
		Боковой амиотрофический склероз	[45]
		Болезнь Паркинсона	[12]
		Синдром Дауна	[52, 83]
		Депрессия	[40, 53]
		Тревожность	[40]
	Онкология	Рак поджелудочной железы	[32, 65]
		Опухоли мозга	[13]
		Рак молочной железы	[75]
		Опухоли кости	[67]
		Рак кожи	[37, 46]
		Немелкоклеточный рак легких	[25]
	Другие заболевания	Глаукома	[87]
		Слепота	[42, 58]
		Глухота	[70]
		Заболевания сердца	[57, 73]
		Остеопороз	[44]
		Гипертензия	[86]
Диабет		[48]	
СПИД	[18]		
Изучение механизмов старения	Замедленное старение	Гиперэкспрессия цитозольной формы фосфоенол-пируваткарбоксикиназы в скелетных мышцах	[29]
	Ускоренное старение	Мутация гена <i>klotho</i>	[17]
Исследование функций генов	Обнаружение новых генов "gene trapping technology"	Идентификация секреторных и мембранных белков	[61, 63, 72]
	<i>Loss-of-function</i> (утрата функции)	Исследование функции гена <i>SOX2</i>	[10, 11]
	<i>Gain-of-function</i> (приобретение функции)	Экспрессия гена гормона роста	[62]
Идентификация клеток и клеточных структур	Флуоресцирующие белки	<i>EGFP, EYFP, EBFP, ECFP, mRFPs</i>	[55, 78]
	Экспрессия гена-репортера <i>lacZ</i>		[36, 56]

новые признаки, наблюдавшиеся у пациентов с немелкоклеточным раком легких. Линии клеток, которые экспрессировали циклин *E* дикого типа или мутантные формы, получали из трансгенных мышей с раком легких. Эти линии клеток трансплантировали сингенным мышам, у которых в течение короткого времени развивался рак, что облегчало быстрое тестирование противоопухолевых препаратов.

Исследователи из центра *Max Delbrück* в Берлине во главе с *T. Blankenstein* [49] в эксперименте модифицировали *T*-клеточные рецепторы, распознающие раковые клетки человека, и создали трансгенную мышь, экспрессирующую эти человеческие *T*-клеточные рецепторы с высокой аффинностью к раковым клеткам человека. Целью эксперимента являлось возможное использование этих рецепторов в иммунотерапии больных раком.

Нейропатология. Технология трансгенных мышей способствовала развитию исследований

функции и дисфункции нервной системы [1, 8, 28]. Полипептидные регуляторные факторы (цитокины) известны более 60 лет. Информация же об их функции *in vivo* была получена с помощью трансгенных мышей намного позже [76]. Цитокины выполняют роль нейротрансмиттеров, нейромодуляторов и нейрогормонов в ЦНС, а исследование их экспрессии в головном мозге необходимо для понимания патогенеза заболеваний нервной системы и разработки подходов к их терапии. Авторы применяли трансгенную стратегию с использованием промотора *GFAP* (*glial fibrillary acidic protein*) для направленной экспрессии *IL-3*, *IL-6*, *IFN-α* или *TNF-α* в астроцитах мышей. Трансгенная экспрессия каждого из указанных цитокинов проявлялась в уникальном спектре нейропатологических и функциональных изменений, тем самым указывая на прямое их участие в патогенезе болезней ЦНС. Например, у мышей, экспрессирующих *GFAP-IL6*,

наблюдалась устойчивая активация генов ответа острой фазы, локальное воспаление и нейродегенерация, тогда как у мышей с гиперэкспрессией *GFAP-IL3* — очаговое накопление макрофагов происходило в белом веществе с демиелинизацией, что может приводить к нарушению двигательных функций [15].

Стресс играет ключевую роль в патогенезе тревоги и депрессии. Модели этих состояний на животных широко используются в экспериментальной неврологии с целью исследования вызываемых стрессом аномалий мозговой деятельности, скрининга депрессантов и антидепрессантов и установления поведенческих фенотипов трансгенных животных [40].

Для исследования патофизиологии депрессии, в частности проверки моноаминовой гипотезы, применяли трансгенных мышей, у которых ингибирование глюкокортикоидных рецепторов вызвало нарушения механизма обратной связи в регуляции гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой оси. Помимо изменений механизмов моноаминовой передачи нервного импульса и нейропластичности у трансгенных мышей также были обнаружены изменения экспрессии многих белков, вовлеченных в эпигенетическую регуляцию, а также “часовых генов” (*clock genes*) в гиппокампе и фронтальном кортексе, которые могут быть центральными в генезе депрессивного поведения [53].

Известны линии трансгенных мышей, моделирующих практически все известные нейродегенеративные заболевания, — такие, как болезнь Альцгеймера [1, 8, 26, 82], боковой амиотрофический склероз [45], болезнь Паркинсона [12], болезнь Хантингтона [34], синдром Дауна [83].

Болезнь Альцгеймера (БА) характеризуется двумя главными признаками: внеклеточными бляшками, в состав которых входит белок из 40-42 остатков β -амилоидного пептида (А β), и внутриклеточным накоплением и агрегацией гиперфосфорилированных τ -белков в виде нейрофибриллярных колец [82]. Были созданы многочисленные (основанные на гиперэкспрессии А β -пептида) линии трансгенных мышей с БА, у которых наблюдалась потеря нейронов. Возраст наступления появления внеклеточных отложений и накопления внутриклеточного А β -пептида у известных трансгенных моделей БА колеблется от 2 до 9 мес, а потеря нейронов наблюдается с 2 до 18 мес (у некоторых с 24-месячного возраста). Исследования, проведенные на трансгенных мышях, экспрессирующих предшественник амилоидного пептида — *APP* (*amyloid precursor protein*), с использованием линий *C57Bl/6J* и *FVB/N* продемонстрировали различия в кинетике отложений А β -пептида и актив-

ности микроглии. Размер бляшек, скорость накопления отложений и общее число А β были выше у мышей линии *C57Bl/6J* по сравнению с *FVB/N*, что может, по крайней мере частично, объясняться более низкой активностью микроглии в отношении амилоидных отложений у мышей линии *C57Bl/6J* [26].

Была также прослежена связь между нарушением памяти и экспрессией А β . Значительный компонент в потере памяти у *APP*-трансгенных мышей, по-видимому, вызывается растворимыми А β -белками. Однако насколько и каким образом деменция вызывается этими отложениями, не ясно. Возможно, дальнейшие исследования на трансгенных мышях, экспрессирующих мутантный *APP*-белок с развитием амилоидных отложений, нейрофибриллярных клубочков и других маркеров БА позволят определить относительный вклад А β -пептидов в развитие деменции [8]. На трансгенных мышях линии *THY-Tau22* была изучена роль ожирения в развитии τ -патологии при БА. Показано, что содержание трансгенных мышей с гиперэкспрессией τ -белка на обогащенной высоким содержанием жира диете, приводящей к раннему и прогрессирующему ожирению, увеличивало дефицит в пространственном обучении, а также выраженность τ -патологии в гиппокампе на более поздних стадиях, что не было связано с инсулиновой резистентностью [47].

Известно что накопление белка α -синуклеина (α -*Syn*) и митохондриальная дисфункция нейронов экстрапирамидной системы играют ключевую роль в патогенезе **болезни Паркинсона**. На трансгенных мышях с гиперэкспрессией человеческого белка α -*Syn* были исследованы молекулярные механизмы болезни Паркинсона, а также апробированы терапевтические приемы лечения этого заболевания. Так, у трансгенных мышей, экспрессирующих α -*Syn*, были обнаружены ДНК делеции в митохондриях, окислительное повреждение ДНК и снижение активности митохондриального аппарата *ТОМ40* (*translocase of the outer mitochondrial membrane* — транслоказа внешней митохондриальной мембраны), изменения уровня экспрессии белков митохондриального комплекса I на фоне общего снижения энергопродукции митохондриями. Лентивирусная гиперэкспрессия *ТОМ40* в головном мозге трансгенных мышей с α -*Syn*-гиперэкспрессией восполняла энергетический дефицит в их ЦНС [12].

Боковой амиотрофический склероз (БАС) — тяжелое нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется утратой моторных нейронов спинного мозга, приводит к дисфагии, дизартрии, респираторным нарушениям и смерти в течение 3-

5 лет. Наиболее известной моделью БАС человека являются трансгенные мыши, несущие мутантную форму человеческого гена супероксиддисмутазы 1 (SOD1), в котором гуанин замещен на аденин в позиции 93 (G93A). На трансгенных мышах линии SOD1-G93A, которые проявляли основные признаки БАС, проверили нейропротекторные свойства препарата цитидин 5-дифосфохолина, который вводили внутривентриально [45]. Ранее были показаны анти-глутаматергические, анти-эксайтотоксические, анти-апоптотические свойства цитидин 5-дифосфохолина. Терапевтический эффект оценивали по выживаемости, двигательной функции, массе тела и общему состоянию. В отдельных сериях гистологически оценивали выживаемость моторных нейронов, астроцитоз и миелинизацию в спинном мозге. Результаты показали, что введение цитидин 5-дифосфохолина не предотвращало ни ухудшение общего состояния, ни потерю массы тела. Выживаемость опытных животных, которым вводили препарат, не отличалась по сравнению с контролем. Ни поведенческие тесты, ни оценка двигательной функции не выявили различий между группами. Также, по данным гистологического анализа, различий между группами животных по выживаемости двигательных нейронов, астроцитозу и миелинизации не было обнаружено. Таким образом, данные, полученные на трансгенных мышах модели болезни БАС, дали возможность объективно оценить целесообразность применения цитидин 5-дифосфохолина при лечении этого заболевания [45].

Болезнь Хантингтона (БГ) является наследственным нейродегенеративным заболеванием человека, которое характеризуется двигательными и когнитивными нарушениями, психиатрическими симптомами, что приводит к неминусовому снижению функций и гибели. После идентификации гена гантингтина (*huntingtin*) и обнаружения мутации в виде увеличения количества CAG-повторов (полиглутаминовые повторы) были разработаны многочисленные трансгенные модели на мышах. Эти модели бывают 2-х типов: с эктопической экспрессией увеличения числа CAG-повторов и *knock-in* модели (прицельное введение трансгена в определенный локус хромосомы) с экспрессией мутантного гантингтина под контролем эндогенных регуляторных элементов [34].

Нарушения сна при БГ могут негативно влиять на когнитивные функции, эмоциональное поведение и общее состояние пациентов. Так, исследования Kantor S. и соавт. [39] были выполнены на трансгенных мышах линии R6/2 — первой и одной из наиболее хорошо охарактеризованных моделей БГ, проявляющих основные неврологические

симптомы этого нейродегенеративного заболевания (такие, как дефицит моторной координации, измененная локомоторная активность, измененные когнитивные способности и эпилептические припадки). Этим мышам был введен экзон 1 гена гантингтина человека, содержащего 150 CAG-повторов. Было показано, что у 6-недельных мышей сон и электроэнцефалограмма были уже нарушены и были подобны таковым у больных с диагнозом шизофрении, то есть на ранней бессимптомной стадии болезни [41].

Препарат ALN-NTT, разработанный американской фирмой *Alnylam*, может оказаться единственным способом лечения БГ. Активной субстанцией этого лекарственного средства является микроРНК, которая вызывает выключение гена гантингтина, ответственного за развитие этого заболевания [27]. Были получены обнадеживающие результаты его применения на трансгенных мышах с признаками этого заболевания [22]. Планируется вводить препарат с помощью вживленных пациентам специальных устройств, которые контролировали бы поступление препарата в головной мозг.

Синдром Дауна (СД) — наследственное заболевание человека, вызванное трисомией хромосомы 21 (*HSA21*), — характеризуется множеством симптомов: наряду с врожденными заболеваниями сердца, лейкемией, гипотонией, моторными дисфункциями наиболее часто встречается значительное нарушение в умственном развитии. К 50 годам у примерно 75 % больных СД наблюдаются симптомы развития БА. Несмотря на то, что большинство наблюдаемых фенотипических признаков при СД обычно связано с трисомией 21 хромосомы, генетические механизмы возникновения множества отклонений неизвестны. Были созданы многочисленные трансгенные модели мышей с СД, которым вводили дополнительные гены либо сегменты хромосом, подобные человеческим, локализованные в 21 хромосоме (у мышей в хромосоме 16). Например, трансгенные мыши, содержащие дополнительные копии гена *APP*, оказались полезными при анализе накопления Аβ-белка при БА и СД, однако эта модель не воспроизводила цитоскелетные изменения, наблюдающиеся при данных заболеваниях. Модели мышей с сегментарной трисомией, доживающие до взрослого возраста и имеющие три копии множества генов (таких, как *Ts1Cje* и *Ts65Dn*, ответственных за развитие фенотипа СД), использовались для исследования аспектов развития нервной системы и нейродегенерации. На данных моделях животных продемонстрированы многие (хотя и не все) патологические, биохимические и молекулярно-биологические изменения, наблюдае-

мые при СД. Они также позволили тестирование терапевтических агентов для восстановления нарушенных функций при СД [83].

Известно, что люди с СД, более восприимчивы к инфекциям и аутоиммунным заболеваниям, однако молекулярно-генетические механизмы данных иммунных патологий являются неисследованными. Иммунные дисфункции, наблюдаемые при СД, исследовались с помощью трансгенных мышей, которым ввели ген *RCAN1*, кодирующий кальципрессин 1 — белок, который взаимодействует с кальцинеирином А и ингибирует кальцинеинзависимые сигналпередающие системы (такие, как активация факторов транскрипции ядерного фактора активированных Т-клеток). У трансгенных мышей наблюдались аномалии в Т-клеточном ответе, подобные обнаруженным при СД. Таким образом, было выяснено, что ген *RCAN1* участвует непосредственно в развитии Т-клеток их функций, а его гиперэкспрессия может приводить к регуляторным нарушениям иммунной системы [52].

Глазные болезни. Несколько точечных мутаций в молекуле родопсина вызывают патологию в сетчатке, включая врожденную куриную слепоту и пигментную дегенерацию сетчатки. Для того чтобы понять, каким образом замена единственной аминокислоты может приводить к указанной дисфункции, у трансгенных мышей вызывали точечную мутацию *G90D* (замена глицина на аспарагиновую кислоту) в молекуле родопсина в фоторецепторных клетках. Абсорбционная спектроскопия показала доступность гидроксилamina в хромофорсвязывающем кармане *G90D*-родопсина темновой фазы, которая не отмечалась в молекуле родопсина дикого типа. По сравнению с родопсином дикого типа темновой фазы *G90D*-мутация снижала энергетическую стабильность и увеличивала механическую ригидность большинства структурных областей в мутантном рецепторе. Наблюдаемые структурные, энергетические и механические изменения в мутантном *G90D*-родопсине позволили понять природу изменений, вызываемых патологической точечной мутацией. Кроме того, эти измененные свойства, наблюдаемые в темновой фазе *G90D*-родопсина, согласуются с его свойствами, наблюдаемыми в активном состоянии [42].

Аналогичный подход с использованием трансгенных мышей был реализован для изучения механизма развития патологии куриной слепоты при экспрессировании мутантной формы α -субъединицы трансдуцина (*Talpa*) с точечной мутацией *G38D*. Биохимические, электрофизиологические и поведенческие тесты, связанные со зрением, обна-

ружили уникальный фенотип снижения чувствительности палочковидных фоторецепторов. Двумя ключевыми нарушениями функций *Talpa-G38D* являлись слабая способность активировать цГМФ-фосфодиэстеразу и снижение ГТФ-азной активности, что, по-видимому, является главными механизмами изменения в сигналпередающих системах, связанных со зрением у трансгенных мышей [58].

Была разработана трансгенная модель открыто-угольной **глаукомы** у мышей с индуцированной экспрессией мутантного миоцилина человека. Целью исследований было установить: вызовет ли более значительные повреждения в глазу экспрессия мутантного человеческого миоцилина, чем мутантного мышиноного миоцилина. Трансгенные мыши экспрессировали повышенный уровень миоцилина в тканях радужно-роговичного угла. Экспрессия мутантного миоцилина приводила к внутриклеточному накоплению и предотвращению секреции мутантного и дикого типов миоцилина во внутриглазную жидкость. Среднее повышение внутриглазного давления у трансгенных мышей было более выраженным в ночное время. В периферической сетчатке трансгенные мыши теряли 20 % ганглиозных клеток и 55 % крупных ганглиозных клеток сетчатки. Аксональная дегенерация наблюдалась на периферии глазного нерва. Экспрессия эквивалентных уровней мутантного человеческого и мышиноного миоцилина приводила к соизмеримым патологическим изменениям, которые были подобными наблюдаемым у пациентов с глаукомой [87].

Было показано, что мутация в 5'-нетранслируемой области гена *DIAPH3* приводит к дву- или трехкратной экспрессии данного гена, что вызывает форму замедленного наступления прогрессирующей **глухоты**, известной как *AUNA1* — *auditory neuropathy, nonsyndromic, autosomal dominant* (аутосомно доминантная бессимптомная слуховая невропатия). Для исследования механизма развития глухоты на основе линии *FVB/NJ* создавали 2 линии трансгенных мышей с гиперэкспрессией *Diap3* — мышиноного ортолога *DIAPH*. Гиперэкспрессия дикого типа *Diap3* в двух линиях трансгенных мышей приводила к потере слуха, которая повторяла человеческую форму глухоты *AUNA1*. Полученные данные демонстрируют основную роль *Diap3* в регуляции сборки и поддержании актиновых филаментов во внутренних волосковых клетках стереоцилий [70].

Трансгенные мыши, несущие дефектный провирус *HIV-1* (вирус иммунодефицита человека I — ВИЧ) *Tg26* широко используются в исследованиях механизмов патогенеза ВИЧ-инфекции и при

поиске терапевтических агентов. Так, например, у *Tg26 HIV-1* и контрольных мышей оценивали клеточную пролиферацию, дифференциацию и паракринную функцию мезенхимальных стволовых клеток, изолированных из компактного слоя кости. Полученные результаты свидетельствовали о том, что *HIV-1* затрагивает биологические функции этих клеток, выражающиеся в снижении их терапевтического потенциала [18].

Сердечно-сосудистая патология. Наследственные аномалии в сердце встречаются примерно у 1 % новорожденных людей и многие являются летальными. К тому же, нарастает интерес к изучению генетического вклада в наследственную или приобретенную сердечно-сосудистую патологию, которая проявляет себя в более позднем онтогенезе. Развитие и структура сердца являются высококонсервативными у мыши и человека. Открытия, которые были сделаны в данной модельной системе, позволили приблизиться к пониманию патогенеза сердечной патологии человека. Использование мутантных мышей позволило обнаружить гены, ответственные за развитие сердечно-сосудистой патологии. Гены-кандидаты были идентифицированы по их роли у других видов или по их экспрессии в соответствующих органах и тканях мышей [57].

Атеросклероз является мультифакторным сложным заболеванием. Трансгенные мыши являются наиболее успешной моделью, позволяющей исследовать этиологию и патогенез атеросклероза и оказывать существенную помощь в разработке эффективных терапевтических подходов. Наиболее широко используемыми моделями атеросклероза являются трансгенные мыши — дефицитные по аполипопротеину *E* и по рецептору липопротеина низкой плотности. Различные модели трансгенных мышей отличаются по ответной реакции на терапевтическое воздействие, направленное на факторы риска — такие, как гиперхолестеролемиа, гиперлипидемия, гипертензия и воспаление. Таким образом, при выборе модели атеросклероза необходимо учитывать исследуемые факторы риска и рабочий спектр терапевтических агентов [86].

Старение. Трансгенные мыши с признаками ускоренного старения применялись для исследования его механизмов [1]. У мутантных мышей с выключенным геном *klotho*, кодирующим трансмембранный белок β -глюкуронидазу, был обнаружен синдром, который проявлялся в сокращении продолжительности жизни, снижении активности, развитии бесплодия, остеопороза, артериосклероза, атрофии кожи и т. п. В то же время, гиперэкспрессия этого гена способствовала увеличению продолжительности жизни подопытных животных [17].

Многообещающие результаты в поиске средств продления жизни были получены на трансгенных мышцах с гиперэкспрессией цитозольной формы фосфоенол-пируват-карбоксикиназы в скелетных мышцах. Наблюдалось повышение активности, выносливости, увеличение продолжительности жизни, а репродуктивная активность в среднем сохранялась до возраста 21 мес (у одной мыши — до возраста 30 мес). Трансгенная мышь содержала химерный ген, в котором кДНК фосфоенолпируват-карбоксикиназы была связана с актиновым промотором скелетных мышц [31].

Таким образом, очень важным направлением использования трансгенных животных является создание моделей различных патологий человека. С одной стороны, это позволяет подтвердить роль тех или иных генов в определенном заболевании, а с другой — создать модель, на которой можно более детально исследовать молекулярные механизмы нарушений и осуществлять целенаправленный отбор лекарственных препаратов. Количество мышинных моделей, доступных для исследований огромно и возможен их поиск в базе данных “*Mouse Genome Database*” [71].

Перспективы развития трансгенных технологий

Комбинированный подход к применению технологий, основанных на использовании ЭСК, химического и инсерционного мутагенеза, позволит создать библиотеку мутантов с последующим фенотипированием. Целью фенотипирования мутантных организмов по каждому гену является составление функциональной карты генома млекопитающих. Это будет огромным вкладом в понимание биологии млекопитающих и может значительно изменить будущее медицинской диагностики и терапии, где базы данных могли бы служить для поиска потенциальных мишеней лекарственных средств или выявления генетических причин заболевания.

В 2007 г. был образован международный консорциум по созданию нокаутированных мышей, который объединил программы по мутагенезу в США, Канаде и Европе. Целью консорциума было объединить усилия многих стран по созданию мутаций по каждому белоксинтезирующему гену. Спустя 5 лет члены консорциума произвели 17 400 клонов мутантных ЭСК и более 1700 мутантных трансгенных линий мышей. Создан веб-портал, позволяющий легко контролировать данные по уже полученным линиям клеток или трансгенных животных [68].

Идентификация и клонирование определенных генов, ответственных за развитие болезней, с помощью позиционного клонирования позволяет значительно расширить понимание молекулярных

механизмов многих заболеваний человека. Стало возможным создавать мышечные модели заболеваний человека посредством нокаута или трансгенной технологии. Благодаря дальнейшему усовершенствованию модельных систем и углубленному пониманию биохимических основ этиологии и патогенеза заболеваний появятся новые перспективные подходы для разработки лекарственных средств. Методологические подходы генетики также способствуют развитию захватывающих перспектив использования самих генов в качестве терапевтических средств для лечения заболеваний. Например, разрабатываются стратегии доставки копии гена пациентам гомозиготным по рецессивной мутации с потерей функции для устранения дефекта. Кроме того, стратегии лечения рака направлены на введение специфических генов, которые могли бы индуцировать самоустранение раковых клеток (апоптоз) или активизировать иммунную систему пациента. Эта новая и интересная

область обладает огромным потенциалом. Проводятся многочисленные испытания с применением технологий генных модификаций. Однако эти исследования пока испытывают недостаток в существовании эффективных векторов доставки генов, которые бы обеспечивали постоянный терапевтический уровень генного продукта и были направлены в специфические ткани [1, 49, 64, 71].

Таким образом, можно заключить, что создание и использование новых трансгенных моделей является важным инструментом для оценки роли генов в механизме нормальных и патологических процессов. При этом необходимо учитывать максимальную адекватность используемых экспериментальных моделей. Кроме того, существуют определенные ограничения при интерпретации данных, полученных в опытах с использованием трансгенных животных, поскольку остаются недостаточно изученными особенности геномного гомеостаза и механизмы его регуляции.

Список использованной литературы

1. Анисимов В. Н. Молекулярные и физиологические механизмы старения: В 2 т. — 2-е изд., перераб. и доп. — СПб.: Наука, 2008. — Т. 2. — 434 с.
2. Гулько Т. П., Дерябина Е. Г. Изучение особенностей развития мышечных бластоцист при длительном культивировании // Фактическая экспериментальная эволюция организмов: Сборник конференции. — 2010. — 9. — С. 403-408.
3. Гулько Т. П., Дерябина Е. Г., Рубан Т. А. и др. Изучение особенностей развития мышечных бластоцист на ранних этапах культивирования // Журн. АМН України. — 2010. — 16, додаток. — С. 46-47.
4. Кирик В. М., Немцінов П. І., Лабунець І. Ф. та ін. Мікрomanipуляція з доімплантаційними ембріонами мишей на комп'ютеризованому наномеханотронному комплексі // Біологічні основи розвитку патології пізнього віку: Тези доповідей наукової конференції молодих вчених з міжнародною участю (Київ, 29 січня 2007 р.). — К., 2007. — С. 53-55.
5. Попов Л. С., Языков А. А. Трансгенные животные как модели для изучения репродукции эмбрионального развития и заболеваний человека // Успехи современной биологии. — 1999. — 119, № 1. — С. 30-41.
6. Щелкунов С. Н. Генетическая инженерия: Учебно-справочное пособие. — Новосибирск: Сибирское университетское изд-во, 2008. — 514 с.
7. Цупиков О. М., Півнева Т. А., Поддубна А. О. та ін. Міграція та диференціація трансплантованих фетальних нейрогенних клітин у мозку ішемізованих тварин // Фізіол. журн. — 2009. — 55, № 4. — С. 41-49.
8. Ashe K. H. Learning and memory in transgenic mice modeling Alzheimer's disease // Learning and Memory. — 2001. — 8. — P. 301-308.
9. Auerbach A. B. Production of functional transgenic mice by DNA pronuclear microinjection // Acta Bioch. Polonica. — 2004. — 51, № 1. — P. 9-31.
10. Avilion A. A., Nicolis S. K., Pevny L. H. et al. Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function // Genes & Development. — 2003. — 17. — P. 126-140.
11. Basu-Roy U., Ambrosetti D., Favaro R. et al. The transcription factor Sox2 is required for osteoblast selfrenewal // Cell Death Differ. — 2010. — 17, № 8. — P. 1345-1353.
12. Bender A., Desplats P., Spencer B. et al. TOM40 mediates mitochondrial dysfunction induced by α -synuclein accumulation in Parkinson's disease // PLoS One. — 2013. — 8, № 4. — P. e62277.
13. Brinster R. L., Chen H. Y., Messing A. et al. Transgenic mice harboring SV40 T-antigen genes develop characteristic brain tumors // Cell. — 1984. — 37. — P. 367-379.
14. Bujard H., Gossen M. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. — 1992. — 89, № 12. — P. 5547-5551.
15. Campbell I. L. Transgenic mice and cytokine actions in the brain: bridging the gap between structural and functional neuropathology // Brain Research Reviews. — 1998. — 26, № 2-3. — P. 327-336.
16. Chaible L. M., Corat M. A., Abdelhay E., Dagli M. L. Z. Genetically modified animals for use in research and biotechnology // Genetics and Molecular Research. — 2010. — 9, № 3. — P. 1469-1482.
17. Chen T. H., Kuro-O M., Chen C. H. et al. The secreted Klotho protein restores phosphate retention and suppresses accelerated aging in Klotho mutant mice // Eur. J. Pharmacol. — 2013. — 698, № 1-3. — P. 67-73.
18. Cheng K., Rai P., Lan X. et al. Bone-derived mesenchymal stromal cells from HIV transgenic mice exhibit altered proliferation, differentiation capacity and paracrine functions along with impaired therapeutic potential in kidney injury // Exp. Cell Res. — 2013. — 319, № 14. — P. 2266-2274.

19. Chiang C., Litingtung Y., Lee E. et al. Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function // *Nature*. — 1996. — **383**, № 6599. — P. 407-413.
20. Cloëtta D., Thomanetz V., Baranek C. et al. Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis // *J. Neurosci.* — 2013. — **33**, № 18. — P. 7799-7810.
21. Cohen-Tannoudji M. Nobel Prize 2007 for Medicine to Mario Capecchi, Martin Evans and Oliver Smithies: the mutant mice to order // *Med. Sci. (Paris)*. — 2007. — **23**, № 12. — P. 1159-1161.
22. Conmy S., Nasheuer H. P. The use of transgenic mice in cancer and genome stability research // *Subcell Biochem.* — 2010. — **50**. — P. 325-336.
23. DiFiglia M., Sena-Esteves M., Chase K. et al. Therapeutic silencing of mutant huntingtin with siRNA attenuates striatal and cortical neuropathology and behavioral deficits // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2007. — **104**, № 43. — P. 17204-17209.
24. Domyan E. T., Branchfield K., Gibson D. A. et al. Roundabout receptors are critical for foregut separation from the body wall // *Dev. Cell*. — 2013. — **24**, № 1. — P. 52-63.
25. Freemantle1 S. J., Dmitrovsky E. Cyclin E transgenic mice: discovery tools for lung cancer. Biology, therapy, and prevention // *Cancer Prev. Res. (Phila)*. — 2010. — **3**, № 12. — P. 1513-1518.
26. Fröhlich C., Paarmann K., Steffen J. et al. Genomic background-related activation of microglia and reduced β -amyloidosis in a mouse model of Alzheimer's disease // *Eur. J. Microbiol. Immunol. (Bp)*. — 2013. — **3**, № 1. — P. 21-27.
27. Gagnon K. T. HD Therapeutics // CHDI Fifth Annual Conference. Drugs. — 2010. — **13**, № 4. — P. 219-223.
28. Gama Sosa M. A., De Gasperi R., Elder G. A. Modeling human neurodegenerative diseases in transgenic systems // *Hum. Genet.* — 2012. — **131**, № 4. — P. 535-563.
29. Gantz J. A., Palpant N. J., Welikson R. E. et al. Targeted genomic integration of a selectable floxed dual fluorescence reporter in human embryonic stem cells // *PLoS One*. — 2012. — **7**, № 10. — P. e46971.
30. Gordon J. W., Scangos G. A., Plotkin D. J. et al. Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. — 1980. — **77**, № 12. — P. 7380-7384.
31. Hakimi P., Yang J., Casadesus G. et al. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse // *J. Biol. Chem.* — 2007. — **282**, № 45. — P. 32844-32855.
32. Hanahan D. Heritable formation of pancreatic β -cell tumours in transgenic mice expressing recombinant insulin/simian virus 40 oncogenes // *Nature*. — 1985. — **315**, № 6015. — P. 115-122.
33. Hanahan D., Wagner E. F., Palmiter R. D. The origins of oncomice: a history of the first transgenic mice genetically engineered to develop cancer // *Genes Dev.* — 2007. — **21**, № 18. — P. 2258-2270.
34. Heng M. Y., Detloff P. J., Albin R. L. Rodent genetic models of Huntington disease // *Neurobiol. Dis.* — 2008. — **32**. — P. 1-9.
35. Jaisser F. Inducible gene expression and gene modification in transgenic mice // *J. Am. Soc. Nephrol.* — 2000. — **11**. — P. S95-S100.
36. Jan T. A., Chai R., Sayyid Z. N., Cheng A. G. Isolating LacZ-expressing cells from mouse inner ear tissues using flow cytometry // *J. Vis. Exp.* — 2011. — **58**. — P. 1-7.
37. Johnson K. E., Wilgus T. A. Multiple roles for VEGF in non-melanoma skin cancer: angiogenesis and beyond // *J. Skin Cancer*. — 2012. — **2012**. — P. 1-6.
38. Jones D. Genetic engineering of a mouse: Dr. Frank Ruddle and somatic cell genetics // *Yale J. Biol. Med.* — 2011. — **84**, № 2. — P. 117-124.
39. Jungke P., Hans S., Brand M. The zebrafish CreZoo: an easy-to-handle database for novel CreERT2-driver lines // *Zebrafish*. — 2013. — **10**, № 3. — P. 259-263.
40. Kalueff A. V., Wheaton M., Murphy D. L. What's wrong with my mouse model? Advances and strategies in animal modeling of anxiety and depression // *Behav. Brain Res.* — 2007. — **179**. — P. 1-18.
41. Kantor S., Szabo L., Varga J. et al. Progressive sleep and electroencephalogram changes in mice carrying the Huntington's disease mutation // *Brain*. — 2013. — **136**, Pt. 7. — P. 2147-2158.
42. Kawamura S., Colozo A. T., Ge L. et al. Structural, energetic, and mechanical perturbations in rhodopsin mutant that causes congenital stationary night blindness // *J. Biol. Chem.* — 2012. — **287**, № 26. — P. 21826-2135.
43. Kirwan S., Kalhan C., Hanson R. W. Overexpression of the cytosolic form of phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP) in skeletal muscle repatterns energy metabolism in the mouse // *J. Biol. Chem.* — 2007. — **282**, № 45. — P. 32844-32855.
44. Klein R. F. Genetics of osteoporosis — utility of mouse models // *J. Musculoskelet. Neuronal Interact.* — 2008. — **8**. — P. 287-290.
45. Knippenberg S., Skripuletz T., Rath K. J. et al. CDP-choline is not protective in the SOD1-G93A mouse model of ALS // *Amyotroph. Lateral Scler. Frontotemporal Degener.* — 2013. — **14**, № 4. — P. 284-290.
46. Lacey M., Alpert S., Hanahan D. Bovine papillomavirus genome elicits skin tumours in transgenic mice // *Nature*. — 1986. — **322**, № 6080. — P. 609-612.
47. Leboucher A., Laurent C., Fernandez-Gomez F. J. et al. Detrimental effects of diet-induced obesity on τ pathology are independent of insulin resistance in τ transgenic mice // *Diabetes*. — 2013. — **62**, № 5. — P. 1681-1688.
48. Leroith D., Gavrilova O. Mouse models created to study the pathophysiology of type 2 diabetes // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2006. — **38**. — P. 904-912.
49. Li L., Lampert J. C., Chen X. et al. Transgenic mice with a diverse human T cell antigen receptor repertoire // *Nature Med.* — 2010. — **16**. — P. 1029-1034.
50. Lin T. P. Microinjection of mouse eggs // *Science*. — 1966. — **151**. — P. 333-337.
51. Maizels N. Genome Engineering with Cre-loxP // *J. Immunol.* — 2013. — **191**, № 1. — P. 5-6.
52. Martin K. R., Layton D., Seach N. et al. Upregulation of RCAN1 causes Down syndrome-like immune dysfunction // *J. Med. Genet.* — 2013. — **50**, № 7. — P. 444-454.
53. Massart R., Mongeau R., Lanfumey L. Beyond the monoaminergic hypothesis: neuroplasticity and epigenetic changes in a transgenic mouse model of depression // *Philos. Trans. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* — 2012. — **367**, № 1601. — P. 2485-2494.
54. Melnikova T., Fromholt S., Kim H. et al. Reversible pathologic and cognitive phenotypes in an inducible model

- of Alzheimer-amyloidosis // *J. Neurosci.* — 2013. — **33**, № 9. — P. 3765-3779.
55. Miller R. L. Transgenic mice: beyond the knockout // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* — 2011. — **300**. — P. F291-F300.
56. Montoliu L., Chavez S., Vidal M. Variegation associated with *lacZ* in transgenic animals: a warning note // *Transgenic Res.* — 2000. — **9**. — P. 237-239.
57. Moon A. Mouse models of congenital cardiovascular disease // *Curr. Top. Dev. Biol.* — 2008. — **84**. — P. 171-248.
58. Moussaif M., Rubin W. W., Kerov V. et al. Phototransduction in a transgenic mouse model of Nougaret night blindness // *J. Neurosci.* — 2006. — **26**. — P. 6863-6872.
59. Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual: 3rd ed. — Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Lab. Press, 2003. — 764 p.
60. Nery A. A., Nascimento I. C., Glaser T. et al. Human mesenchymal stem cells: from immunophenotyping by flow cytometry to clinical applications // *Cytometry A.* — 2013. — **83**, № 1. — P. 48-61.
61. O'Donnell K. A., An W., Schrum C. T. et al. Controlled insertional mutagenesis using a LINE-1 (ORFeus) gene-trap mouse model // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* — 2013. — **110**, № 29. — P. E2706-E2713.
62. Palmiter R. D., Brinster R. L., Hammer R. E. et al. Dramatic growth of mice that develop from eggs microinjected with metallothionein-growth hormone fusion genes // *Nature.* — 1982. — **300**, № 5893. — P. 611-615.
63. Park S., Liu X., Davis D. R., Sigmund C. D. Gene trapping uncovers sex-specific mechanisms for upstream stimulatory factors 1 and 2 in angiotensinogen expression // *Hypertension.* — 2012. — **59**, № 6. — P. 1212-1219.
64. Pattengale P. K., Stewart T. A., Leder A. et al. Animal Models of Human Disease. Pathology and molecular biology of spontaneous neoplasms occurring in transgenic mice carrying and expressing activated cellular oncogenes // *Am. J. Pathology.* — 1989. — **135**, № 1. — P. 39-61.
65. Rachagani S., Torres M. P., Kumar S. et al. Mucin (Muc) expression during pancreatic cancer progression in spontaneous mouse model: potential implications for diagnosis and therapy // *J. Hematol. Oncol.* — 2012. — **5**, № 68. — P. 1-12.
66. Rostovskaya M., Naumann R., Fu J. et al. Anastassiadis K. Transposon mediated BAC transgenesis via pronuclear injection of mouse zygotes // *Genesis.* — 2013. — **51**, № 2. — P. 135-341.
67. Rüther U., Garber C., Komitowski D. et al. Deregulated *c-fos* expression interferes with normal bone development in transgenic mice // *Nature.* — 1987. — **325**, № 6103. — P. 412-416.
68. Ryder E., Gleeson D., Sethi D. et al. Molecular characterization of mutant mouse strains generated from the EUCOMM/KOMP-CSD ES cell resource // *Mamm. Genome.* — 2013. — **24**, № 7-8. — P. 286-294.
69. Ryding A., Sharp M., Mullins J. Conditional transgenic technologies // *J. Endocrinol.* — 2001. — **171**. — P. 1-14.
70. Schoen C. J., Burmeister M., Lesperance M. M. Diaphanous homolog 3 (*Diap3*) overexpression causes progressive hearing loss and inner hair cell defects in a transgenic mouse model of human deafness // *PLoS One.* — 2013. — **8**, № 2. — P. e56520.
71. Shashikant C. S., Ruddle F. H. Impact of transgenic technologies on functional genomics // *Curr. Issues Mol. Biol.* — 2003. — **5**. — P. 75-98.
72. Skarnes W. C., Moss J. E., Hurtley S. M. et al. Capturing genes encoding membrane and secreted proteins important for mouse development // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* — 1995. — **92**. — P. 6592-6596.
73. Smith A. D., Sumazin P., Zhang M. Q. Tissue-specific regulatory elements in mammalian promoters // *Mol. Syst. Biol.* — 2007. — **3**, № 73. — P.1-8.
74. Song W., Vikhorev P. G., Kashyap M. N. et al. Mechanical and energetic properties of papillary muscle from ACTC E99K transgenic mouse models of hypertrophic cardiomyopathy // *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* — 2013. — **304**, № 11. — P. H1513-H1524.
75. Stewart T. A., Pattengale P. K., Leder P. Spontaneous mammary adenocarcinomas in transgenic mice that carry and express MTV/myc fusion genes // *Cell.* — 1984. — **38**. — P. 627-637.
76. Taverner J. Transgenic mice in the study of cytokine function // *Int. J. Exp. Path.* — 1993. — **74**. — P. 525-546
77. Temple S. The development of neural stem cells // *Nature.* — 2001. — **414**, № 6859. — P. 112-117.
78. Terada M., Nobori K., Munehisa Y. et al. Double transgenic mice crossed GFP-LC3 transgenic mice with alpha-MyHC-mCherry-LC3 transgenic mice are a new and useful tool to examine the role of autophagy in the heart // *Circ. J.* — 2010. — **74**. — P. 203-206.
79. Tsunematsu T., Tabuchi S., Tanaka K. F. et al. Long-lasting silencing of orexin/hypocretin neurons using archaerhodopsin induces slow-wave sleep in mice // *Behav. Brain Res.* — 2013. — **255**. — P. 64-74.
80. Tsupykov O. M., Pivneva T. A., Poddubna A. O. et al. Migration and differentiation of fetal neural progenitor cells in the brain of ischemic animals // *Int. J. Phys. Pathophys.* — 2010. — **1**, № 40. — P. 25-34.
81. Tsupykov O. M., Poddubnaya A. O., Smozhanyk K. G. et al. Integration of grafted neural progenitor cells in a host hippocampal circuitry after ischemic injury // *Neurophysiology.* — 2011. — **43**, № 4. — P. 324-326.
82. Turner R. S. Alzheimer's disease in man and transgenic mice. Females at Higher Risk // *Am. J. Pathology.* — 2001. — **158**, № 3. — P. 797-801.
83. Vacano G. N., Duval N., Patterson D. The use of mouse models for understanding the biology of Down syndrome and aging // *Current Geront. Geriatr. Res.* — 2012. — **2012**. — P. 1-20.
84. Wang T. H., Jiang Y., Xiao L. P. Expression of amyloid beta-protein in bone tissue of APP/PS1 transgenic mouse // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* — 2013. — **93**, № 1. — P. 65-68.
85. Xu Z., Liu E., Peng C. et al. Role of hypoxia-inducible-1 α in hepatocellular carcinoma cells using a Tet-on inducible system to regulate its expression *in vitro* // *Oncol. Rep.* — 2012. — **27**, № 2. — P. 573-578.
86. Zadelaar S., Kleemann R., Verschuren L. et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* — 2007. — **27**. — P. 1706-1721.
87. Zhou Y., Grinchuk O., Tomarev S. I. Transgenic mice expressing the Tyr437His mutant of human myocilin protein develop glaucoma // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* — 2008. — **49**. — P. 1932-1939.

Получено 27.10.2013

ТРАНСГЕННІ МИШІ У МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ДОСЛІДАХ (огляд літератури)

Н. О. Утко, І. Ф. Лабунець, Г. М. Бутенко

Державна установа “Інститут генетичної та регенеративної медицини НАМН України”, 04114 Київ

Проаналізовані основні методи отримання трансгенних тварин та їх застосування у біологічних та медичних дослідженнях. Показано, що найкращою системою створення трансгенних тварин може бути тетрациклінова система, що має найбільш широкі можливості для індукованої регуляції експресії трансгена. Однак завдяки відносній дешевизні та швидкості отримання трансгенних тварин метод прямої ін'єкції ДНК у пронуклеус заплідненої яйцеклітини дотепер вважається найбільш популярним способом. Найчастіше трансгенні миші застосовуються для досліджень тканинно-специфічної експресії та генної регуляції, специфічної на певних стадіях розвитку, а також для експериментів із фенотипічних проявів трансгенної експресії (наприклад, для отримання моделей різних захворювань, обумовлених зміненою генною експресією). Обговорені перспективи розвитку трансгенних технологій. Нові досягнення в галузі трансгенезу безумовно зроблять позитивний вплив на лікування хвороб людини із застосуванням генної терапії і стовбурових клітин. Разом з тим, використовувані експериментальні моделі повинні бути максимально адекватними. Крім того, існують певні обмеження при інтерпретації даних, отриманих у досліді з використанням трансгенних тварин, оскільки залишаються недостатньо дослідженими особливості геномного гомеостазу та механізми його регуляції.

TRANSGENIC MICE IN BIOMEDICAL RESERCH (review of literature)

N. A. Utko, I. F. Labunets, G. M. Butenko

State institution “Institute of Genetic and Regenerative Medicine NAMS Ukraine”, 04114 Kyiv

Analyzed were methods of breeding transgenic animals and their use in biomedical research. A tetracycline system with its widest opportunities for the inducible regulation of transgene expression was shown to be a most preferable system for growing transgenic animals. Although, owing to comparatively low price and simplicity the method of direct pronuclear microinjection is still considered to be a most popular way of making transgenic animals. Most frequently the transgenic mice are used for the studies of tissue-specific expression and developmental-stage-specific gene regulation, as well as for experiments related to phenotypic effects of transgene expression (e.g., production of transgenic models of different diseases). Future prospects of transgenic technologies development are also discussed. New achievements in gene transfer technology will have a positive effect on the treatment of human diseases using gene therapy and cell therapy applications. At the same time, the experimental models used should be quite adequate. In addition, there are certain limitations in interpreting data, obtained in experiments with the use of transgenic animals, since the peculiarities of genome homeostasis and mechanisms of its regulation still need further study.