**ВВЕДЕНИЕ**

В настоящее время используются несколько подходов в получении трансгенных животных. Наиболее широко распространен метод микроинъекций чужеродной ДНК (чДНК) в пронуклеусы зигот. Оптимальные условия для проведения микроинъекций в пронуклеусы зигот мышей описаны в работе Бринстера и соавторов (1994).

Величина вводимой ДНК может достигать 30 Mb. Интеграция нескольких копий (от 1 до нескольких сотен) экзогенной ДНК в геном происходит, как правило, в одном сайте в ориентации "голова к хвосту" или "голова к голове". При инъекции нескольких рекомбинантных конструкций, их встраивание в геном, также происходит в одном сайте.

Другой подход в получении трансгенных животных заключается в инфицировании ранних эмбрионов млекопитающих рекомбинант-нымиретровирусами. Недостатком этого метода является получение трансгенных животных с мультисайтовой интеграцией трансгена и его нестабильной наследуемостью в поколениях.

Еще одним подходом в получении трансгенных животных является использование трансформированных чужеродной ДНК, эмбриональных стволовых клеток, путем инъекции последних в полость бластоцисты. Основным преимуществом данного метода является возможность проводить направленный мутагенез на уровне целого организма, при помощи гомологичной рекомбинации чужеродной ДНК с геномной ДНК.

Для получения трансгенных животных использовались и другие методы, к которым относятся: применение сперматозоидов, обработанных экзогенной ДНК, для оплодотворения яйцеклеток в условиях in vitro; использование липосом в качестве вектора чужеродной ДНК. Однако, эти методы имеют значительно менее широкое распространение, в сравнении с методом микроинъекции чужеродной ДНК в пронуклеус зиготы.

**1. МЕТОДЫ ТРАНСГЕНЕЗА В ЖИВОТНОВОДСТВЕ**

Трансгенные животные - это индивидуумы, в геном которых искусственно введена дополнительная генетическая информация (трансген). Такая информация представляет собой либо отдельный участок ДНК с собственными (гомологичными) регуляторными последовательностями (эукариотическая транскрипционная единица), либо сконструированный из различных молекул ДНК гибридный (рекомбинантный) ген. Таким образом, трансген - это искусственно введенный и интегрировавшейся в ДНК животных чужеродный ген. Под трансгенезом понимают процесс переноса и интеграции чужеродной генетической информации в геном животных.

**1.1 Метод микроинъекции**

Впервые о получении трансгенных сельскохозяйственных животных сообщили две лаборатории в США и Германии [Hammer et al, 1985; Brem et al., 1985]. В обоих случаях для переноса генных конструкций в эмбриональные линии был использован метод микроинъекции. Этот метод и сегодня остается наиболее широко используемым для трансгенеза в животноводстве.

Суть метода микроинъекции заключается во введении раствора генных конструкций в мужской пронуклеус зигот. Обычно инъецируют 1-2 пкл раствора ДНК в концентрации, соответствующей 1000 копиям в 1 пкл микроинъекционного раствора. При этом исходят из того, что количество 1000 копий/пкл приблизительно соответствует концентрации X нг/мкл, где X - длина генной конструкции в тысячах парах нуклеотидов (т.п.н). Например, если длина генной конструкции равна 10 т.п.н., то количество 1000 копий в 1 пкл будет достигаться при концентрации равной 10 нг/мкл.

Для более точного расчета концентрации генных конструкций используют следующую формулу:

Число копий (копий плк) = 6,023 \*1023\*С\*10-9 /Mr, где 6,023\*1023 - число копий в 1 М растворе;

С - концентрация ДНК [мкг/мл];

Mr - молекулярная масса [мг/моль].

Для расчета концентрации измеряют оптическую плотность раствора генной конструкции на спектрофотометре при длине волны 260 нм. 1 OD соответствует концентрации двуточечной ДНК равной 50 мкг/мл. При расчете молекулярной массы исходят из того, что молекулярная масса 1 п.н. равна 6,6 \* 108 мг/моль.

Об успешном выполнении микроинъекции судят по увеличению объема пронуклеуса в 1,5-2 раза [Брем и др., 1995]. В эмбрионах мышей кроликов, овец и коз пронуклеусы достаточно хорошо визуализируются под микроскопом при увеличении х400 без выполнения каких-либо дополнительных манипуляций. Что касается эмбрионов свиней и крупного рогатого скота, то вследствие наличия в цитоплазме темных липидосодержащих гранул определение местоположения пронуклеусов в них затруднено. Для смещения этих гранул к краям эмбриона и облегчения тем самым локализации пронуклеусов выполняют центрифугирование эмбрионов свиней и КРС при 15000 об/мин в течение 3 мин. [Wall et ai, 1985]. По завершении микроинъекции эмбрионы культивируют несколько часов до момента их пересадки в яйцевод синхронизированных реципиентов. Эмбрионы КРС культивируют in vitro в течение 6-7 дней до достижения ими стадий морулы или бластоцисты и затем выполняют пересадку в матку синхронизированных реципиентов. После рождения от всех животных отбирают пробы ткани для анализа на интеграцию трансгена. Степень интеграции, то есть число трансгенных животных от общего числа родившихся животных, при использовании метода микроинъекции в зависимости от вида животных колеблется в незначительных пределах. Так, у мышей этот показатель в среднем составляет 15%, у свиней - 10-15%, у кроликов - 10%, у овец, коз и КРС -5-10% [Брем и др., 1995]. Наиболее важным, с точки зрения затрат, требующихся для получения одного трансгенного животного, является показатель общей эффективности трансгенеза, который рассчитывается как отношение числа полученных трансгенных животных к общему числу пересаженных эмбрионов, выраженное в процентах. Величина этого показателя также относительно постоянна и составляет у мышей -2%, у кроликов 1%, у овец и коз – 0,5 – 1%, у свиней и КРС – 0,5%. На частоту интеграции оказывает влияние степень очистки инъекционного раствора, форма и концентрация ДНК, состав буферного раствора, качество эмбрионов, способ пересадки эмбрионов реципиентам (нехирургический, хирургический, лапароскопический). При использовании раствора MSOF(синтетическая среда эмбрионов) для микроинъекции зигот крупного рогатого скота (Hageman [1995]) было показано, что инъекция раствора MSOF не оказывала влияния на жизнеспособность эмбрионов крупного рогатого скота, полученных in vitro. Так, доли эмбрионов, развившихся до стадии бластоцисты, в группах MSOF и контрольной составляли, соответственно, 27,6% и 27,5%. В группе ТЕ до стадии бластоцисты развились лишь 13,9% инъецированных зигот. Сопоставляя результаты двух приведенных выше исследований, можно предположить, что буфер MSOF окажется более эффективным по сравнению со стандартным раствором ТЕ для получения трансгенного крупного рогатого cкота и других видов сельскохозяйственных животных.

Не смотря на достигнутые в области трансгенеза успехи, эффективность получения трансгенных сельскохозяйственных животных остается очень низкой [Wall et al., 1992; Wall et al. 1997] что побуждает исследователей искать новые подходы. Одним из путей повышения эффективности трансгенеза является разработка методов оценки эмбрионов на трансгенность перед ихпересадкой реципиентам. К ним относится использование в конструкциях репортерных генов, таких как β-галактозидаза, щелочная фосфотаза и др., а также определение трансгенов в эмбрионах методом ПЦР и флюоресцентной гибридизации.

Не смотря на использование большого числа маркеров, не было разработано системы, позволяющей повысить эффективность трансгенеза у сельскохозяйственных животных. Основные подходы, исполбзующиеся в настоящее время:

**1.2 Использование ретровирусных векторов**

Результативным способом переноса ДНК в эмбриональные линии животных является применение ретровирусных векторов.

Ретровирусы – семейство эукариотических вирусов, генетический материал которых представлен одноцепочечной РНК*.*

Вирусы состоят покрытых липопротеидной оболчкой вирусных частиц диаметром 70-120 нм и внутренней капсулы икосаэдрической формы, которая содержит две копии геномной РНК длиной 5-10 тысяч пар нуклеотидов в форме рибонуклеопротеида. Внешняя оболочка вируса является частью цитоплазматической мембраны клетки хозяина и представлена короткими гликопротеидами. Эндогенные ретровирусы являются хромосомными элементами и составляют до 1% ДНК в геноме человека [Tarusio Mantovani, 1998]. Эндогенные ретровирусы являются одной из разновидностей ретроэлементов, составляющих до 10% генома млекопитающих.

По своей способности инфицировать клетки хозяина ретровирусы подразделяются на экотропные и амфотропные. Экотропные вирусы способны реплицироваться в клетках только одного или нескольких близко родственных видов животных. Так, например, вирус лейкемии мыши (MLV) размножается только в клетках мыши и крысы. Амфотропные вирусы, наоборот, имеют широкий спектр хозяев и способны к размножению в клетках различных видов млекопитающих.

Геном всех способных к репликации ретровирусов устроен аналогичным образом и состоит из трех кодирующих регионов, которые, не смотря на то, что речь идет о последовательностях РНК, получили название генов*.* Ген gag кодирует белки капсида и вирусного кора. Ген pol кодирует вирусную реверсивную транскриптазу и другие связанные с вирусом нуклеазы. Ген env кодирует гликопротеиды в вирусной липидной оболочке.

Геномные РНК ретровирусов содержат на свох концах повторяющиеся последовательности, которые в зависимости от типа вируса имеют длину от 10 до 80 нуклеотидов. Они получили название R-сегментов. На 3' конце геномной РНК R-сегмента расположен регион U3 длиной 170-1250 нуклеотидов, а на 5' конце r-сегмента регион u5 длиной 80-100 нуклеотидов.При образовании ДНК-копии вирусного РНК-генома на концах молекулы происходят изменения: на 5' конце располагается сегмент U3, а на 5' – U5.Такие характерные для ДНК-формы ретровирусоа участки получили название LTR – длинных концевых повторов. LTR, расположенный на 5' конце несет очень сильный промотер, тогда как LTR на 3' конце содержит сигналы полиаденилирования РНК.

Инфекция начинается с взаимодействия ретровируса с клеточной мембраной и связывания поверхностного белка ретровируса (env) со специфическим белком-рецептором. Проникновение ретровируса в клетку происходит посредством микропиноцитоза. У одних вирусов кор, состоящий из белка gag, РНК-зависимой ДНК-полимеразы (реверсивной транскриптазы), интегразы и двух копий ретровирусной РНК, переносится в ядро, где и происходит транскрипция, а у других вирусов транскрипция осуществляется непосредственно в цитоплазме. Обратная транскрипция вирусной РНК в двухцепочечную ДНК осуществляется посредством фермента реверсивной транскриптазы, являющегося частью комплекса ферментов кора. В ходе транскрипции происходит дупликация последовательностей на 5' и 3' концах ретровируса. Если транскрипция имеет место в цитоплазме клетки, то двухцепочечная ДНК вируса транспортируется в ядро, где происходит ее циркуляция с последующей интеграцией одной или нескольких копий в геном клетки. Такая интегрированная ДНК клетки хозяина форма существования вирусного генома получила название провируса. Шаги жизненного цикла ретровирусов.

Для интеграции необходимо наличие на обоих концах ДНК 9 пар оснований, которые узнаются и отщепляются закодированной в вирусе специфической интегразой, являющейся частью комплекса ферментов кора. Процессу интеграции всегда предшествует отщепление двух пар оснований на обоих концах провируса и удвоение 3-6 пар оснований (в зависимости от типа вируса) последовательности ДНК клетки хозяина. Хотя интеграция в геном клетки хозяина не является специфической, следует отметить, что места интеграции часто располагаются в транскрипционно активных участках ДНК. Если происходит интеграция в геном генеративных клеток, то ретровирусы передаются по наследству потомству. В этом случае речь ведут об эндогенных ретровирусах.

Интегрированная вирусная ДНК транскрибируется с помощью РНК-полимеразы клетки-хозяина и трансляцируется как и другие клеточные гены.

Образующиеся в ходе транскрипции продукты являются идентичными вирусной РНК. Все транскрипты содержат на 5 конце кэп-сайт, а на 3' конце участок полиаденилирования. Такие РНК служат материалом для синтеза белков капсида и вирусного кора, а также белков обратной транскриптазы.. Эти белки образуют с геномной РНК вируса комлексы-коры, после чего вирусные частицы покидают клетку через цитоплазматическую мембрану. При этом кор берет с собой часть мембраны клетки хозяина, из которой образует оболочку. Интеграция вирусных частиц в геном клетки хозяина происходит только в митотически активные клетки.

Инфицирование клеток ретровирусами чаше всего не сказывается на их жизнедеятельности. Однако если интеграция провируса произошла вблизи клеточных протоонкогенов, то возможна их активация и, как следствие, гибель клеток. Нарушение жизнеспособности клеток .может иметь место и в том случае интегрирации провируса в действующий клеточный ген (например, опухолевые гены-супрессоры).

Наиболее часто используемыми ретровирусными векторами являюти векторы на основе ретровирусов мыши типа С (вирус лейкемии мыши) Такие векторные системы состоят из двух компонентов: векторнов конструкции и линии клеток-упаковщиц*.*

В векторной конструкции (провирусная ДНК) гены, кодируюрущие структурные белки ретровируса (gag, pol, env),замешают другими интересующими генами (генами β- галактозидазы и устойчивости к неомицину). Источником структурных белков является клеточная линия, содержащая интегрированный в геном провирус.

Данный провирус модифицируют таким образом, что у него отсутствует сигнал узнавания ψ, необходимый для упаковки вирусной РНК. Таким образом, транскрибируемая вирусная РНК не может быть упакована в вирусные частицы.

РНК векторной конструкции, наоборот, содержит сигнал узнавания ψ и поэтому может быть упакована в рибонуклеопротеидный комплекс. Таким образом, происходит формирование инфекционных вирусных частиц, содержащих информацию ретровирусного вектора и переносящих ее в инфицируемые клетки. Однако такие вирусные частицы не способны к образованию новых вирусов, так как в инфицируемой клеточной линии отсутствует генетическая информация о структурных белках, необходимых для формирования вирусных частиц.

Необходимыми составными частями векторной конструкции являются 5' и 3' LTR, а так же сигнал упаковки, расположенный "вниз по течению" от 5' UTR. Экспрессия трансгена направляется промотором и энхансером 5' UTR или альтернативными вирусными или клеточными промотерами (например, вирус саркомы Рауса, тирозин, α-казеин). Впервые присутствие вирусной ДНК в клетках взрослых мышей установлено в 1974 году. Ретровирусные векторы могут служить альтернативой для эффективного транспорта генов у сельскохозяйственных животных. Инфекция зигот или предимплантационных эмбрионов в большинстве случаев приводит к получению трансгенных животных-мозаиков. Объяснением этому служить то, что интеграция происходит только в том случае, если клетка вступает в митоз после предварительной репликации ДНК. Все потомки, родившиеся из инфицированных ооцитов, были трансгенными {табл. 1). Не смотря на ограниченное число полученных трансгенных животных, были доказаны передача трансгена по наследству и экспрессия рекомбинантного продукта.

Эффективность получения трансгенного КРС с использованием ретровирусной инфекции ооцитов в метафазе II второго мейотического деления.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Показатели** | Число (n) | % |
| Инфицированные ооциты | 836 |  |
| Эмбрионы, развившиеся до бластоцисты | 174 | 21 |
| Пересаженные эбрионы | 10 |  |
| Живые потомки (% от пересаженных эмбрионов) | 4 | 40 |
| Трансгенные животные (% от родившихся потомков) | 4 | 100 |

Преимуществом использования ретровирусных векторов для получения трансгенных животных является то, что до 100% обработанных эмбрионов могут быть успешно инфицированы ретровирусами.

Недостатком применения ретровирусных векторов является их ограниченная емкость (размер вставки не должен превышать 8 тысяч п. н. Кроме того, в результате сплайсинга из ретровирусов вырезаются интроннные последовательности, которые как и другие дистальные или проксимальные последовательности играют важную роль в эффективной экспрессии генов у трансгенноых животных [Palmiter et ai, 1991]. К недостаткам использования ретровирусных векторов следует так же отнести подавление экспрессии трансгенов in vivo вследствие инактивации вирусных промоторов в клетках, например, посредством а- и у-интерферонов, действующих на вирусные LTR [Ghazizadeh et ai, 1997]. Однако данная проблема может быть решена посредством включения в ретровирусную конструкцию внутренних промоторов или использованием нового поколения ретровирусов, содержащих модифицированные участки контроля экспрессии, такие как внутренний рибосомный сайт (IRES) [Salen, 1997] и тетрациклиновая регуляторная система [lida et ai, 1996].

Еще одним ограничением использования ретровирусных векторов для получения трансгенных животных является их низкий титр. Обычные ретровирусные векторы имеют титр 1 х 105-6 колониеобразующих единиц (cfu) в мл [Kim et ai, 1993; Archer et ai, 1994]. Низкий титр ретровирусов ограничивает способы их введения в эмбрионы. Проблема низкого титра была недавно решена посредством разработки нового вектора на основе вируса везикулярного стоматита (псевдотип VSV-G) [Burns et ai, Yee et ai, 1994]. Известно, что тропизм ретровируса определяется геном env, поэтому его замена в векторе на ген env другого ретровируса может расширить спектр хозяев и изменить свойства ретровируса. Данная технология получила название псевдотипирования. Включение белка вируса везикулярного стоматита С в вектор на основе Мо – MLV (Burns et al,1994) позволило сделать его более стабильным при ультрацентрифугировании. Данный вектор может быть сконцентрирован до титра 1x109-10 КОЕ/мл и имеет очень широкий спектор клеток-хозяев. С его использованием были получены трансгеные лини клеток насекомых, млекопитающих, амфибий, рыб, а также созданы трансгенные животные. Высокий титр ретровируса сделал возможным получение трансгенных животных посредством инъекции содержащей вирусы среды в перивителиновое пространство [Chan et al, 1998)/ В ооцитах крупного рогатого скота объем перивителинового пространства составляет 200-300 пкл. При использовании вируса с титром 1\*10 9-10 КОЕ/мл, инъекция 10 пкл приводит к проникновению в перивителиальное пространство от 10 до 100 инфекционных вирусных частиц. Если титр вируса равен 1\*105-6 КОЕ/мл, то для введения в эмбрион одной вирусной частицы понадобилось не менее 1 нл раствора .

К недостаткам использования ретровирусов относится возможность клеточных онкогенов посредством вирусных транскрипционных последовательностей. Даже при применении ретровирусов, которые не могут существовать как инфекционные вирусные частицы, существует хотя и очень небольшой, но риск, что при рекомбинации с присутствующими в эмбрионах эндогенными ретровирусными последовательностями могут образовываться новые активные формы ретровирусов*.*

Не смотря на перечисленные недостатки и ограничения, ретровирусы могут быть широко использованы для трансгенеза в животноводстве. Успешное введение генетического материала в ооциты делает возможным проведение генной терапии наследственных заболеваний. Использование ретровирусных векторов позволяет осуществлять трансформацию отдельных органов. Так, Archer с соавторами [1994] ввели в молочную железу козы путем инфузии через сосковый канал в период гормонально индуцируемого маммогенеза ретровирус, кодирующий гормон роста человека (hGH). Лактация наступила на 14-ый день гормональной обработки. Максимальный уровень hGH (60 нг/мл) наблюдался в первый день лактации и затем опускался до 12 нг/мл на 9-12 дни лактации.

Аналогичные эксперименты с использованием экспрессионного вектора pLNS, полученного на основе Mo-MLV проводятся в отделе биотехнологии Всероссийского НИИ животноводства.

LTR – длинный концевой повтор , ψ+ - сигнал упаковки, Н4 – промотер гистона человека, NEO – ген устойчивости к неомицину,ЕР – делеция в области промотера-энхансера, рА – сигнал полиаденилирования Данный вектор содержит только цис-действующие последовательности генома вируса, необходимые для репликации. Последовательности вируса, кодирующие белки, исключены из векторной конструкции. Вектор содержит 5' длинный концевой повтор LTR, с которого происходит транскрпция, ψ+ область, ответственную за упаковку вирусного генома в вирион, ген устойчивости к неомицину, под контролем промотера Н4 гистона человека для селективного введения конструкции в клеточную линию и 3' LTR с делецией в области промотера-энхансера вируса. После одного цикла репликации делеция в области ЕР LTR будет присутствовать на обоих концах провируса, регуляторные элементы провируса будут полностью инактивированы и клонированные гены будут экспрессироваться только под контролем собственных промотеров.

Доказана возможность успешной инфекции альвеолярных клеток молочной железы свиней и коров рекомбинантными ретровирусами.*.*

Инфекция молочной железы не носит локального характера. Последовательности провируса помимо опытных долей вымени были выявлены в контрольных долях молочной железы, в слюнной железе, селезенке, поджелудочной железе, спинном мозге, надпочечниках. ИФА молока свиней выявил наличие рекобинантного продукта в количестве от 30 до 290 нг/мл.

Основными недостатками метода непосредственной инфекции отдельных органов животных является необходимость использования большой дозы ретровирусов с тем, чтобы инфицировать достаточное число клеток, а так же невозможность передачи трансгена по наследству следующему поколению животных. Однако в отличие от введения грансгенов в эмбриональные линии, данный подход позволит синтезировать рекомбинантные продукты в молоко уже через несколько месяцев после начала эксперимента. Для КРС по сравнению с традиционным методом микроинъекции затраты времени от начала эксперимента и до получения первых результатов об уровне экспрессии в молоке сокращаются, соответственно, с 4-5 лет до 4 5 месяцев.

**1.3 Метод пересадки ядер клеток, культивируемых in vitro**

Еще одним способом получения трансгенных млекопитающих является использование трансформированных генными конструкциями клеточных линий. С этой целью могут быть использованы как стволовые клеточные линии, так и соматические клетки, культивируемые in vitro. Впервые экспрессия генных конструкций в соматических тканях химерных мышей, полученных с использованием трансформированных клеток эмбриональной карциномы, была доказана Stewart с соавторами [1985]. Доля химерных мышей была очень высокой, причем часть из них передавала трансген по наследству. Однако в настоящее время наибольшее распространение для получения химерных животных получили эмбриональные стволовые клетки, ЭСК [Robertson et al., 1986]. Преимуществом получения трансгенных животных с помощью трансформированных стволовых клеток является возможность тестирования интеграции трансгена в культуре клеток. Это означает, что каждый эмбрион, развившийся в культуре после пересадки ядер, будет трансгенным и последующая селекция трансгенных эмбрионов не требуется. Кроме того, пересадка таких эмбрионов реципиентам приведет к рождению только трансгенного потомства. Использование для получения трансгенных животных трансформированных ЭСК делает возможным в ряде случаев проводить оценку экспрессии трансгенов, что имеет немаловажное значение. При микроинъекции трансгены наугад интегрируются в любую часть генома. Это означает, что они могут разрушать весьма существенные гены (инсерционные мутации) или размещаться в тех частях хромосомы, которые недоступны для транскрипции. Тестирование экспрессии в культуре сделает возможным использование для пересадки ядер, а следовательно и для получения трансгенных животных только тех клеточных линий, в которых трансгены являются транскрипционно и трансляционно активными. Кроме того, в отличие от метода пронуклеарной инъекции исследование ЭСК позволяет целенаправленно воздействовать на геном посредством генного хххххххххх

Сенсационное сообщение было опубликовано в 1996 году в Nature. Была продемонстрирована возможность получения жизнеспособных овец посредством пересадки ядер соматических клеток, культивируемых in vitro. Позже сообщили о получениитрансгенных овец посредством пересадки ядер стабильно трансформированных первичных фетальных фибробластов (Schnieke et al., 1997). Из шести полученных трансгенных ягнят пять оказалось жизнеспособными. Степень трансгенности при использовании данной, метода составляла 100%, в то время как применение метода микроинъекции в той же лаборатории позволяло получить лишь 4,35% трансгенных потомков от числа родившихся животных. Для получения одного трансгенного ягненка методом пересадки ядер требовалось 20,8 овец, в то время как при использовании метода пронуклеарной инъекции - 51,4 овцы [Schnieke et at., 1997]. Как и при использовании ЭСК, данный метод позволяет проводить анализ интеграции в культуре клеток, а также осуществлять целенаправленное встраивание генных конструкций в желаемые участки генома. Кроме того, используемые клеточные линии могут быть кариотипизированы в культуре, что позволит заранее предопределять пол трансгенных животных. После получения трансгенных животных из различных клеточных линий и определения уровня экспрессии может быть произведен отбор желательных клонов для их дальнейшего использования в пересадках ядер.

Схема получения трансгенных животных с использованием стабильно трансформированных клеток.

**1.4 Липосомы как переносчики ДНК**

Векторами для переноса генных конструкций в эмбриональные линии млекопитающих могут служить липосомы [Rottmann et al, 1985], однако опосредованный ими перенос генов не получили широкого распространения

**1.5 Использование половых клеток семенников (спермии и сперматогонии)**

Сперматозоиды являются природным вектором, доставляющим ДНК в клетку. Использование спермиев в качестве переносчиков одной ДНК рассматривается как один из перспективных методов генетической модификации животных. В опытах Lavitrano (1989) 30% мышей полученных после оплодотворения обработанной ДНК спермой, оказались трансгенными и передавали трансген по наследству.

Многочисленные попытки в других лабораториях неуспешными. Анализ 1300 мышей, родившихся in vitro обработанной ДНК спермой, не выявил трансген ни у одной из исследованных особей [Brinster, 1989), Недавнее исследования показали, что при применении метода переноса ДНК посредством сперматазоидов в одной и той же лаборатории дае пра использовании одинаковой схемы исследований могут быть получены противоречивые результаты [Maiore et al, 1998]. Это позволяет предположить, что встраивание ДНК происходит только на определенной стадии клеточного цикла. Однако до настоящего времени не установлен механизм интеграции экзогенной ДНК в геном сперматозоидов.

Huguet и Esponda [1998] исследовали способность сперматозоидов поглощать линейную ДНК in vitro и in vivo. В опытах in vitro отмытые придатковые сперматозоиды инкубировали 2 часа с линейной ДНК. ДНК инъецировали в проксимальную область семенных канальцев, после чего через 6 часов извлекали сперматозоиды. Присутствие чужеродной ДНК было показано у 60-70% сперматозоидов. Сперматозоиды способны поглощать ДНК, аккумулировать ее в ядре. Секркты придатков и семенных канальцев не блокируют этот процесс.

Для повышения эффективности связывания ДНК со сперматозоидами используют различные методы: ДНК-липосомные комплексы [Bachiller et al.. 1991], инъекцию в семенники [Sato et al.. 1994], непосредственную инъекцию в семенные канальцы [Kim et al.. 1997] и придатки [Huguet и Esponda, 1998], инъекцию в семенные канальцы с последующей электропорацией [Yamazaki et al.. 1998], ко-инъекцию головок спермиев и ДНК в ооциты [Perry et al. 1999]. Также было показано, что экзогенная ДНК может быть эффективно доставлена в ооциты микроинъецированными сперматозоидами.

Большое внимание в последнее время привлекают манипуляции со стволовыми клетками семенников-сперматогониями [Brinster, Nagano. 1998]. Была продемонстрирована возможность переноса сперматогониев от одного самца другому как у животных одного вида (Avarbock, 1994; Brinster и Zimmermann. 1994), так и между двумя видами.

После пересадки половых клеток из семенников самца мыши в семенники другого самца, до 80% потомства происходило из сперматозоидов самца-донора. Была доказана возможность успешного протекания сперматогенеза после пересадки криоконсервированных клеток семенника и после их длительного консервирования.пересадке в семенники мышей клеток из семенников поздних стадий сперматогенеза половых клеток доноров выявлено не было /Dobnnski et al., 1999].

Успешное длительное культивирование половых клеток животных in uru делает возможным проведение трансформации сперматогониев экзогенной ДНК с последующей селекцией. Nagano с соавторами /2000] сообщили об успешном введении экзогенной ДНК в сперматогонии т vitro и in vivo посредством ретровирусной системы доставки. Экспрессия ретровирусной генной конструкции, включающей lacZ, наблюдалась в семенниках более 6 месяцев. Анализ показал, что по крайней мере 1 из 300 стволовых клеток семенников содержали трансген.

В сочетании с пересадкой трансформированных половых клеток в семенники реципиентов и успешным протеканием сперматогенеза подход может быть использован для получения трансгенного потомства.

Не смотря на хорошие результаты в использовании сперматозоидов для получения трансгенных мышей, а так же отдельные успешные попытки получения трансгенных свиней и КРС [Gandolfl et al, 1989, Schelander et al, 1995, Sperandio et al, 1996], каких-либо значительных успехов в получении трансгенных сельскохозяйственных животных с помощью трансформированных сперматогониев и спермиев до настоящего времени достигнуто не было. Достижения в использовании трансгенных технологий.

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Год** | Событие | Автор |
| 1971 | Доставка чужеродной ДНК в ооциты кролика сперматозоидами | Bracket |
| 1974 | Получение трансгенных мышей с помощью вирусных векторов | Jaenish, Mintz |
| 1976 | Передача трансгена по наследству | Jaenish |
| 1980 | Получение трансгенных мышей микроинъекцией | Gordon |
| 1981 | Получение стволовых клеток | Ewans, Kaufman, Martin |
| 1984 | Эмбриональные химеры из клеток тератокарциномы | Bradley |
| 1985 | Получение трансгенных сельскохозяйственных животных | Brem, Hammer |
| 1986 | Эмбриональные химеры с использованием ЭСК  Получение овец посредством пересадки ядер | Gossler,  Willadsen |
| 1987 | Гомологичная рекомбинация в ЭСК  Получение КРС методом пересадки ядер | Thomas, Capeccha  Brather |

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 1988 | Получение кроликов методом пересадки ядер | Slice и Robl |
| 1989 | Генный таргетинг у мышей  Получение трансгенных мышей и свиней с помощью спермиев в качестве векторов Получение трансгенного КРС методом микроинъекции  Получение свиней методом пересадки ядер | Thompson el al.,  Lavitrano el at.,Gandolfi et al.  Roschlau el al., Prather et al., |
| 1995 | Получение трансгенного КРС с помощью спермиев | Schelander et al |
| 1996 | Получение овец методом пересадки ядер культивируемых эмбриональных клеток  Получение ЭСК приматов | Campbell  Thomson |
| 1997 | Получение овец методом пересадки ядер фетальных клеток и соматических клеток взрослого животного  Получение трансгенных овец методом пересадки ядер трансформированных культивируемых клеток  Получение химерных трансгенных свиней, с использованием ПЗК | Wilmutetal,  Schnieke  Piedrahita |
| 1998 | Получение трансгенного КРС методом пересадки ядер трансформированных фетальных фибробластов  Получение трансгенного КРС с использованием псевдотипных ретровирусных векторов Получение ЭСК из бластоцист человека Получение мышей методом инъекции в цитоплазму ядер кумулюсных клеток  Получение КРС методом пересадки ядер дифференцированных клеток | Cibelli  Chan  Thomson  Wakayama  Kato |
| 1999 | Получение трансгенных мышей методом коинъекции ооцитов спермиями и экзогенной ДНК | Perry |
| 2000 | Получение свиней методом пересадки ядер соматических клеток (клетки гранулезы) | Polejaeva |

**2. ФАКТОРЫ ПОВЫШЕНИЯ ЭКСПРЕССИИ ТРАНСГЕНОВ В ОРГАНИЗМЕ ЖИВОТНЫХ**

Наряду с низкой эффективностью большинства методов трансгенеза основным лимитирующим фактором получения трансгенных является случайный характер интеграции трансгена в геном. На экспрессию трансгена в организме животных оказывают влияние последовательности, прилегающие кв участку интеграции, что является причиной большой вариабельности уровня экспрессии. Уровень синтеза трангенного продукта может варьировать у различных животных от эктопного до слабого или даже находится ниже порога детекции.

Влияние участка интеграции на уровень и характер экспрессии объясняется так называемым позиционным эффектом [Wilson era/., 1990, Sippel et al., 1997). Кроме того, ограниченные знания регуляторных последовательностей большинства генов приводят к использованию зачастую полностью не охарактеризованных геномных фрагментов, что и является причиной низкой эффективности экспрессии в экспериментах по переносу генов [Palmlter, Brinster, 1986].

Для того чтобы преодолеть позиционный эффект и таким образом увеличить вероятность оптимальной экспрессии трансгенов, интегированных в случайной локализации, был применен целый ряд различных стратегий*.*

Первым таким подходом, позволившим увеличить уровень экспрессии, являлось введение в генные конструкции гомологичных интронных последовательностей.

Положительное влияние на уровень экспрессии трансгенов оказывало введение в генные конструкции S/MAR-элементов

Наиболее удачным решением проблемы преодоления позиционного эффекта явилось интеграция в определенный участок генома посредством гомологичной рекомбинации в эмбриональных стволовых клетках, так как это обеспечивает контроль трансгенной конструкции всеми регуляторными последовательностями, присутствующими в выбранном эндогенном локусе. Оптимальная локализация трансгенов в геноме клетки хозяина может быть выбрана исходя из уровня и характера экспрессии экспериментального трансгена. Еще одним подходом, позволившим дайной интеграции трансгена в геном хозяина является включение в генные конструкции всех регуляторных элементов, ответственных за его экспрессию. Стандартные плазмидные, космидные или фаговые векторы в большинстве случаев не могут быть использованы, вследствие их ограниченной емкости. Данная стратегия может быть использована с применением векторов типа искусственных хромосом, обладающих повышенной клонирующей способностью.

Наиболее широкое применение для получения трансгенных животных нашли векторные системы на основе YAC (обзоры Montoliuetal. 1993, Jakobovits, 1994, Peterson, 1997, Peterson etal 1997) YAC- эукариотические клонирующие векторы, способные к стабильному сохранению геномных фрагментов ДНК длиной более 1 миллиона п.о. [Burke., 1987]. Они представляют собой линейные фрагменты ДНК, содержащие все необходимые элементы для их сохранения в клетках дрожжей в виде искусственных хромосом. Первые результаты успешного использования YACs в экспериментах по трансгенезу на мышах были получены в 1993 году [Jakobovits et a/., 1993, Schedl et a/., 1993, Strauss etal., 1993].

Для введения YACs в эмбрионы мышей нашли применение три различных подхода: пронуклеарная микроинъекция очищенной в геле YAC-ДНК [Schedl et a/., 1993], липофекция YAC-ДНК в эмбриональные стволовые клетки [Strauss et a/., 1993] и слияние дрожжевого сферобласта с эмбриональными стволовыми клетками [AtoboWte ef a/., 1993). Исследование экспрессии YACs у различных линий трансгенных мышей выявило зависимость уровня экспрессии от числа копии трансгена. С другой стороны, уровень экспрессии не зависел от позиционного эффекта

В то время, как YAC-технологии широко используются для получения трансгенных мышей [обзоры Peterson et al., 1997, Giraldo and Montoliu, 2001) Несколько исселдователай сообщили об успешном создании YAC-трансгенных сельскохозяйственных животных. Были получены свиньи и крысы посредством ксенотрансплатации и направленной экспрессией рекомбинантных генов в молоко трансгенных животных.

Результаты получения трансгенных животных с использованием YAC.

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| **Вид животных** | Трансген | Размер | Цель | Авторы |
| кролик | Тирозиназа мыши | 250 | Идентификация  регуляторных  последовательностей | Montoliu, 1996  Brem, 1996 |
| Кролик | Аполипопротеин человека | 108 | Анализ структуры | Rouy, 1998 |
| Свинья | MCP, CD59, CD46 человека | 420 | Ксенотрансплантация | Yanoutsos,  Langford, 1996 |

что число молекул YAC, микроинъецируемых в пронуклеус зигот значительно меньше, чем при использовании плазмидных конструкций (это обусловлено большим размером YAC), общая эффективность получения трансгенных сельскохозяйственных животных с использованием векторов на основе УАС практически не отличается от результатов, полученных с использованием стандартных генных конструкций. Так, Brem с соавторами [1996\, используя концентрации YAC-ДНК 1-4 нг/мкл, получили 7,4% трансгенных кроликов, что соответствовало общей эффективности 0,74%. Roue с соавторами инъецировали в пронуклеус зигот кроликов раствор YAC в концентрации 1 нг/мкл и достигли степени интеграции 11,8% при общей эффективности 0,71%. Таким образом, размер инъецируемой ДНК не оказывал существенного влияния на эффективность получения трансгенных животных.

Было установлено, что при микроинъекции YAC в пронуклеос зигот животных часто происходит интеграция в геном только части молекулы. Причиной может быть механическое повреждение молекул ДНК большой длины в ходе приготовления раствора ДНК и микроинъекции в пронуклеос. Чтобы прекратить повреждение добавляют полиамины, которые формируют комплексы с ДНК и стабилизируют ее посредством образования компактных структур.

Не смотря на огромные преимущества векторов на основе YAC , они имеют ряд недостатков, выражающихся в определенных трудностях лри создании и подготовке YAC-конструкций. К ним относятся химеризм инсерции (более 50% клонов в YAC библиотеке), нестабильность инсерции, перестройки и потенциальная контаминация эндогенными дрожжевыми хромосомами, что затрудняет их эффективную очистку. С целью исключения таких проблем были созданы другие типы векторов на основе искусственных хромосом, такие как клоны Р1-фага, BAC – "bacterial artificial chromosome", PAC – "P1 bakteriophage-derived artificial chromosome"*.*

Клонирующая система бактериофага Р1 может эффективно сохранять инсерции гетерологичной ДНК размером 70-100 т.п.о. [Stemberg, 1999].

Наряду с YACs BACs используются для выполнения широкого спектра фундаментальных исследований, включающего изучение мутаций, исследование функции и действия генов in vivo, идентификация и анализ регулярных последовательностей, находящихся на значительном удалении от структурного гена. Потенциальные возможности BACs нашли также применение для повышенной экспрессии рекомбинантных белков в молочной железе трансгенных животных [Stinnakre et al., 1999, Zuelke, 1998].

**3. ПЕРСПЕКТИВЫ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ РАБОТ В ЖИВОТНОВОДСТВЕ**

Развитие биотехнологии сельскохозяйственных животных, в том числе генная инженерия, открывает новые возможности развития животноводства. Уже имеющиеся результаты по получению трансгенных животных говорят о возможности изменения ряда важнейших хозяйственно-ценных признаков. Например, трансгенные животные (свиньи, куры, кролики) с геном гормона роста при равных условиях характеризуются повышенными темпами роста.

Другим важнейшим направлением генной инженерии является получение трансгенных особей с интегрированными в геном генными конструкциями, связанными с усилением иммунитета животных к инфекционным заболеваниям.

Третьим актуальным направлением генной инженерии животныж является получение животных продуцентов биологически активных веществ, необходимых в медицине, ветеринарии и технологии переработки продуктов животноводства. Многие биологически активные вещества не могут производиться традиционными методами в достаточных количествах и с желательным качеством. Существует огромный коммерческий интерес к производству этих белков. В сыроделии существует значительный дефицит молокосвертывающих энзимов, в частности, химозина, необходимого для получения высококачественных твердых сортов сыра. Первым экземпляром трангенного животного стала мышь, размерами вдвое превосходящая обычную особь в нее был введен ген, синтезирующий гормон роста крысы. И ученых сразу заинтересовала возможность трансгенеза у сельскохозяйственных животных. Направление, связанное с получением из трансгенных сельских животных человеческих белков уже приближается к стадии коммерциализации. Ученые небезуспешно пытаются синтезировать человеческие белки в бактериях и дрожжах. Но это дорого и технически сложно: из бактериальных культур не всегда удается выделить чистый белок. К тому же некоторые белки невозможно получить в бактериях в силу громоздкости генов, определяющих их синтез. Биореактор в виде коровы или овцы лишен этих недостатков, и он гораздо производительнее, а конечный продукт (белок) получается в десятки раз дешевле. Но началось все опять-таки с мыши. В 1987 году в США вывели трансгенных мышей, в молоке которых содержался тканевый плазмино-генный активатор, способствующий рассасыванию тромбов в человеческих сосудах. После этого успеха направление заинтересовало крупный капитал (рынок лекарственных белков оценивается приблизительно в 10 млрд. долларов), и в надежде на эффективность новой технологии на будущем рынке начали внедряться биотехнологические гиганты, активно инвестируя в НИОКР. За неполные десять лет, прошедшие с американского достижения, от трансгенных коз, овец, свиней, кроликов и даже коров было получено семнадцать лекарственных белков. Причем десять из этих белков выделялись с молоком в приличной концентрации - около одного грамма на литр молока. Это большое количество, поскольку для курса лечения некоторых болезней требуется всего несколько миллиграммов. А сейчас таким способом научились синтезировать гораздо больше белков. Как минимум три препарата, полученных от трансгенных животных, проходят сегодня последние клинические испытания.

Наиболее интересным является использование молочной железы как продуцирующего органа, т. к. в этом случае жидкость, содержащую рекомбинантные протеины, можно легко извлечь. Кроме того, молочная железа физиологически обладает огромным потенциалом синтеза протеинов. Принципиальная возможность специфической экспрессии трансгенов протеина молока и чужеродных протеинов в молочной железе была продемонстрирована в экспериментах на мышах, кроликах, свиньях, овцах, козах. Среди сельскохозяйственных животных получение и использование трансгенных мелких жвачных значительно дешевле (на единицу биологической продукции), чем коров, т. к. овцы и козы обладают коротким репродуктивным периодом и в случае интенсивной экспрессии соответствующего гена сразу же открывается возможность быстрого размножения трансгенных животных, создание промышленного стада продуцентов и перманентных линий трансгенных животных, экспресси-рующих желаемые протеины. При получении трансгенных животных исследователи стремятся к тому, чтобы все соматические клетки (полная трансгенность) и, в особенности, генеративные клетки, содержали генную конструкцию. В этих случаях интеграция рекомбинантной ДНК приводит к полной трансгенности и при условии достаточной экспрессии обусловливает изменение фенотипа животных и передачу этого признака потомству. Основным способом получения трансгенных животных на сегодняшний день остается микроинъекция рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус ранних зигот. Поэтому микроинъекцию генов осуществляют на максимально ранних этапах развития животного: в большинстве случаев на стадии оплодотворенной яйцеклетки или двуклеточных эмбрионов. Уже имеются трансгенные по гену химозина кролики с промотором казеина крупного рогатого скота, в молоке которых отмечен высокий уровень химозина и доказана его высокая активность. У некоторых кроликов в 1л молока содержится до 1500 мг химозина, а за лактацию от одного кролика можно получить такое количество химозина, которое способно переработать до 10000 кг коровьего молока. Если учесть, что для свертывания 1 тонны молока при производстве сыра требуется 1 г химозина, то для производства сыра в России потребуется лишь 300 кг химозина. Для этого необходимо иметь «биотехнологическую» или «генную» ферму на 5 - 6 коров или 300 овец. Следует подчеркнуть, что главным критерием при выборе подходящего вида животных для «генных» ферм в большинстве случаев должен быть необходимый объем производства. Для производства протеинов в молочной железе в масштабах тонн целесообразно использовать коров, в сотнях килограммов — овец и коз, а в килограммах — кроликов (Brinster е.а.,1985).

В настоящее время разрабатываются и апробируются системы организации и функционирования биологических предприятий на племенных фермах, использующих трансгенных овец или коз. Основная и наиболее трудоемкая работа- создание первичных трансгенов с хорошей продукцией (экспрессией ) белка интереса или т.н. «генных ферм». Для достижения этой цели, особенно в молочном козоводстве, затрачены большие материальные и интеллектуальные ресурсы, однако говорить о развитой и действующей биоиндустрии на основе трансгенных овец и коз, особенно в нашей стране, преждевременно. Связано это в первую очередь с тем, что метод микроинъекций в пронуклеус не стопроцентный. Часто случается, что генная конструкция может вообще не встроиться в геном животного, а если и встроится, то может оказаться не во всех клетках. Из трансплантированных яйцеклеток с генной конструкцией прижиться может лишь пятая часть, а встроиться в нужный участок генома - 1-2%. Большого искусства требует и трансплантация зиготы в половые пути самки. Другая проблема - поиск и выделение наиболее эффективных генных конструкции. Проводятся интенсивные опыты с различными животными, с целью получения такой экспрессии белка, которая была бы наиболее экономически выгодной. Сейчас биотехнологи Института биологии гена и МГУ создают конструкцию, которая будет содержать ген, определяющий синтез лактоферрина (белка, отвечающего в женском молоке за иммунитет новорожденного). Сложность заключается в том, чтобы подобрать к этому гену такой промотор, который не просто заставит его работать в ткани молочной железы, а работать эффективно, то есть вызывать наибольший уровень экспрессии нужного белка. Как правило, первые опыты обычно проводятся с мышами. В отличие от крупных животных их проще и дешевле содержать, они быстро доходят до половозрелого возраста, поэтому меньше времени уходит на получение и размножение трансгенных особей для последующего их изучения. Далее наблюдают, какие яйцеклетки прижились, в каких животных генная конструкция встроилась в активную часть генома. В лучшем случае из ста яйцеклеток может получиться один-два трансгена (Эрнст Л.К., 1993, Clark A.J. е.а., 1989, Pursel V.G. е.а., 1990, Wilmut I.e.a.,1991). Как только в мышином молоке появится желаемый уровень лактоферрина, можно будет переходить на продуктивных сельскохозяйственных животных, в частности, коз. Коза не так плодовита, как мыши, и может родить двух, в лучшем случае трех козлят, поэтому коз в эксперименте должно быть много.

В то же время у козы, как биологического объекта для генно-инженерных работ, имеется немало преимуществ. На килограмм живой массы коза дает в 2-3 раза больше молока, чем корова, ее репродуктивный цикл практически вдвое короче, и, наконец, она менее прихотлива и более устойчива. И все же наиболее важная проблема - доставка генной конструкции не просто в ядро яйцеклетки, а в нужную хромосому. По мнению многих специалистов, требующие тонкой и точной работы микроинъекции генов в зиготу могут быть заменены в недалеком будущем более эффективной и тиражируемой технологией. И, судя по публикациям, ученые приближаются к решению этой задачи. Пока же более эффективным методом, чем микроинъекции гена в зиготу, представляется метод клонирования той клетки, которая была отобрана в результате многочисленных опытов в лабораторных условиях. Потомство, родившееся с применением такой технологии, будет стопроцентно трансгенным. Впрочем, эта технология только разрабатывается, ее механизм еще не отработан. Можно только с достаточной уверенностью предположить, что уже в ближайшее десятилетие технология клонирования может стать превалирующей

В заключение хотелось бы подчеркнуть, что, разработка теории трансгенеза сельскохозяйственных животных и поиски путей практического использования этого метода идут параллельно, в связи с чем получение как положительных так и отрицательных результатов вполне возможно. Последнее десятилетие XX века знаменательно глубоким интегрированием биотехнологии и молекулярной генетики в современную зоотехнию и в практику селекционно-племенной работы. Это взаимодействие начинается с планирования генных конструкций, которое базируется на фундаментальных данных об обменных процессах, происходящих в организме животных и знании основных генетических закономерностей, управляющих формированием их продуктивности и заканчивается объективной оценкой эффекта интеграции в геном животных чужеродного гена. Очевидно также, что возможность получения трансгенных сельскохозяйственных животных реализовалась в результате развития метода трансплантации эмбрионов, что само по себе является серьезным достижением зоотехнической науки. Как и следовало ожидать, интеграция в геном животных чужеродных генов, вне зависимости от того, аналогичны они уже имеющимся, или являются новыми, затрагивающими жизненно важные функции организма, вызывает при активной их экспрессии нарушение физиологического гомеостаза как на клеточном так и на организменном уровнях. При переходе порога внутренних возможностей коррекции усиленного генно-инженерным путем признака метаболическими системами животных наступало развитие различных патологических изменений, в том числе и прогрессирующих, приводящих к сокращению продолжительности жизни трансгенных животных, нарушению их воспроизводительной функции (Эрнст Л.К. и соавт.,1993). Для решения задачи генно-инженерного изменения количественных признаков животных, имеющих полигенную природу, очевидно, потребуется получение политрансгенных сельскохозяйственных животных только вследствие технических причин (поскольку для этого, возможно, потребуется осуществление многоступенчатого трансгенеза), но и из-за невозможности клонировать еще неизвестные гены. В связи с этим основной интерес большинства исследователей связан сейчас с генами, работа которых определяет относительно независимые морфофункциональные признаки животного (информационный генетический иммунитет, продукция белков животных и человека). Не исключено, однако, что на этом пути может быть получено положительное изменение каких-либо других хозяйственно-полезных признаков животных, определяемых единичными генами животных.

Таким образом, успехи в области молекулярной генетики и биологии гена должны обеспечить дальнейший прогресс в проблеме трансгенеза сельскохозяйственных животных, а, следовательно, в повышении эффективности и рентабельности производства многообразной животноводческой продукции.