

На правах рукописи

КОЗИКОВА ЛАРИСА ВАСИЛЬЕВНА

**СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ
ХРОМОСОМ И ИЗМЕНЕНИЕ ГЕНОМА У ТРАНСГЕННЫХ
СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ**

Специальность 03.00.15-генетика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
доктора биологических наук

Санкт-Петербург
2005

Работа выполнена в лаборатории молекулярной цитогенетики Государственного научного учреждения Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных Российской академии сельскохозяйственных наук

Научный консультант: член-корреспондент РАСХН, профессор,
доктор биологических наук,
заслуженный деятель науки РФ
А.Ф.Яковлев (ГНУ ВНИИГРЖ РАСХН)

Официальные опоненты: доктор биологических наук, профессор
Т.И. Кузьмина (ГНУ ВНИИГРЖ РАСХН)

доктор биологических наук, профессор,
заслуженный деятель науки РФ
А.И. Жигачев (СПбГАВМ)

доктор биологических наук
Т.В. Кузнецова (ГУ НИИАГ им. Д.О.Отта РАН)

Ведущее учреждение: Институт цитологии РАН

Защита состоится « **3** » мая 2005 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 006.012.01 по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора биологических наук при ГНУ Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных по адресу: 196601, Санкт-Петербург-Пушкин, Московское шоссе 55-а.
Факс: (812) 465 99 89

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНУ ВНИИГРЖ РАСХН

Автореферат разослан « **24** » марта 2005 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор биологических наук



Г.Н. Сердюк

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Исследования по теме диссертации проводили в рамках федеральной целевой программы фундаментальных и прикладных исследований по научному обеспечению развития агропромышленного комплекса Российской Федерации. Государственный регистрационный номер НИР 01.200.118849.

1.1. **Актуальность** проблемы. Организация ядра является эволюционно консервативной и отражает структурно-функциональную организацию генома. На последней 15-й международной конференции по изучению хромосом (5- 10 сентября 2004 г., Лондон) были отмечены следующие основные области применения онтогенетических исследований: 1. Выявление линейной дифференцированности хромосом для более точного определения хромосомных перестроек; 2. Взаимосвязь aberrаций хромосом и некоторых заболеваний; 3. Соединение методов молекулярной биологии и цитогенетики с применением FISH. 4. Развитие методов хромосомной инженерии, введение в геном генов и хромосом в сочетании с методами цитогенетики, которые находят применение в области генотерапии, функциональной геномики (Griffin, Bridger, 2004).

Одной из основных функций хромосом является репродукция, которая осуществляется по длине хромосомы и находится в тесной связи с конденсацией и генетической активностью. В метафазной хромосоме эти зоны репликации разграничены во времени и пространстве. Стабильность репликационной структуры и ее специфичность для каждой хромосомы указывает на высокую упорядоченность укладки хромосомной нити в метафазной хромосоме, строго воспроизводящуюся в ряду клеточных поколений (Захаров и др., 1982).

Последние два десятилетия характеризуются значительными успехами в области направленной генетической трансформации клеток и животных. Ценность таких опытов заключается в возможности получения трансгенных животных с измененным генотипом и фенотипом, а также передачи трансформированных признаков потомкам. К настоящему времени получены трансгенные животные с повышенными темпами роста, измененным количеством и качеством молока, шерсти, увеличенной плодовитостью. Создаются животные, которые могут быть источниками органов для ксенотрансплантации, производства ценных биологически активных препаратов, таких как гемоглобин, фактор свертываемости крови, альфа-антитрипсин, интерферон и др. (Андреева, Тарантул, 2003; Зиновьева, Эрнст, 2004; Cozzi et al., 2000). Трансгенные организмы оказались ценной, перспективной моделью для изучения различных аспектов теоретической и прикладной биологии.

В многочисленных публикациях по трансгеннозу не уделяется достаточного внимания видовым особенностям раннего эмбриогенеза, последствиям микроинъекции генов в зиготы с изучением дестабилизации реципиентного генома. Актуальность проблемы генетической трансформации

животных, а также недостаточная изученность структурно-функциональной организации генома сельскохозяйственных животных и влияния различных факторов на эффективность трансгеноза определили цели и задачи данного исследования.

1.2. Цель работы и задачи исследования. Целью исследования являлось изучение структурно-функциональной организации хромосом у интактных животных, а также у эмбрионов и животных после введения генов соматотропной оси в зиготы разных видов сельскохозяйственных животных.

В этой связи в настоящей работе были поставлены следующие задачи:

- провести морфометрический анализ и определить уровень спонтанных aberrаций хромосом в эмбрионах кур в норме и при использовании криоконсервированного семени;
- охарактеризовать структурную дифференцированность хромосом кур;
- выявить характер включения ^3H -тимидина в макрохромосомы и микрохромосомы кур с учетом внутри- и межхромосомной асинхронности репликации ДНК;
- показать взаимосвязь линейной структуры хромосом с внутрихромосомной асинхронностью репликации ДНК на примере 1-й аутосомы кур;
- охарактеризовать репликационную активность генома кролика и ее взаимосвязь с процессом конденсации методом RBA-маркирования;
- изучить первый раунд репликации ДНК в пронуклеусах кролика;
- получить трансгенных кроликов и свиней с введенными генами соматотропной оси с учетом анализа интеграции генов, фенотипических показателей, характера наследования трансгенов;
- изучить уровень дестабилизации генома кроликов и свиней, полученных из эмбрионов, в которые микроинъектировали ген релизинг фактора гормона роста (hGRF);
- исследовать экспрессию репортерных генов у предимплантационных зародышей сельскохозяйственных животных.

1.3. Научная новизна. Впервые детально выявлены скорость и порядок репликации ДНК хромосом кур в течение всего S - периода с регистрацией характера включения ^3H -тимидина через каждый час, что позволило определить относительное содержание ДНК в макрохромосомах (73.7%) и микрохромосомах (26.3%). Репродукция макро- и микрохромосом идет на протяжении всего S-периода, но с преимущественным синтезом ДНК микрохромосом в первой его половине, за исключением W-хромосомы, которая репродуцируется в конце S-фазы. Синтез ДНК в ZZ-хромосомах проходит синхронно в течение всего S-периода. На основе нормализации денситометрических профилей впервые проведено картирование G-полос первой пары аутосом кур с количественной характеристикой длины, локализации и интенсивности окрашивания этих полос. При сопоставлении G-полос с локализацией зерен серебра по длине 1-й хромосомы в начале S-фазы метка преимущественно локализуется в светлоокрашенных зонах, в конце периода синтеза ДНК характер распределения зерен серебра по длине аутосомы

полностью совпадает с локализацией темных G-полос. На примере сравнительного анализа RBA-окрашенных хромосом показана взаимосвязь процессов репликации и конденсации хромосом кролика, находящихся на разных уровнях конденсации.

Получены трансгенные кролики и свиньи с интеграцией векторных последовательностей и полноценных копий гена рилизинг фактора гормона роста человека (hGRF) и гормона роста быка (bGH), под контролем промотора металлотиионеина мыши (MT-1). Выявлено два ярко выраженных фенотипических эффекта: увеличение и уменьшение массы тела по сравнению со своими сверстниками. Трансгенные потомки первого поколения наследовали способность к замедленному или ускоренному росту. У трансгенных кроликов и свиней наблюдали снижение либидо у самцов, повышенную эмбриональную и постнатальную смертность.

Впервые количественно определена степень дестабилизации генома при воздействии чужеродных генов (частота микроядер и множественные ассоциации хромосом) у животных, полученных из зигот с введенными экзогенными генами.

1.4. Теоретическая и практическая ценность работы. Теоретическая значимость представленной работы заключается в получении достаточно полной картины репродукции хромосом кур в течение всего S-периода. Скорость синтеза ДНК макрохромосом и микрохромосом кур в S-фазе изменяется в узких пределах с перепадом около 12%. Интенсивность репликационных процессов значительно (на три четверти) снижается в конце S-фазы. Показана низкая индивидуальная изменчивость скорости синтеза ДНК в макрохромосомах. Подтверждена связь внутрихромосомной асинхронности репликации ДНК со структурной (блочной) дифференцированностью и процессом конденсации хромосом. На одноклеточной эмбриональной стадии вскрыта взаимозависимость асинхронного синтеза ДНК в пронуклеусах и морфологических изменений в процессе их роста, выявлены два типа хроматина, отличающихся по времени репликации ДНК.

При введении генов соматотропной оси в зиготы и ранние эмбрионы кроликов и свиней получена устойчивая интеграция экзогенного материала в геноме реципиентов с появлением новых фенотипических признаков, наследуемых в ряду поколений. Трансгенные кролики передавали ген рилизинг фактора гормона роста потомству первого поколения с частотой 50%.

Практическая значимость диссертационной работы состоит в совершенствовании приемов приготовления препаратов хромосом из тканей ранних эмбрионов кур и количественной оценки результатов дифференциального окрашивания, которые необходимы для проведения цитогенетического контроля племенных животных, линий и пород, ветеринарной цитогенетики и картирования хромосом.

Приемы использования репортерных генов для отбора трансгенных эмбрионов и введение MAR-последовательностей значительно повышают эффективность получения трансгенных животных.

Применение методов определения частоты микроядер и ассоциаций хромосом позволяет судить о степени дестабилизации генома животных с перенесенными генами.

1.5. Апробация работы. Материалы исследований были представлены и обсуждены на 45 российских и международных научных конференциях и симпозиумах, в том числе основных: на IV и VII всесоюзных симпозиумах по структуре и функции ядра (Алма-Ата, 1977; Харьков, 1980); III и IV всесоюзных общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) им. Н.И. Вавилова (Ленинград, 1977; Кишинев, 1981); XXXIII и XXXXXIII Европейских ассоциациях животноводства (Ленинград, 1982, Египет, Каир, 2002); III и IV национальных конференциях Болгарии по цитогенетике (Пловдив, 1984; Враца, 1989); I всесоюзной конференции по цитогенетике сельскохозяйственных животных (Москва, 1985); VI и VIII интернациональных симпозиумах по актуальным проблемам генетики птиц (Чехословакия, Смоленицы, 1985, 1989); V франко-чехословацком заседании по теме «от ооцита к эмбриону» (Прага, 1990); XV и XVI симпозиумах генетических дней Чехословакии (Чешские Будеевицы, 1991, 1992); XVI симпозиуме по генетике сельскохозяйственных животных Словакии (Нитра, 1993); международной конференции общества генетиков им. Г. Менделя, посвященной 40-ю двойной спирали ДНК (Чешская республика, Брно, 1993); X интернациональном симпозиуме по актуальным проблемам генетики птиц (Словакия, Нитра, 1993); I, II и III всероссийских общества генетиков и селекционеров (ВОГИС) им. Н.И. Вавилова (Саратов, 1994; С.-Петербург, 2000; Москва, 2004); международном симпозиуме «Молекулярная генетика и биотехнология в оценке изменения геномов сельскохозяйственных животных» (С.-Петербург, 1994); XIII симпозиуме Польского общества генетиков (Варшава); XXV заседании FEBS (Копенгаген, 1998); первом Польском конгрессе по биотехнологии (Вроцлав, 1999); международном совещании «Молекулярные фермы» (Франция, Ля Гранд Мотте, 2000); I международном конгрессе по биотехнологии (Москва, 2002); международном симпозиуме «Дни польской науки в России» (С.-Петербург, 2002); международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология» (Минск, 2004); международной конференции «Сохранение генетических ресурсов» (С.-Петербург, 2004).

1.6. Публикации. По материалам диссертации опубликовано 114 научных работ, среди которых основных – 70, в том числе три методических рекомендации. Работы опубликованы в материалах международных конференций и журналах: «Генетика», «Зоотехния», «Цитология», «Цитология и генетика», «Сельскохозяйственная биология», «J. Animal Feed Sci.», «Animal Science Papers and Reports», «Folia Biologia», «J. of Reproduction and Fertility», «Сб. науч. трудов «Генноинженерные сельскохозяйственные животные» (Министерство науки и технической политики Российской Федерации РАСХН).

1.7. Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и их

обсуждения, заключения, выводов, практических предложений и списка цитированной литературы из 378 источников, среди которых 298 на иностранных языках. Диссертация изложена на 321 страницах, содержит 36 таблиц, 57 рисунков.

1.8. Основные положения, выносимые на защиту.

- Морфологический и морфометрический анализ хромосом сельскохозяйственных животных с получением и анализом денситометрических профилей G-полос метафазных пластинок с различной степенью конденсации;
- Идентификация сходных по морфологии хромосом кроликов методом RBA-маркирования с представлением взаимоотношения процессов репликации и конденсации;
- Взаимосвязь процесса репликации ДНК на протяжении S-периода со структурной организацией хромосомы;
- Введение и интеграция генов соматотропной оси в геном сельскохозяйственных животных, фенотипические показатели трансгенных животных и характер их наследования;
- Особенности уровня стабильности генома кроликов и свиней, полученных из зигот с введенными генами рилизинг фактора гормона роста человека;
- Выявление паттерна экспрессии чужеродных генов и активации эмбрионального генома с использованием репортерных генов.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Эксперименты проводили на базе лаборатории молекулярной цитогенетики, а также на основании договоров, составленных между ВНИИГРЖ и следующими институтами: Киргизским институтом животноводства (г. Бишкек); Институтом генетики и разведения животных Польской академии наук (Ястжембец); Международной лаборатории по биотехнологии на базе института животноводства в Словакии (г. Нитра).

Исследования выполняли на цыплятах и эмбрионах породы белый плимутрок, свободно скрещивающейся популяции из экспериментального хозяйства ВНИИГРЖ; на кроликах возраста от 0,5 до 1 года пород шиншилла, калифорнийская, новозеландская; на свиноматках (крупная белая и словацкая белая мясная) в возрасте старше 8 месяцев и живой массой не менее 80 кг.

Препараты митотических хромосом получали из эмбриональных фибробластов, клеток костного мозга (Трофимова, 1976), и клеток периферической крови (модифицированный метод Moorhead et al., 1960).

При использовании метода авторадииографии ³H-тимидин (удельная активность 19,8 К/мМоль) вводили суточным цыплятам интраперитонеально из расчета 1мккюри на грамм веса, часть препаратов окрашивали по Гимза, проводили анализ, затем краску удаляли в 70% -м растворе спирта и наносили эмульсию типа "М" (НИИХИМФОТО).

Для получения G-полос на хромосомах кур и свиней был использован модифицированный метод Соколовой О.И. и Погосьянц Е.Е. (1974).

RBA- окраску (R-репликационный бэндинг, В-5-бромдезоксигидроксиурин, А-окраска акридиновым оранжевым) хромосом кролика получали по методу Dutrillaux, Lejeune, (1973).

Оптическую плотность негативных изображений хромосом измеряли с помощью денситометрического комплекса для исследования криволинейных биоструктур, сконструированного и изготовленного Центральным конструкторским бюро АМН СССР (Инин и др., 1976). Приведение денситометрических профилей хромосом с различной степенью конденсации к одному масштабу и выведение нормализованных денситограмм на печать проводили по алгоритмам и программам, разработанным в нашей лаборатории (Яковлев, Березкин, 1978). Статистическую обработку проводили по Стьюдену и Фишеру (Лакин, 1980).

Раскладку кариотипа кролика проводили в соответствии с международными стандартами (Committee for the Standardized Karyotype of the Rabbit (*Oryctolagus cuniculus*, 1981). Идентифицировали хромосомы свиней согласно рекомендациям Комитета по стандартизации кариотипа домашних свиней (Committee for the Standardized Karyotype of the Domestic Pig, 1988).

Трансгенных кроликов и свиней получали методом микроинъекции генов соматотропной оси преимущественно в мужской пронуклеус зигот (Gordon, 1983). Для микроинъекции использовали следующие генетические конструкции: 1. Ген рилизинг фактора гормона роста человека (hGRF), находящийся под контролем промотора гена металлотионеина мыши (MT-1). Генноинженерная конструкция MT-1/hGRF была сконструирована Dr. Mayo (Mayo et al., 1983) и предоставлена проф. А.Ф. Смирновым (ВНИИРГЖ, С.-Петербург); 2. Линеаризованные плазмиды pLG3 и pMMTV-bGH, содержащие гены гормона роста быка с собственным промотором и под контролем LTR MMTV промоторов (предоставлены Л.В. Генингом, ИМГ РАН, Москва); 3. Рекombинантная векторная конструкция MT-1/bGH, в состав которой входил клонированный хромосомный ген соматотропина быка, включающий часть 5' транскрибирующей области и 3'- нетранслируемой области с сайтом терминирования, а также ген металлотионеина мыши с промотором и энхансером (получена в Словакии).

С целью изучения экспрессии генов в раннем эмбриогенезе были использованы репортерные гены. Генная конструкция pCMV-LacZ, в которой последовательности гена LacZ кодировали белок В-галактозидазу, под контролем промотора цитомегаловируса (предоставлена Л.Е.Андреевой, ИМГ РАН, Москва). Следующая генетическая конструкция была приобретена в фирме Pharmacia Biotech в виде плазмиды pCN110, в которой ген LacZ находился под контролем промотора SV-40. Профессор М. Okabe (Университет г. Осака, Япония) любезно предоставил генетическую конструкцию pCX-eGFP, в которой кроме последовательностей гена GFP, кодирующего флуоресцентный зеленый белок, находится В-актиновый

промотор цыпленка, энхансер цитомегаловируса и поли-А сигнал В-глобина кролика. Достоинством этой конструкции является прижизненная детекция экспрессии зеленого флуоресцентного белка при УФ облучении с определенной длиной волны.

Гормональную обработку доноров и реципиентов, извлечение и анализ эмбрионов проводили по отработанной методике (Козикова и др. 1990). Рекомбинантную ДНК микроинъектировали в концентрации 1-5 нг/мкл. Хирургическим путем проводили трансплантацию зигот синхронизированным реципиентам. Через месяц после рождения были взяты образцы тканей ушей и крови для выделения геномной ДНК. Скрининг трансгенных животных и их потомства проводили методами дот-гибридизации и блоттинга по Саузерну (Маниатис и др., 1984). Уровень изменчивости генетического аппарата оценивали с использованием цитогенетического анализа и применения микроядерного теста (МТ).

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Морфометрический анализ и структурная дифференцированность хромосом кур.

Интерес к изучению структурно-функциональной организации хромосом птиц вызван наличием хорошо идентифицируемых макрохромосом, облегчающих цитогенетический анализ, и микрохромосом. В отличие от млекопитающих у птиц гомогаметным полом являются самцы с ZZ- половыми хромосомами, а самки имеют ZW- половые хромосомы. По своим размерам хромосомы представляют собой постепенно убывающий ряд. Морфометрический анализ проводили на двух типах клеток: эмбриональных фибробластах и клетках костного мозга. В обоих типах тканей нами был достоверно показан гетероморфизм гомологов первых двух пар, что доказывает асинхронность процесса конденсации даже у гомологичных хромосом, причем, чем длиннее хромосомы, тем более выражен гетероморфизм.

Уровень спонтанных аберраций у эукариотов находится в большой зависимости от возраста, породы и экологических условий, в которых они находятся. Представляет интерес исследование частоты и спектра хромосомных аномалий на ранних стадиях инкубации эмбрионов, полученных путем искусственного осеменения свежим семенем, свежемороженым и семенем, подверженным криоконсервации в течение длительного времени. Цитогенетический анализ, проведенный на 44 эмбрионах кур, от которых было исследовано 477 метафазных пластинок, свидетельствует о том, что у эмбрионов, полученных путем искусственного осеменения кур породы белый плимутрок, фон спонтанной изменчивости хромосом составляет 5.88%. Доминирующим типом нарушений хромосом в норме являются структурные аберрации (3.57%). Общая частота хромосомных нарушений среди эмбрионов, полученных с использованием замороженного семени, увеличилась на два процента. Этот показатель не может существенно влиять на результаты

оплодотворяемости и выводимости цыплят. Следующая серия опытов была посвящена изучению хромосомных нарушений у эмбрионов, полученных путем оплодотворения семенем, которое хранилось в замороженном состоянии в течение 4-х месяцев. Характерной особенностью хромосомных нарушений среди этих эмбрионов было увеличение более чем в два раза частоты эуплоидии, в основном, за счет триплоидии. В этой серии опытов был выявлен триплоидный эмбрион, все клетки которого содержали тройной набор хромосом и три половые Z-хромосомы. Общее количество хромосомных aberrаций возросло на 1% по сравнению с предыдущим экспериментом.

Данные результаты исследования показывают, что цитогенетический контроль в разработке технологии криоконсервирования половых клеток является чувствительным инструментом и необходимым этапом проверки безвредности предлагаемых технологий.

Главной особенностью хромосомной организации является ее структурная дифференцированность по всей длине. Для G-окраски мы использовали хромосомы средней степени конденсации. При помощи микроденситометрии метафазных макрохромосом с последующей нормализацией денситометрических профилей, рассчитаны статистические параметры локализации, длины, относительной и удельной плотности G - полос 1-й пары макрохромосом цыплят. Длину полос и их отдаленность от центромеры измеряли в сотых долях плеча, удельную плотность находили через отношение относительной плотности к ее относительной длине. В каждом гомологе первой пары обнаружено 7 G - полос: 3 - в коротком плече (p) и 4 - в длинном (q). Первая от центромеры полоса короткого плеча является средней по величине и имеет слабую окраску. Две другие полосы короткого плеча располагаются в непосредственной близости друг от друга. Одна из них (Cp) имеет интенсивную окраску. Различия по длине и удельной относительной плотности между полосами короткого плеча достоверны ($P < 0.001$). В длинном плече можно выделить две короткие (Bq и Dq) и две длинные (Aq и Cq) полосы. Полоса Cq выделяется интенсивной окраской. Приведенные материалы свидетельствуют о том, что применяемый метод анализа денситометрических данных позволяет производить количественную оценку локализации, длины и интенсивности окраски G - полос.

Таким образом, изучение линейно-дифференцированных макрохромосом кур позволяет точно локализовать G-полосы, что важно для идентификации хромосом, а в случае патологии помогает выявлению aberrаций хромосом. Исследование линейно-дифференцированных хромосом может служить одним из подходов для выяснения взаимосвязи между структурой хромосом и одной из их главных функций - синтезом ДНК.

3.2. Репликация ДНК в хромосомах кур

Полученные нами данные показали, что ^3H - тимидин в самом начале S-периода активно включается как в макро-, так и в микрохромосомы клеток эмбриональных фибробластов и костного мозга, что указывает на

полирепликонный и одновременный характер вступления в синтез ДНК всех хромосом набора.

Анализ репликации ДНК был проведен в двух типах тканей: в клетках эмбриональных фибробластов и в клетках костного мозга. Включение ^3H -тимидина в хромосомы первичной культуры эмбриональных фибробластов было изучено на протяжении всего S-периода через каждый час. На клетках костного мозга были проведены исследования по выявлению индивидуальных различий по включению ^3H -тимидина в хромосомы.

В течение всего S-периода не менее 67% включившегося в ядро ^3H -тимидина обнаруживается в макрохромосомах (табл.1). В первый час S-периода над макрохромосомами находили 71% зерен серебра от общего их числа над метафазной пластинкой. Число меченых микрохромосом снижается в течение S-фазы от 27 до 6-7. Этот факт свидетельствует о том, что около 2/3 микрохромосом репродуцируются в первой половине S-периода. По числу меченых микрохромосом между отдельными сроками в течение S-фазы установлены достоверные различия. Учет количества зерен серебра над метафазными пластинками показал, что интенсивность репликационных процессов уменьшается (на 1/3 от среднего уровня) к концу S-фазы.

Таблица 1.

Включение ^3H -тимидина в макро- и микрохромосомы эмбриональных фибробластов (г-коэффициент корреляции числа зерен серебра над макрохромосомами к числу зерен серебра над микрохромосомами: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 20$)

Час S-периода	Зерен серебра над метафазой	Метка над макрохромосомами (%)	Метка над микрохромосомами (%)	Число меченых микрохромосом	г
1	211.9 $\pm$ 19.07	71.0 $\pm$ 6.65	29.0 $\pm$ 2.79	27.3 $\pm$ 2.10	0.79**
2	183.2 $\pm$ 11.14	67.1 $\pm$ 2.71	32.9 $\pm$ 2.02	27.2 $\pm$ 2.02	0.60**
3	240.8 $\pm$ 18.81	68.4 $\pm$ 5.81	31.6 $\pm$ 4.46	24.6 $\pm$ 1.96	0.29*
4	216.4 $\pm$ 23.63	73.7 $\pm$ 8.16	26.3 $\pm$ 3.72	21.4 $\pm$ 2.61	0.36*
5	154.9 $\pm$ 15.21	75.8 $\pm$ 7.17	24.2 $\pm$ 2.82	15,3 $\pm$ 144	0.91**
6	118.9 $\pm$ 15.40	77.3 $\pm$ 6.37	22.7 $\pm$ 3.75	12.1 $\pm$ 1.50	0.94**
7	55.9 $\pm$ 9.38	79.2 $\pm$ 11.91	20.8 $\pm$ 5.74	6.2 $\pm$ 1.46	0.77**
8	62.09 $\pm$ 9.40	76.8 $\pm$ 11.51	23.2 $\pm$ 4.53	7.1 $\pm$ 1.30	0.73**

Микрохромосомы более обогащены ГЦ-последовательностями и являются R-положительными (Ponce de Leon et al., 1992; Schmid et al., 2000). Кроме этого, микрохромосомы отличаются меньшей степенью метилирования ГЦ-пар оснований и более высоким уровнем ацетилирования гистонов в сравнении с макрохромосомами (McQueen et al., 1998). Эти структурно-функциональные характеристики микрохромосом косвенно указывают на

наличие у них функционального хроматина, что позднее было подтверждено локализацией большого количества генов в микрохромосомах (Сазанов, 2004).

Таким образом, принимая относительное количество ^3H -тимидина за весь S-период в качестве показателя относительного содержания ДНК можно заключить, что в макрохромосомах содержится 73.7%+4.75% ДНК генома, а в микрохромосомах 26.3%+1.91%.

3.2.1. Межхромосомная асинхронность синтеза ДНК

Для изучения характера межхромосомной асинхронности синтеза ДНК в течение S-периода подсчитывали количество восстановленного серебра над каждой макрохромосомой. Гетероморфизм гомологов первых двух пар аутосом давал возможность определить количество метки отдельно над каждым гомологом. Затем находили процентное содержание метки над каждым гомологом или над парой гомологов от суммы зерен серебра над всеми 6 парами макрохромосом. Для определения скорости синтеза ДНК на единицу длины хромосомы находили отношение процентного содержания метки над гомологом, или парой гомологов к их относительной длине, что выражали в процентах. Этот показатель в данной работе именуется относительной скоростью синтеза ДНК. В ряде работ показано, что в разных типах клеток одни и те же области генома могут реплицироваться в различные моменты S-периода в зависимости от того, какие группы тканеспецифичных генов активно экспрессируются в данном типе клеток (Simon et al., 2001). В начале S-периода синтез ДНК протекает во всех макрохромосомах и в большей части микрохромосом клетки. Середина S-фазы характеризуется активной репродукцией макро- и микрохромосом, хотя в нескольких микрохромосомах репликация ДНК уже завершена. Завершение синтеза ДНК в конце S-периода происходит со снижением интенсивности репликативных процессов и с незначительно выраженной межхромосомной асинхронностью. В большинстве микрохромосом процесс репликации ДНК уже завершен за исключением W-хромосомы, в которой выявлено много метки.

В таблице 2 дано распределение коэффициентов относительной скорости синтеза ДНК, рассчитанные с учетом относительной длины хромосом цыплят. Результаты показывают, что асинхронность синтеза ДНК аутосом и половых хромосом выражена в небольшой степени. Статистически достоверные различия в скорости репликации ДНК выявлены у гомологов первой пары к седьмому часу S-периода. Следует отметить, что чем меньше аутосомы по размеру, тем выше у них тенденция к выражению асинхронности синтеза ДНК. Репродукция аутосом в основных чертах напоминает динамику синтеза ДНК обеих ZZ-хромосом петушков. Синтез ДНК W-хромосомы в первой половине S-периода протекал, примерно, на 2/3 ниже теоретически ожидаемого уровня, по сравнению с макрохромосомами. Однако в конце S-фазы интенсивность синтеза ДНК в два раза превышала этот же теоретически ожидаемый уровень.

Таблица 2.

Распределение коэффициентов относительной интенсивности синтеза ДНК в клетках
эмбриональных фибробластов кур (%).

№ хромо- сомы	Часы S - периода							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1a	107.8±3.86	96.2±5.01	90.4±4.13	107.6±6.96	109.4±8.54	110.1±7.53	107.6±11.7	110.1±8.65
16	106.9±4.17	93.7±3.31	102.8±6.25	96.5±5.51	100.0±5.35	120.1±8.89	73.6±11.28	99.6±6.27
1	106.9±3.08	94.9±3.26	96.6±4.94	102.0±4.38	104.7±4.76	115.1±5.71	90.8±9.08	104.8±6.48
2a	94.1±8.15	101.6±6.47	95.8±5.37	110.0±14.2	103.4±6.14	96.6±8.57	100.0±8.68	80.2±11.28
26	120.9±7.03	114.2±8.23	118.7±6.92	114.2±9.11	104.4±7.47	120.9±5.72	110.4±16.1	83.5±14.5
2	107.5±4.89	107.9±6.91	107.2±3.62	112.±6.44	103.9±4.34	108.7±6.71	105.2±9.97	81.8±6.08
3	102.8±5.14	96.0±3.76	99.0±3.88	101.6±5.77	99.6±5.95	96.5±6.96	98.1±11.82	94.6±6.14
4	101.5±5.07	103.0±6.04	103.7±6.72	88.8±5.97	103.0±5.37	85.1±8.96	88.8±15.88	101.9±14.3
Z	98.4±5.57	114.6±12.6	103.2±6.72	114.6±12.2	101.6±6.72	98.4±10.34	144.2±38.8	103.2±19.8
Z	-	108.9±16.2	112.5±6.78	119.6±22.8	103.6±28.2	108.9±16.9	116.1±33.7	92.8±21.1
6	105.2±5.58	102.6±7.28	98.6±7.53	87.0±20.81	83.1±9.09	71.4±9.12	109.5±17.7	142.2±22.8
W	23.5±9.79	31.0±12.1	34.1±9.85	47.0±15.67	94.1±32.10	58.6±17.21	196.0±44.3	196.0±44.6
n	20	25	25	25	30	25	25	25

n-число наблюдений

Следовательно, синтез ДНК аутосом и Z-хромосом не имеет принципиальных различий у кур по полу. W-хромосома имеет свою программу скорости синтеза ДНК в течение S-периода, которая значительно отличается от подобных программ других хромосом.

3.2.2. Внутрихромосомная асинхронность синтеза ДНК

Для изучения распределения зерен серебра по длине хромосом мы использовали микроденситометрию негативных изображений хромосом.

Как в конце, так и в начале S-периода, имеет место явно выраженная внутрихромосомная асинхронность синтеза ДНК. Получение радиоавтографов метафазных пластинок после включения ^3H -тимидина в конце S-периода позволяет идентифицировать W-хромосому среди микрохромосом и идентифицировать равные плечи Z-хромосомы по характеру распределения метки.

3.2.3. Взаимосвязь линейной структуры хромосом с внутрихромосомной асинхронностью репликации ДНК на примере первой аутосомы кур

Проведение сравнительного анализа распределения метки и G-полос на примере первой пары аутосом кур показывает, что в начале S- периода синтез ДНК проходит, в основном, G-негативных участках, т.е. между G-полос. В конце S-периода локализация метки полностью совпадает с G-полосами, что свидетельствует о преимущественной репликации ДНК гетерохроматических участков. В многочисленных работах выявлена положительная корреляция между линейной дифференциацией хромосом и характером синтеза ДНК. Свойства G-полос также отражают раннюю и позднюю репликацию хромосомных районов и выявляют иерархию генов или группу генов, способных к транскрипции (Claussen et al., 2002).

3.3. Характеристика репликационной активности генома кролика методом RBA-маркирования

С целью идентификации хромосом кролика была проведена дифференциальная окраска методом RBA. В кариотипе кролика при разделении хромосом по центромерному индексу (ЦИ) и размерам можно выделить 4-е группы аутосом и половые хромосомы - X и Y. Первая группа включает метацентрические хромосомы (№ 1-6 и ЦИ 0.42-0.49). Вторая группа (№7-11) представлена субметацентрическими хромосомами с более медианным положением центромеры (ЦИ 0.33-0.38), по сравнению с третьей группой (№ 12-17) субметацентриков с более акроцентрическим положением центромеры (ЦИ 0.20-0.29). Четвертая группа (№18-21) состоит из акроцентриков. Половые хромосомы - гетероморфная пара у самцов (ЦИ X-0.44; ЦИ Y-0.30).

Этот метод выявляет структурно-функциональные характеристики хромосом, такие как асинхронность (блочность) репликации по длине хромосомы, которая определялась по времени включения 5-бромдезоксимуридина в S-фазе. Следует отметить, что районы ранней и поздней

репликации во всех хромосомах чередуются, занимая различные по размерам участки, что является отражением внутрихромосомной асинхронности репликации ДНК. Почти все теломерные районы реплицируются в первой половине, центромерные - во второй половине S-периода. Интенсивность репликационных процессов в разных хромосомах различна, что указывает на межхромосомную асинхронность репликации. Только У- хромосома почти полностью реплицируется в первой половине - начале второй половины S-фазы. Наиболее ярким примером гомологичной асинхронности синтеза ДНК являются половые хромосомы самок. Одна из хромосом реплицируется в первой половине, вторая - во второй половине S-периода.

На примере 1-й хромосомы была прослежена взаимосвязь процессов репликации и конденсации. При высокой степени конденсации по сравнению с низкой происходит слияние субблоков в блоки. Такие переходы происходят, в основном, за счет негативных сегментов, при слиянии которых, образуется один негативный блок, или они нивелируются в позитивных блоках. Известно, что районы хромосом после репликации подвергаются конденсации. Отношение суммы длин позитивных сегментов высоко конденсированной первой хромосомы к ее длине составляет 0.74, негативных — 0.26. То же отношение позитивных и негативных сегментов низко конденсированного варианта равно соответственно 0.67 и 0.33. Эти наблюдения позволяют заключить, что сжатие метафазных хромосом идет, в основном, идет за счет негативных, поздно реплицирующихся сегментов. Таким образом, наряду с асинхронностью репликации имеет место и явление внутрихромосомной асинхронности конденсации. Различие темпов конденсации между не гомологичными хромосомами можно проиллюстрировать на примере первой группы хромосом, сравнивая высокую и низкую степень конденсации (табл.3).

Таблица 3.

Показатели темпов конденсации в первой группе метacentрических хромосом кролика разных уровней конденсации

Номер хромосомы	Абсолютная длина конденсированных хромосом (мкм)	Абсолютная длина слабоконденсированных хромосом (мкм)	Отношение длин разноконденсированных хромосом
1	5.0± 0.3	10.0± 0.6	0.50
2	4.8± 0.3	8.6± 0.5	0.56
3	3.8± 0.5	6.7± 0.6	0.57
4	3.0± 0.1	5.2± 0.3	0.58
5	2.0± 0.1	3.3± 0.1	0.61
6	1.8± 0.1	2.9± 0.1	0.62

При длине маркерной хромосомы 5 мкм число блоков в наших исследованиях составляло 205 (95 R-негативных, 110 R-позитивных); при длине хромосомы №1 около 6.5 мкм число блоков 308 (145 R-негативных, 163 R-позитивных), при длине хромосомы №1 около 10 мкм число блоков 387 (184 R-негативных, 203 R-позитивных).

Следовательно, что при сокращении степени конденсации в два раза число выявляемых сегментов уменьшается примерно на ту же величину.

3.4. Первый раунд репликации ДНК в пронуклеусах кроликов

При оплодотворении важным событием является внедрение хроматина сперматозоида, в результате чего происходит ремоделирование и реорганизация гаплоидного отцовского генома в пронуклеус, что в свою очередь ведет к активации завершения мейоза с образованием женского пронуклеуса. В женском и мужском пронуклеусах начинается значимое событие для эмбриона - первый раунд синтеза ДНК (S-фаза), который длится до короткого периода G₂. Особенностью первой фазы репликации ДНК является то, что он контролируется в основном материнскими факторами, хранившимися в ооците на протяжении всего оогенеза. Для изучения репликации ДНК в одноклеточных эмбрионах был использован метод автордиографии с применением тимидина, меченого тритием, приготовлены ультратонкие срезы и получены радиоавтографы, окрашенные раствором метиленового голубого. Через 14-21 час после спаривания зиготы были получены из яйцеводов кроликов. В начале периода синтеза ДНК (14-16 часов после спаривания) распределение гранул восстановленного серебра в слое эмульсии над мужскими пронуклеусами были более интенсивными, чем над женскими, что указывает на асинхронность репликации ДНК. В середине периода синтеза ДНК в двух пронуклеусах репликация ДНК проходила достаточно интенсивно. Завершение репликации ДНК (19-21 час после спаривания) в пронуклеусах проявляется в распределении кластеров репликации по периферии ядра в конденсированных участках хроматина и в проядрышках. В конце S-фазы значительно снижается интенсивность включения радиоактивной метки в обоих пронуклеусах.

Следует отметить, что ДНК-репликативные процессы функционально связаны с морфологическими изменениями в пронуклеусах кролика. В первой половине S-фазы мужской пронуклеус по своему объему уступает женскому, но обладает более сильно выраженной репликативной активностью. В середине S-фазы, когда оба пронуклеуса одинаковы по своим размерам, синтез ДНК протекает с одинаково сильной интенсивностью. Во второй половине S-периода происходит сближение пронуклеусов, при этом мужской пронуклеус становится больше женского, но интенсивность репликации ДНК затухает, по сравнению с женским.

Полученные нами данные указывают на то, что уже на одноклеточной стадии развития выявлены два типа хроматина, которые отличаются по времени репликации ДНК (конденсированный хроматин и проядрышки реплицируются в конце S-фазы, а светлоокрашенный хроматин - в начале и середине S-периода). Именно первый раунд синтеза ДНК, является необходимым для последующей генной экспрессии и протекания следующих клеточных циклов.

3.5. Перенос генов соматотропной оси в зиготы кроликов, получение и анализ трансгенных животных

Трансформация генома стала возможной благодаря достижениям генной инженерии, а также использованию новых методов переноса генетической информации как в соматические клетки, так и в ранние эмбрионы млекопитающих. Успехи экспериментальной эмбриологии в выделении яйцеклеток животных, культивировании, трансплантации и манипуляции с эмбриональными клетками, позволили разработать схемы, используемые в опытах по генетической трансформации.

3.5.1. Получение ранних эмбрионов на стадии зиготы с оценкой их качества, влияние процессов микроинъекции и трансплантации на жизнеспособность зародышей до момента рождения.

Исследования проводили на кроликах, которым методом микроинъекции вводили гены соматотропной оси в пронуклеусы зигот или ядра 2-бластомерных зародышей. Всего было проведено семь серий экспериментов. В первых двух сериях особое внимание было уделено отработке и усовершенствованию приемов получения ранних эмбрионов с учетом их количества и морфологических особенностей. Были выбракованы следующие эмбрионы: с признаками дегенерации (фрагментация цитоплазмы, увеличение перивителлинового пространства, нарушение целостности ядерной и блестящей оболочки), с видимыми геномными нарушениями, а также неоплодотворенные яйцеклетки. Из общего количества полученных эмбрионов количество неполноценных эмбрионов в разных сериях экспериментов изменялось от 1.6% до 8.6% (табл. 4).

После микроинъекции генов в ядра ранних эмбрионов в первой серии экспериментов только 20% эмбрионов прижились после пересадки их реципиентам и сохранили способность развиваться до рождения потомства. 9 реципиентов из 30 оказались сукрольными. Однако лишь у 6 реципиентов беременность завершилась рождением потомства. Всего было получено 54 крольчонка. У остальных 3 реципиентов беременность, диагностируемая визуально и пальпацией, не привела к рождению потомства. Причиной тому была, очевидно, пренатальная гибель плодов с последующим абортацией, либо мацерацией и рассасыванием. Возможно, одной из причин гибели зародышей на разных стадиях пренатального периода является нарушение генетической программы развития, вызванной как процессом микроинъекции, так и мутагенным воздействием экзогенной ДНК.

В контрольной группе при трансплантации не микроинжецированных эмбрионов 17 ложнобеременным самкам беременными стали 14 (82.4%), родившие через 28-30 суток 86 крольчат (56.2% к числу трансплантированных эмбрионов). Результаты рождаемости потомства (соответственно 56.2% против 14.6%), свидетельствовали в пользу того, что процедура микроманипуляции снижает приживляемость эмбрионов после пересадки их реципиентам, и повышает пренатальную гибель зародышей.

Таблица 4.

Количество полученных эмбрионов и оценка их качества

Название введенного гена	GRF	GRF	GRF	GRF	Конт-роль	bGH	bGH
№ эксперимента	1	2	3	4	5	6	7
Использовано доноров	29	38	17	31	16	6	14
Число овуляций	412	449	189	310	157	72	126
Получено всего эмбрионов	391 (95,0%)	397 (88,4%)	184 (97,3 %)	307 (99,0%)	156 (99,4 %)	69 (95,8 %)	124 (98,4%)
Получено на одного донора	12,7	10,4	10,7	9,8	9,8	11,5	8,7
Полноценных эмбрионов	369 (93,8%)	363 (91,4%)	174 (94,3%)	300 (97,8%)	153 (98,1 %)	64 (92,7 %)	122 (98,4%)
На стадии зиготы	361	358	171	296	150	60	120
На стадии 2-х бластомеров	8	5	3	4	3	4	2
Неполноценных эмбрионов	22 (5,6%)	34 (8,6%)	10 (5,4%)	7 (2,3%)	3 (1,9%)	5 (7,2%)	2 (1,6 %)

Во второй серии экспериментов 356 эмбрионов, сохранивших целостность после микроинъекции гена hGRF, без предварительного культивирования *in vitro* были пересажены 28 реципиентам (по 12,7 эмбрионов на реципиента). 5 сукрольных самок принесли 32 крольчат (в т.ч. 22 живых), что составило 9% к числу трансплантированных эмбрионов.

Совместно с сотрудниками Института генетики и разведения животных Польской академии наук было проведено еще две серии экспериментов по получению и изучению трансгенных животных после микроинъекции генной конструкции MT-1/hGRF. Всего 474 зиготам были микроинъекцированы генные конструкции, содержащие ген рилизинг фактора гормона роста человека, и трансплантированы гормонально синхронизированным реципиентам. Через 30-31 день родилось 40 крольчат, из которых 19 живых и 21 мертворожденных. 15 кроликов достигло возраста 8-и и более недель.

В следующих двух сериях экспериментов ранним эмбрионам был введен ген гормона роста быка. Совместно с сотрудниками Института молекулярной

генетики РАН 14 реципиентам, полученными после естественного спаривания, без использования гормонов, было трансплантировано в яйцеводы 64 проинъецированных зигот со смесью плазмид, содержащих ген гормона роста быка. Окрол произошел у 6 самок с рождением 27 крольчат, развившихся из собственных и трансплантированных зигот.

На базе международной лаборатории биотехнологии животных (г. Нитра, Словакия) от 14 доноров было получено 124 ранних эмбриона, среди которых 122 полноценных эмбриона (120 зигот и два 2-бластомерных эмбриона). С помощью микроманипулятора в пронуклеусы зигот было введено 500-800 копий гена MT-bGH. Семи псевдобеременным самкам было трансплантировано 122 ранних эмбрионов. В результате окрола появилось 25 крольчат, что составило 20.5% от числа пересаженных эмбрионов. Следует отметить, что в течение месяца после окрола погибло 6 крольчат.

3.5.2. Анализ интеграции генных конструкций MT-1/hGRF и MT-1/bGH в геном кроликов.

Во всех сериях экспериментов были взяты образцы крови или небольшие кусочки тканей ушей, из которых была выделена геномная ДНК. Наличие экзогенных последовательностей генов hGRF и bGH в геноме кроликов определяли методом ДНК-ДНК гибридизации в изотопном варианте. Результаты проведения дот-блот-гибридизационных анализов в экспериментах представлены в таблице 5. Как видно из таблицы эффективность трансгеноза различная во всех сериях экспериментов и изменялась от 1.9 до 22.2% от числа трансгенных кроликов к числу новорожденных, от 0.3 до 4.7% от числа имплантированных. В отличие от мышей трансформация генома у сельскохозяйственных животных значительно менее эффективна. В среднем, эффективность генных пересадок овцам, козам, свиньям и крупному рогатому скоту составляет 0.58 (Rexroad, Pursel, 1988).

Для скрининга геномной ДНК использовали рестриктазу HindII, не имеющую сайтов расщепления внутри EcoRI-HindIII - фрагмента микроинъецированных генетических конструкций MT-1/hGRF и MT-1/bGH. Сравнение интенсивности основного гибридизационного сигнала ДНК трансгенных кроликов в первых четырех сериях экспериментов с гибридизационным сигналом ДНК EcoRI-HindIII- фрагмента (положительный контроль), свидетельствовало о присутствии примерно от 2 до 15 копий гена hGRF в клетках трансгенных кроликов. В шестой серии экспериментов блот-гибридизационный анализ ДНК кроликов с зондами, содержащими ген bGH, показал, что у одного кролика присутствует лишь часть гена гормона роста быка и последовательности плазмиды, а у двух остальных кроликов произошел перенос только части одной из рекомбинантных плазмид. В седьмой серии экспериментов низкая интенсивность гибридизационного сигнала геномной ДНК, рестрицированной эндонуклеазой HindIII, свидетельствовала об интеграции менее одной копии гена bGH на клетку в перестроенном виде.

Таблица 5.

Результаты дот- и блот-гибридизационного анализов геномной ДНК кроликов

№ эксперимента	1	2	3	4	6	7
Проанализировано проб	54	12	22	18	20	18
Положительный ответ дот-гибридизации	4	6	2	4	3	2
Положительный ответ блот-гибридизации	1	4	2	4	3	2
Кол-во трансгенных животных к числу новорожденных	1.9% (1/54)	12.5% (4/32)	9.1% (2/22)	22.2% (4/18)	11.1% (3/27)	8% (2/25)
Кол-во трансгенных животных к числу трансплантированных эмбрионов	0.3% (1/369)	1.1% (4/356)	1.2% (2/174)	1.3% (4/30)	4.7% (3/64)	1.6% (2/122)

Становится очевидным, что лимитирующим фактором получения трансгенных животных является случайный характер интеграции трансгена в геном.

3.5.3. Фенотипические показатели трансгенных кроликов и наследование трансгенов hGRF и bGH.

Следует отметить, что видимые фенотипические изменения у многих родившихся в экспериментах крольчат, не были выявлены. Тем не менее, трансгенный кролик № 17, полученный в первой серии экспериментов, уже при рождении был мельче сверстников, и при дальнейшем развитии отставание в росте для него оказалось характерным. Подтверждением служат данные взвешивания кроликов на протяжении 22 недель (рис.1). Сравнение показателей роста трансгенных кроликов со своими сверстниками свидетельствует о прогрессирующем отставании в росте трансгенного кролика. В недельном возрасте при первом взвешивании живая масса "карлика" (70 г) была на 204 г меньше средней живой массы в группе контрольных сверстников (274 г), при последующих взвешиваниях это различие неуклонно увеличивалось.

Во второй серии экспериментов наблюдали противоположный фенотипический эффект у трансгенных кроликов. Уже в недельном возрасте средняя живая масса трансгенных кроликов на 96 г была выше средней живой массы в группе контрольных сверстников (100 г). Максимальная кратность превышения в весе трансгенных кроликов, по сравнению с интактными, была

в 1.97 раза выше в возрасте 4 недели, а при последнем взвешивании составляла 1.2 раза (18-ть недель).

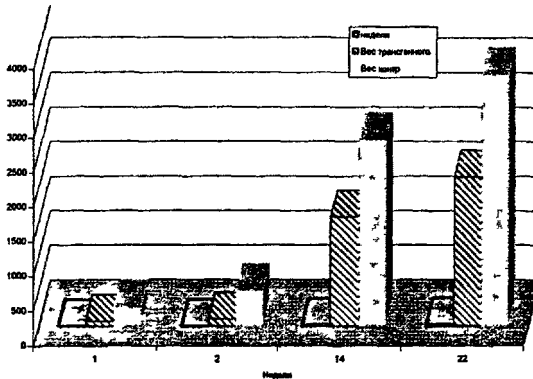


Рис.1. Диаграмма весовых показателей трансгенного кролика и интактных сверстников на протяжении 22-х недель

Следует отметить, что в опытах, проведенных в Польше и в Словакии, также были получены трансгенные кролики с ускоренными темпами роста. У трансгенных кроликов, полученных на базе Института животноводства (г. Нитра, Словакия), были выявлены два фенотипических эффекта. Один кролик родился с нарушением конечностей и через два месяца погиб. У другого кролика с интегрированным геном bGN также наблюдали эффект ускоренного роста. В возрасте 7 недель живая масса трансгенного кролика была в два раза больше, чем у его не трансгенных братьев и сестер. Необходимо отметить низкое либидо у трансгенного самца, которое было выявлено при попытке получения потомства. Таким образом, интеграция рост стимулирующих генов hGRF и bGN в геном кроликов имеет два ярко выраженных фенотипических эффекта: увеличение или уменьшение массы тела по сравнению со своими сверстниками.

Для получения потомства трансгенного самца № 17 спаривали с двумя интактными самками, от которых родилось 10 крольчат. Результаты блот-гибридизационного анализа геномной ДНК показали, что 5 крольчат были трансгенными. Длины гибридирующихся фрагментов потомков F_1 у кроликов № 4, № 5, № 6 соответствовали 4.9 т.п.н., что свидетельствовало о схожести с длиной основного гибридирующегося фрагмента (4.9. т.п.н.) ДНК трансгенного родителя. У кроликов № 7 и № 8 эти последовательности претерпели изменения, на что указывает уменьшение длины гибридирующихся фрагментов до 3.5. т.п.н. Таким образом, результаты

гибридизационного анализа геномной ДНК кроликов F₁ свидетельствуют о передаче трансгенным кроликом № 17 последовательностей ДНК гена hGRF потомкам F₁ в 50% случаев (5/10).

Анализ роста и развития потомков трансгенного "карлика" № 17 показал, что они наследовали от отца замедленный рост и соответственно меньшую живую массу по сравнению с контрольной группой животных того же возраста. Уже в недельном возрасте отмечены достоверные ($P < 0.05$) различия в средней живой массе трансгенных потомков F₁ (126 ± 21.8 г) и контрольных сверстников (306.7 ± 18.6 г). При последующих взвешиваниях эти различия составляли в возрасте 2 недели - 287 г (256 ± 47 г против 543 ± 49.8 г), в 7 недель - 362 г (858 ± 36.2 г против 1220 ± 102.1 г), в 10 недель - 654 г (1086 ± 83 г против 1740 ± 153.1 г), 673.5 г (1567.5 ± 50.7 г против 2240 ± 151.3 г) в 14 недель.

После спаривания трансгенного кролика, полученного нами в Словакии, с двумя не трансгенными самками, несмотря на его пониженное либидо, от двух пометов получено потомство в количестве 16 голов. Живая масса крольчат F₁ при рождении на 30% превышала контрольную группу ($P < 0.001$). Следует обратить внимание, что спаривание наиболее крупных кроликов одного помета F₁ между собой, дало крупных потомков F₂, превышающим по средним величинам живой массы контрольную группу, и группу F₁. В возрасте 15 недель крупные потомки достигли веса 3700 г, тогда как такая же живая масса в контрольной группе была получена в возрасте 24 недель. Следует отметить повышенную смертность в поколении FL В течение первых 11 недель после рождения погибло 25% крольчат, а во второй период смертности от 22 до 30 недель погибло еще 45% потомства. Биохимический анализ показателей белкового и минерального обмена крови трансгенного кролика и его потомства F₁ выявил высокий уровень мочевины ($5.54 - 10.20$ ммоль/л), в 3-5 раз превышающих норму, что указывает на нарушения белкового обмена у экспериментальных животных.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что после интеграции гена hGRF в геном трансгенного кролика № 17, его трансгенные потомки первого поколения наследовали не только генотип, но и фенотипические особенности, такие как замедленный рост и развитие, соответственно и более низкую живую массу по сравнению с его контрольными сверстниками. У трансгенных кроликов, с интегрированными генами соматотропной оси, обладающих высокой скоростью роста, в первом и во втором поколениях сохраняются более высокие показатели скорости роста и развития, по сравнению с контрольными кроликами. Как трансгенные особи, так и их потомки обладали пониженной жизнеспособностью.

3.6. Получение трансгенных свиней с геном рилизинг фактора гормона роста человека (hGRF) с последующим генетическим и фенотипическим анализом.

С целью получения трансгенных свиней было проведено четыре серии экспериментов. На первых этапах экспериментов необходимо было отработать

гормональные схемы суперовуляции для получения ранних эмбрионов на стадии зиготы и метода визуализации ядерного материала, а также создать технологию получения трансгенных свиней в условиях фермы.

В Словакии на базе Института животноводства были проведены две серии экспериментов с целью получения ранних эмбрионов от суперовулированных свиней. Полученные данные указывают на то, что, во-первых, не у каждого животного гормональная стимуляция вызывает эффект суперовуляции, а во-вторых, существует индивидуальная реакция животных на процесс гормональной обработки.

В следующих двух сериях экспериментов для получения ранних эмбрионов на стадиях зиготы и 2-бластомеров было использовано 19 свиней-доноров. В первую группу животных входили самки со спонтанной охотой. Во вторую экспериментальную группу входили доноры, у которых вызывали гормональную стимуляцию полиовуляции. У реципиентов гормонально стимулировали синхронизацию охоты.

В первой группе получили 115 ранних эмбрионов, в среднем по 9.6 эмбриона на свинку. Количество полученных эмбрионов, исходя из определяемого числа овуляций, составила 91.3% (табл. 6).

От второй группы животных получили 159 ранних эмбрионов, в среднем по 22.7 эмбриона на донора, что указывает на то, что гормональная обработка животных позволяет более чем вдвое увеличить выход эмбрионов. Однако гормональная стимуляция полиовуляции отразилась на качестве эмбрионов. Число полноценных эмбрионов в группе №1 (94.8%) было выше, чем в группе №2(81.8%).

Таблица 6.

Получение эмбрионов свиней и их морфологическая оценка

№ группы	1	2
Использовано доноров	12	7
Число овуляций	126	173
Получено эмбрионов	115 (91.3%)	159 (91.9%)
Эмбрионы на 1-го донора	9.6	22.7
Полноценных эмбрионов:	109 (94.8%)	130 (81.8%)
В т.ч. на стадии зиготы	92	113
На стадии 2-3-х бластомеров	17	17
Неполноценных эмбрионов:	6 (5.2%)	29 (18.2%)
В т.ч. с признаками дегенерации	2	6
С геномными нарушениями	1	3
Неоплодотворенных яйцеклеток	3	20

При изучении качества эмбрионов показано, что среди неполноценных эмбрионов были выявлены эмбрионы с признаками дегенерации, триплоидные и один тетраплоидный, но основную часть составляли неоплодотворенные яйцеклетки, особенно среди животных группы № 2 (прошедших гормональную

обработку). В отличие от кроликов в зиготах свиней не просматривались пронуклеусы из-за наличия темноокрашенной цитоплазмы при использовании дифференциального интерференционного контраста по Номарскому, поэтому основную часть зигот, после морфологической оценки их качества, подвергали центрифугированию для смещения цитоплазматических включений, маскирующих пронуклеусы.

Различная степень повреждения эмбрионов при центрифугировании и микроинъекции отразилась на способности эмбрионов развиваться до рождения потомства после пересадки реципиентам. Так, из 92 зигот и 2-3- бластомерных эмбрионов, пересаженных реципиентам в серии экспериментов № 1, до рождения потомства развилось 5.4%. Из 5 использованных свинок-реципиентов, опоросилась одна.

В серии экспериментов № 2 использовано 6 свинок-реципиентов, 5 из которых оказались супоросными (83.3%) и принесли 24 поросенка (в т.ч. 14 живых). В этой серии экспериментов получены более высокие показатели рождаемости потомства, чем в серии экспериментов № 1, что возможно вызвано использованием вдвое большего количества эмбрионов при трансплантации, а также была более жестко проведена отбраковка не качественных эмбрионов.

От 5 поросят, родившихся в первой серии экспериментов, и от 24 поросят и мертворожденных плодов во второй серии экспериментов, были взяты образцы тканей ушей и крови, из которых была выделена геномная ДНК для выявления чужеродных последовательностей ДНК гена hGRF. С помощью блот-гибридизационного анализа было подтверждено присутствие последовательностей ДНК гена hGFR в геноме лишь одного животного № 1 в первой серии экспериментов. Геномная ДНК свинки № 1, рестрицированная ферментом HindIII, дала положительный сигнал в области длин фрагментов 12 т.п.н. и 4.6 т.п.н. Интенсивность гибридных сигналов свидетельствовала о наличии примерно 10 копий гена hGRF в геноме животного. С подтверждением трансгеноза у одной свиньи из 5, родившихся в этой серии экспериментов, эффективность генных пересадок составила 20% к числу новорожденных и 1.1% - к числу трансплантированных эмбрионов.

В следующей серии экспериментов пробы ДНК были исследованы с помощью метода блоттинга по Саузерну, который подтвердил присутствие последовательностей гена hGRF в геноме 3 свиней (№66/1, №66/2, №66/3). Интенсивность положительных сигналов, при сравнении с таковой в положительном контроле (порядка 5 копий на диплоидный геном), свидетельствует о присутствии в геноме хряка № 66/1 не более одной копии гена hGRF, в геноме хряка № 66/2 - около 10 копий и в геноме хряка № 66/3 - около 3 копий. Подводя итоги в этой серии экспериментов, получили, что общая эффективность трансформации генома свиней с помощью гена hGRF составила 12.5% к числу новорожденных и 1.55% - к числу трансплантированных эмбрионов.

Опытные поросята при рождении не имели сильно выраженных фенотипических изменений. У трансгенного хряка в условиях фермы

Поляриково (отделение Ружовый двор, Словакия) были изучены репродуктивные качества. Необходимо указать на снижение либидо. Тем не менее, следует отметить эффект увеличения супоросности. Так, при спаривании 23 нормальных свиноматок с трансгенным самцом 21 самка принесла потомство (91%), тогда как в контроле показатель супоросности составил 78-83%. В поколении F1 получено 223 поросенка в 21 помете, среди которых 213 живых и 4.5% мертворожденных. Средняя живая масса составила 1.41кг, а среднее количество поросят на самку - 10.6. По результатам блот-анализа по Саузерну у потомков не было выявлено чужеродного гена, но полученное потомство отличалось от контрольной группы низкой степенью выживаемости. В течение первых 3 недель жизни погибло 36.9% поросят.

Во второй серии экспериментов средняя живая масса новорожденных поросят составляла 1.4 кг, что соответствовало средней живой массе контрольных сверстников. Интенсивность роста животных в опытной группе, практически, не отличалось от таковой в контрольной группе.

В первой серии экспериментов средняя живая масса поросят при рождении составляла 1.2 кг, что несколько меньше, чем в группе контрольных сверстников (1.41 кг). К месячному возрасту наметилась различная интенсивность роста животных в опытной (4.5 ± 0.76 кг) и контрольной группах (7.0 ± 1.1 кг). К 5 месячному возрасту достоверное ($P < 0.05$) различие в средней живой массе по группам животных было 21.1 кг (25.9 ± 3.1 кг против 47 ± 4.3 кг), к 9-ти месяцам - 37.1 кг (53.0 ± 4.7 кг против 124 ± 3.4 кг). В заключение можно отметить, что в первой серии экспериментов свиньи, полученные из ранних эмбрионов, в которые был введен ген hGRF, в годовалом возрасте по размерам и весовым показателям соответствовали 6 месячным контрольным животным. При влиянии рост стимулирующего гена hGRF у трансгенной свинки № 1, был выявлен феномен карликовости.

3.7. Цитогенетический анализ и изучение уровня стабильности генома кроликов и свиней, полученных из эмбрионов, в которые микроинъекцировали ген hGRF, а также их потомков.

Как известно, микроядра состоят из малых количеств ДНК и представляют фрагменты хромосом. В настоящее время микроядерный тест (МТ) используют в целях биомониторинга. МТ, как показатель геномной нестабильности, особенно актуален при введении в геном чужеродных генетических конструкций и изучении их воздействий на геном трансгенных животных и их потомков. Была исследована частота и количество эритроцитов с микроядрами у интактных кроликов (контрольная группа) и кроликов, полученных из зигот после микроинъекции генетической конструкции MT-1/hGRF (экспериментальная группа). В экспериментах было использовано 30 самцов и самок породы шиншилла в экспериментальной группе и 25 животных породы шиншилла в контрольной группе. Частота клеток с микроядрами была определена на 10000-х эритроцитах от каждого животного. Количество микроядер у интактных кроликов варьировало от 0 до 4.5×10^{-4} при

среднем значении $1.0 \times 10^{-4} \pm 0.27 \times 10^{-4}$. Крайние значения МТ в экспериментальной группе составляли 0.5×10^{-4} и 5.5×10^{-4} при средних значениях $2.15 \times 10^{-4} \pm 0.16 \times 10^{-4}$ ($P < 0.001$), что в два раза превышает показатели у контрольной группы.

У свиней, полученных после введения гена hGRF, МТ-тестирование показало, что средняя частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в три раза превосходит ($P < 0.001$) данный показатель интактных животных. Следует отметить, что увеличение показателей МТ-теста были зарегистрированы в популяциях эритроцитов опытных кроликов и свиней, давший отрицательный сигнал при тестировании на трансгенез.

Анализ препаратов хромосом трансгенного хряка, его потомков и группы контрольных животных показал, что во всех трех группах нет видимых структурных нарушений и транслокаций. В пределах нормы на отдельных метафазных пластинках встречались хроматидные aberrации. Количество полиплоидных клеток во всех 3 группах составило не более 1%. Цитогенетический анализ трансгенного хряка показал повышенную ассоциативную способность метафазных хромосом. Подсчет ассоциаций проводили согласно общепринятым методам на 30 метафазных пластинках от каждого животного во всех трех группах, при этом отдельно учитывали ассоциации 2, 3 и более хромосом (табл. 7).

Обращает на себя внимание, что при ассоциации 3 и более хромосом выявлена достоверная разница между трансгенным хряком и его потомками (табл. 7). Та же тенденция сохраняется при подсчете всех типов ассоциаций.

Таблица 7.

Количество ассоциаций хромосом свиней на метафазную пластинку.

Группа животных	Количество хромосомных ассоциаций			
	2-х хромосом	3-х хромосом	Более 3-х хромосом	Общее число ассоциаций
Трансгенный хряк	1.59 ± 0.39	0.76 ± 0.20	0.53 ± 0.15	2.88 ± 0.44
Потомки (F-1)	1.16 ± 0.10	$0.22 \pm 0.05^*$	$0.13 \pm 0.04^*$	$1.52 \pm 0.10^{**}$
Контроль	1.00 ± 0.14	$0.19 \pm 0.07^{**}$	$0.00 \pm 0.0^{***}$	$1.19 \pm 0.16^{**}$

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ (уровень достоверности различий с трансгенным хряком)

В контрольной группе практически не выявлены ассоциации 4 и 5 хромосом, в то время как у трансгенного хряка наблюдаются метафазные пластинки с такими ассоциациями (Рис. 2).

Проведенное исследование не позволяет однозначно объяснить высокую эмбриональную и постнатальную смертность потомства трансгенного хряка. Возможно, что происходят нарушения в геноме на разных уровнях. Нельзя исключить того, что способность хромосом трансгенного хряка вступать во множественные ассоциации, может передаваться потомству, что повлечет за

собой риск не расхождения хромосом, как в мейозе, так и в митозе, ведущего к несбалансированности генома, что подтверждают показатели МТ-теста.

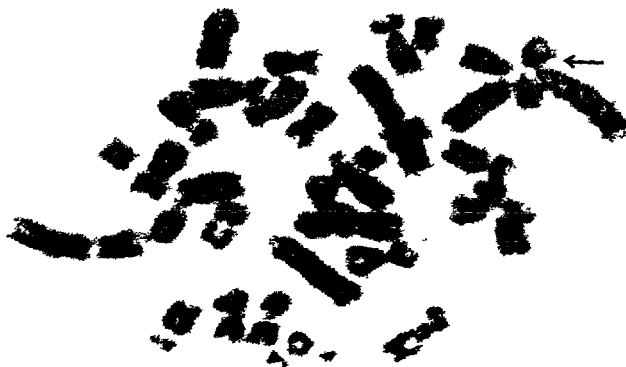


Рис. 2. Митотические хромосомы трансгенного хряка с ассоциацией пяти акроцентрических хромосом (G-окраска).

Таким образом, впервые показана повышенная способность метафазных хромосом трансгенного хряка с интегрированным геном релизинг фактора гормона роста человека, находящегося под контролем металлотионеинового гена мыши, к образованию ассоциаций нескольких хромосом.

3.8. Экспрессия репортерных генов у предимплантационных зародышей сельскохозяйственных животных.

Для идентификации и селекции трансгенных эмбрионов, а также для выявления инициации экспрессии репортерных генов в эмбриональном геноме в настоящем исследовании были использованы два гена LacZ и GFP с различными промоторами.

3.8.1. Экспрессия гена LacZ в ранних эмбрионах кроликов.

В первой серии опытов ген Lac Z в концентрации 2,5 нг/мкл был микроинъектирован в пронуклеус с помощью микроманипулятора через 18-20 часов после спаривания. Во второй серии опытов проводили коинъекцию гена Lac Z с MAR (Matrix Attachment Regions) областями также в концентрации 2,5 нг/мкл. MAR-элементы были получены от глобинового гена цыпленка и любезно предоставлены Dr. A.E.Sippel (Германия).

В таблице 8 представлены результаты, полученные после микроинъекции 2-х генных конструкций в зиготы кроликов. Эмбрионы фиксировали и окрашивали X-gal через 24, 48, 72 и 96 часов.

Введение двух репортерных генетических конструкций CMV-LacZ и SV-40-LacZ в геном кроликов сразу после оплодотворения позволили заключить следующее: ген LacZ может служить маркером для изучения, как начальных этапов экспрессии генов, так и в процессе дальнейшего развития

организма. Использование двух разных гетерологичных промоторов не оказало значительного влияния на эффективность трансгеноза.

Таблица 8.

Число эмбрионов после инъекция гена LacZ с разными промоторами и MAR-последовательностей в зиготы кроликов в разное время культивирования.

Время культивирования (ч)	pMV-LacZ	pCMV-LacZ +MAR	SV-40-LacZ	SV-40-LacZ +MAR
24	4	3	27	44
48	17	8	33	32(3)
72	30	20(2)	47(2)	46(1)
96	16(1)	17	26(1)	23(2)
Всего:	67(1)	48(2)	133(3)	145(6)

Примечание: В скобках отмечено количество эмбрионов, экспрессирующих В-галактозидазу. -

У кроликов начало активации экспрессии гена Lac Z, под контролем CMV-промотора, выявлено на стадии 6-бластомеров, а под контролем SV-40 промотора - на стадии 4-бластомеров. Мозаичный паттерн экспрессии был характерен для большинства эмбрионов, причем интенсивность экспрессии гетерогенна даже в пределах одного эмбриона. Применение MAR-последовательностей даже в виде коинъекции приводит к увеличению выхода трансгенных эмбрионов.

3.8.2. Экспрессия GFP гена у эмбрионов коров, полученных in vitro.

Зиготы были получены in vitro из ооцит кумулюсных комплексов (ОКК) по общепринятой методике (Dusztwska A.M. et al., 2000). Микроинъекцию трансгенной конструкции pCX-EGFP проводили в пронуклеус при использовании микроманипулятора Leitz. Экспрессию GFP гена в эмбрионах определяли через 168 часов культивирования в среде Menezo B-2, используя флуоресцентный микроскоп Fluover FS и стандартный фильтр FITC.

Было проведено 6 экспериментов с эмбрионами, полученными из ОКК методом in vitro созревания, оплодотворения, введения гена GFP в зиготы в концентрации 3нг/мкл, 5 нг/мкл и дальнейшего развития. В четырех экспериментальных группах (279 зигот, из которых в контроле 41) после введения гена GFP в зиготы и культивировании в течение 48 часов, количество поделившихся эмбрионов колебалось от 54.5 до 72.7% (в среднем 62.45%), в то время как в контроле, этот показатель варьировал от 83.3 до 90.0% (в среднем 88.05%). Очевидно, что на начальных стадиях культивирования процесс микроинъекции оказывает негативное влияние на развитие эмбрионов коров, полученных из ОКК in vitro. Тем не менее, в контроле при длительном культивировании эмбрионов (168 часов) в питательной среде Menezo B-2 в среднем 44% эмбрионов достигло стадии морулы и бластоцисты, а в экспериментальных группах в среднем 32.2%. Следовательно, отсеив нежизнеспособных эмбрионов, полученных in vitro при длительном

культивировании, незначительно отличается в экспериментальных группах от контрольных и составляет приблизительно третью часть от исходных данных.

Экспрессию гена GFP выявляли по наличию зеленой флуоресценции в эмбрионах. В первой группе была выявлена экспрессия у 3 эмбрионов (4.9%), среди которых два находились на стадии морулы и один - на стадии бластоцисты. У одной морулы была 100%-я экспрессия, т.е. все клетки обладали зеленой флуоресценцией, а у другой морулы только 50% клеток флуоресцировали. У бластоцисты отмечено четверть флуоресцирующих клеток (25%). Следовательно, у последних двух эмбрионов отмечен мозаичный характер экспрессии. Во второй и четвертых сериях эксперимента количество трансгенных эмбрионов было меньшим (2.2% и 1.7%). В третьей серии экспериментов не было выявлено эмбрионов с экспрессией гена GFP. Несмотря на то, что эмбрионы были подвергнуты воздействию центрифугирования (1200g) и микроинъекции, повреждающий эффект был выявлен только на начальных стадиях развития (2-4 blastomeres) и был нивелирован на поздних стадиях развития (moula-blastocysta).

В пятой и шестой экспериментальных группах было использовано 262 эмбриона, среди которых 64 эмбриона были контрольными. После 48 часов культивирования поделились 48% зигот, в то время как в контрольной группе процент поделившихся зигот был значительно выше (81,25%). Спустя 168 часов культивирования процент морул-бластоцист в контрольной группе (39,06%) также был выше, чем в инъецированной группе (25,37%). Одной из причин более низкого уровня развития морул и бластоцист в данной группе экспериментов, по сравнению с более ранними исследованиями, может быть увеличение концентрации ДНК, используемой для инъекции. Было идентифицировано три GFP положительных эмбриона коров после пронуклеарной микроинъекции генной конструкции pCX-GFP по зеленой флуоресценции эмбрионов, что составляет 1,51% эффективности трансгеноза или 6,52% от количества морул/бластоцист, причем из трех трансгенных эмбрионов только один был полностью GFP положительным. Средняя эффективность получения трансгенного крупного рогатого скота, как сообщалось другими авторами, составляет менее 1% (Wall J et al., 1996), но многие были мозаиками, а эффективность получения 100% трансгенных животных очень низка и изменяется в пределах от 0,038 до 0,22% (Chen R- et al., 1999).

Таким образом, экспрессию GFP гена можно использовать для селекции эмбрионов коров, что значительно повысит эффективность трансгеноза. Кроме этого, трансгенные эмбрионы могут служить генофондом для получения трансгенных клонированных животных.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны приемы приготовления препаратов хромосом из тканей 3-дневных эмбрионов и определен уровень спонтанных нарушений хромосом кур. Частота таких нарушений у кур породы леггорн, составила 5.88%.
2. По своим морфометрическим параметрам и по локализации G-полос макрохромосомы кур легко идентифицируются и проявляют гетероморфизм среди гомологов. Проведено картирование G-полос первой пары аутосом с количественной оценкой длины, локализации и интенсивности окрашивания этих полос.
3. Репродукция макро- и микрохромосом кур идет на протяжении всего S-периода с преимущественной репликацией ДНК микрохромосом в первой половине S-фазы, в отличие от W-хромосомы, активно синтезирующейся в конце периода синтеза ДНК. Половые ZZ-хромосомы петухов репродуцируются в течение S-фазы синхронно. По количественной регистрации включения ^3H -тимидина на протяжении всей S-фазы определено относительное количество ДНК в макрохромосомах (73.7%) и микрохромосомах (26.3%).
4. Внутрихромосомная асинхронность синтеза ДНК в течение S-периода тесно связана с особенностями линейной дифференцированности хромосом кур.
5. Методом RBA-окрашивания охарактеризована репликационная активность генома кролика второй половины S-фазы. Показана взаимосвязь процессов репликации и конденсации хромосом кролика на примере сравнительного анализа RBA-окрашенных хромосом, находящихся на разных уровнях конденсации.
6. ДНК - репликативные процессы функционально связаны с морфологическими изменениями в пронуклеусах кролика. В начале S-фазы мужской пронуклеус в своем объеме уступает женскому, но обладает более сильно выраженной репликативной активностью. В середине S-фазы, когда оба пронуклеуса одинаковы по своим размерам, синтез ДНК протекает с одинаково сильной интенсивностью. Во второй половине S-периода мужской пронуклеус становится больше женского, но интенсивность репликации ДНК затухает по сравнению с женским. Выявлены два типа хроматина, которые отличаются по времени репликации ДНК уже на одноклеточной эмбриональной стадии развития.
7. Методом микроинъекции генов соматотропной оси в ранние эмбрионы получены трансгенные животные: 11 трансгенных кроликов с интегрированными генами рилизинг фактора гормона роста человека; 5 трансгенных кроликов, в геноме которых интегрированы векторные последовательности и гены гормона роста быка; 4 трансгенных свиньи, несущих в своем геноме ген рилизинг фактора гормона роста человека.
8. Эффективность переноса генов соматотропной оси у кроликов составила 10,2% к числу родившихся (от 1.9 до 22.2%) или 1.7% к числу трансплантированных эмбрионов (от 0.27 до 4.7%). У свиной эффективность

трансгеноза была 15% к числу родившихся или 1.4% к числу трансплантированных эмбрионов.

9. Интеграция рост стимулирующих генов hGRF и bGH в геном кроликов имеет два противоположно выраженных фенотипических эффекта: увеличение или уменьшение массы тела по сравнению со своими сверстниками. Отрицательными фенотипическими эффектами у трансгенных кроликов и свиней можно считать снижение либидо у самцов, увеличение количества мертворожденных животных, высокая эмбриональная и постнатальная смертность трансгенных кроликов, свиней и их потомков.

10. После интеграции генов hGRF и bGH в геном трансгенных кроликов и свиней трансгенные потомки первого поколения наследовали не только генотип, но и фенотипические особенности, такие как замедленные или ускоренные темпы роста по сравнению с контрольными сверстниками.

11. После введения чужеродных генов, в ранние эмбрионы кроликов, частота эритроцитов с микроядрами у родившихся животных, была в два раза выше в экспериментальной группе по сравнению с контрольной группой, а у свиней - в 3 раза.

12. Впервые показана повышенная способность метафазных хромосом трансгенного хряка с интегрированным геном рилизинг фактора гомона роста человека, находящегося под контролем металлотионеинового гена мыши, к образованию множественных ассоциаций хромосом.

13. У кроликов начало активации экспрессии гена Lac Z, под контролем CMV-промотора выявлено на стадии 6-бластомеров, а под контролем SV-40 промотора - на стадии 4-бластомеров.

14. У трансгенных эмбрионов обнаружена экспрессия репортерных генов, как во всех клетках, так и в отдельных бластомерах, причем интенсивность экспрессии гетерогенна, даже в пределах одного эмбриона. Применение MAR-последовательностей в виде коинъекции приводит к увеличению выхода трансгенных эмбрионов.

15. Регистрация характера экспрессии GFP гена в эмбрионах коров позволяет отбирать только трансгенные эмбрионы, что значительно повышает эффективность трансгеноза.

ПРАКТИЧЕСКИЕ ПРЕДЛОЖЕНИЯ

На основе материалов диссертации разработаны методические рекомендации по исследованию хромосом, дифференциальной окраске и использованию приемов генетической инженерии для оценки изменения генома сельскохозяйственных животных, которые могут найти применение в различных молекулярно-цитогенетических и биотехнологических лабораториях, при проведении экологического мониторинга окружающей среды, оценке племенных животных и при внедрении различных технологий в сельском хозяйстве.

При практическом использовании животных, которым были микроинъекцированы чужеродные гены, необходимо проведение цитогенетического мониторинга. Применение репортерных генов и MAR-последовательностей повышают выход трансгенных эмбрионов,

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Репродукция хромосом кур в конце периода синтеза ДНК // Цитология и генетика. 1975. Т.9. №3. С.214-217.
2. Трофимова (Козикова) Л.В. Особенности получения препаратов хромосом птиц // Методические рекомендации ВНИИРГЖ. Л. 1976. С.20-30.
3. Трофимова (Козикова) Л.В. Применение автордиографии для исследования хромосом // Методические рекомендации ВНИИРГЖ. Л. 1976. С.47-56.
4. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф., Корибин. Методические подходы к гибридизации нуклеиновых кислот // Методические рекомендации ВНИИРГЖ. Л. 1976. С.56-61.
5. Трофимова (Козикова) Л.В., Носач А.К. Методы выявления поперечной исчерченности хромосом сельскохозяйственных животных // Методические рекомендации ВНИИРГЖ. Л. 1976. С.61-65.
6. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Хромосомный набор клеток эмбриональных фибробластов кур // Сб. научных трудов ВНИИРГЖ. Л. "1976. Вып.23. С.70-75.
7. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Изменение числа микрохромосом в процессе спирализации макрохромосом // Генетика. 1977. Т.13. №5. С.806-810.
8. Трофимова (Козикова) Л.В. Репликация ДНК по длине макрохромосом кур // Бюллетень ВНИИРГЖ. Л. 1977. Вып.24. С.6-9.
9. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Репликация ДНК микрохромосом у кур // Материалы IV всесоюзного симпозиума по структуре и функции клеточного ядра. Алма-Ата. 1977. С.78-80.
- Ю.Яковлев А.Ф., Носач А.К., Бавин В.Г., Трофимова (Козикова) Л.В. Различия в степени асинхронности синтеза ДНК хромосом у домашних млекопитающих и птиц // Материалы 3-го всесоюзного съезда ВОГиС. Л. 1977. С.243-244.
- П.Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Синтез ДНК первых двух пар аутосом клеток костного мозга цыплят // Цитология и генетика. 1978. Т.12. №2. С.125-129.
- 12.Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Картирование G-полос первой пары аутосом у домашних кур // Цитология. 1978. Т.20. №12. С.1379-1383.
- 13.Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Включение экзогенных ДНК в хромосомы кур // Бюллетень ВНИИРГЖ. Л. 1979. Вып.37. С.8-11.

- Н.Трофимова (Козикова) Л.В., Соколова Л.Н., Яковлев А.Ф. Параметры клеточного цикла домашних кур // Сб. научных трудов ВНИИГРЖ. Л. 1979. Вып.28. С.113-117.
15. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф. Связь внутрихромосомной асинхронности репликации ДНК макро- и микрохромосом куриных эмбриональных фибробластов. // Материалы всесоюзного VII симпозиума по структуре и функции клеточного ядра. Харьков. 1980. С.52-53.
16. Трофимова (Козикова) Л.В. Цитогенетическая характеристика гибридов петуха с цесаркой и их исходных форм. // Сб. «Экологическая генетика растений и животных». Кишинев. 1981. С.121-122.
- П. Трофимова (Козикова) Л.В., Яковлев А.Ф., Носач А.К., Бавин В.Г. Техника G-окраски хромосом сельскохозяйственных животных // Методические рекомендации «Методы дифференциальной окраски хромосом сельскохозяйственных животных». Л. 1981. С.5-10.
18. Трофимова (Козикова) Л.В. G-окрашивание хромосом птиц // Методические рекомендации. «Методы дифференциальной окраски хромосом сельскохозяйственных животных». Л. 1981. С.9-11.
19. Яковлев А.Ф., Носач А.К., Бавин В.Г., Трофимова (Козикова) Л.В. Репродукция хромосом в течение S-периода // XXXIII ЕАЖ. Ленинград. 1982. С.1-11.
20. Трофимова (Козикова) Л.В. Асинхронность синтеза ДНК макро- и микрохромосом кур // Материалы 4-го съезда ВОГиС. 1981, Т.1 С.246-247.
21. Козикова Л.В. Идентификация половых хромосом цесарок // Цитология и генетика. 1984. Т.4№3 С.231-232.
22. Козикова Л.В., Яковлев А.Ф. Влияние процесса криоконсервации семени на частоту и спектр хромосомных нарушений у кур // Материалы III национальной конференции. Болгария. Пловдив. 1984. Т.2 С.296-298.
23. Kozikova L.V. Study of reproduction of chromosomes in hens // 6-th International symposium on Actual Problems of Avian Genetics. Smolenice. Czechoslovakia. 1985. P.171-177.
24. Родионов А.В., Козикова Л.В., Чельшева Л.А., Раусепп, Куммик Т., Эрматов Ю.А. Изменчивость кариотипов сельскохозяйственных птиц // Сб. научных трудов ВНИИГРЖ. Л. 1987. С.63-73.
25. Газарян К.Г., Андреева Л.Е., Серова И.А., Тарантул В.В., Кузнецова Е.Д., Хайдарова Н.В., Генинг Л.В., Кузнецов Ю.М., Газарян Т.Г., Смирнов А.Ф., Козикова Л.В., Ефимов А.М. Получение трансгенных кроликов и мышей, содержащих ген гормона роста быка // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 1988. Т.10. С.26-32.
26. Kozikova L.V., Steklenev E.P. Hybridization of domestic hen and the guinea fowl // 8-th International symposium on Actual Problems of Avian Genetics. Smolenice. Czechoslovakia. 1989. P.153-157.
27. Rosochacki S.J., Smirnov A.F., Kozikova L.V., Sadovska J., Efimov A., Zwierzchowski L. Kroliki transgeniczne niosace mMT-GRF // XXV Zjazd Polskiego Towarzystwa Biochemicznego Materialy. Torun. Poland. 1989. P.309.

28. Козикова Л.В., Полеев А.В. RBA-маркеры хромосом кролика // Материалы IV национальной конференции по цитогенетике. Враца. Болгария. 1989. С.200-2001.
29. Козикова Л.В., Медведев С.Ю., Яковлев А.Ф., Рамша Ю.К. Влияние микроинъекции генов на трансплантацию зигот кроликов // Материалы всесоюзного совещания по трансплантации эмбрионов сельскохозяйственных животных. Алма-Ата. 1989. С.23-25.
30. Козикова Л.В., Медведев С.Ю., Бавин В.Г., Ефимов А.М., Смирнов А.Ф., Яковлев А.Ф. Перенос генов в зиготы и эмбрионы животных // Методические рекомендации «Использование приемов генетической инженерии для оценки и изменения генома сельскохозяйственных животных». Ленинград. 1990. С.11-22.
31. Kozikova L.V., Kravtsov V.Y., Medvedev S.Y., Yakovlev A.F. Micronuclei test (MT) on rabbits obtained after microinjection with human growth-hormone realising factor (hMT-GRF) to zygotes // «Through to oocyte to the embryo». 4th Franco-Czechoslovak meeting. Prague. 1990. P.90.
32. Kozikova L.V., Bulla J., Babusik P., Kuliskova L., Pivko J., Uhrin P. Transgenic animals and their use in agriculture // 5th International symposium «Biological and technical intensification of production and increase of animal products quality» Nitra. Czechoslovakia. 1990. P.25-27.
33. Rosochacki S.J., Kozikova L.V., Efimov A., Sadovska J., Smirnov A.F., Zwierzchowski L. Successful integration of mMT-GRF gene into rabbits // 5th International symposium «Biological and technical intensification of production and increase of animal products quality» Nitra. Czechoslovakia. 1990.
34. Kozikova L.V., Sirotkin A.V., Pivko J. Pattern of RNA synthesis in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation // Physiol. Res. (Czechoslovakia) 1991. №40. P.641.
35. Kozikova L.V. Mapping late replication zones of rabbits chromosomes // XVth Geneticke dny. Ceske Budejovice. Czechoslovakia. 1991. P.82.
36. Kozikova L.V., Sirotkin A.V. Autoradiographical analysis of RNA synthesis in bovine oocytes and cumulus cells during in vitro maturation // J. of Reproduction and Fertility. Abstract. 1992. SerJte9. P.86.
37. Bulla J., Pivko J., Babusik P., Paska I., Grafenau P., Oberfranc M., Kozikova L.V. et al. Osipana- vhodny model pre tvorbu traqnsqennych zvierat // Zb. Referatov XIII Celoslovenskeho seminaru o reprodukcii hospodarskych zvierat. Liptovsky Ondrej. Czechoslovakia. 1992. P.175-179.
38. Rosochacki S.J., Smirnov A.F., Kozikova L.V., Efimov A., Sadovska J., Zwierzchowski L. Transfer of human growth-related genes into rabbits // Animal Science Papers and Reports. 1992. №9. P.81-90.
39. Kozikova L.V., Kalasnikova L., Vasicek D., Baurova M., Bulla J., Babusik P., et al. Prenos genu do samcieho prvojadra zygoty kralika // Zb. Referatov. XVI Geneticke Dny. Ceske Budejovice. Czechoslovakia. 1992. P. 101-102.

40. Kozikova L.V. Cytogenetická analýza transgenného kanca a jeho potomstva // XVI Dni Genetiky Hospodarských zvierat. Nitra. Slovenská republika. 1993. P.16-18.
41. Bulla J., Kalasnikova L., Kozikova L.V., et al. Zivotoschopnost potomkov transgenných zvierat // Zb. Referatov. Genetická Konferencia GSGM «40 let Dvousrobovice DNA». Bmo. Czech Republic. 1993. P.6.
42. Kalasnikova L.A., Kozikova L.V., Rasheed S.T. et al. Mortality of transgenic animals offsprings // Proceeding of the 1st European Conference on «Progress in Embryo Technology and Genetic Engineering in Cattle and Sheep Breeding». Krakov. Poland. 1994. P.212.
43. Козикова Л.В. Особенности кариотипа трансгенного хряка и его потомства // Генетика. 1994. Т.30 С.73.
44. Медведев С.Ю., Козикова Л.В., Яковлев А.Ф. Развитие in vitro и in vivo эмбрионов кроликов, микроинъекцированных геном рилизинг фактором гормона роста человека // Материалы международного симпозиума «Молекулярная генетика и биотехнология в оценке и изменении геномов сельскохозяйственных животных » Ленинград. 1994. С.21.
45. Козикова Л.В., Булла И. Цитогенетический анализ трансгенного хряка (MT-1/hGRF) и его потомства // Сб. научных трудов «Генноинженерные сельскохозяйственные животные » (Министерство науки и технич. политики Российской Федерации РАСХН). 1995. Вып.1. С.68-72.
46. Медведев С.Ю., Козакова Л.В., Босак Н.Г., Бавин В.Т., Яковлев А.Ф. Получение трансгенных кроликов и свиней, несущих ген рилизинг фактора гормона роста человека // Сб. научных трудов «Генноинженерные сельскохозяйственные животные » (Министерство науки и технич. политики Российской Федерации РАСХН). 1995. Вып.1. С.104-109.
47. Медведев С.Ю., Козикова Л.В., Бавин В.Г., Яковлев А.Ф. Рост и развитие трансгенных кроликов и свиней с перенесенным геном рилизинг фактора гормона роста человека // Сельскохозяйственная Биология 1995. №6. С.43-48.
48. Sirotkin A.V., Kozikova L.V., Bulla J. Autoradiographical analysis of RNA synthesis in bovine oocyte - cumulus complexes during in vitro maturation // Zivocisna Vyroba. Czech Republic. 1997. №42. P.487-493.
49. Rosochacki S.I., Kozikova L.V. Transgenic rabbit zygotes with pCMV-LacZ gene/m Symposium of Polish Genetics Society. J.of Appl.Genet1998. P.140.
50. Rosochacki S.I., Kozikova L.V. Expression of LacZ reporter gene in early studies of rabbit zygotes // 25th Silver Jubilee FEBS Meeting. 1998. P. 112. The Bella Center, Copenhagen, Denmark. 51, Козикова Л.В., Росохацкий С.И., Звиежковский Л. Микроинъекция гена LacZ и нуклеотидных последовательностей MAR в оплодотворенные яйцеклетки кроликов: раннее эмбриональное развитие и экспрессия гена LacZ // Цитология . 1999. №3/4. С. 280-281.

51. Козикова Л.В., Росохацкий СИ., Звиежковский Л. Микроинъекция гена LacZ и нуклеотидных последовательностей MAR в оплодотворенные яйцеклетки кроликов: раннее эмбриональное развитие и экспрессия LacZ // Цитология. 1999. № 3/4. С.280-281.
52. Козикова Л.В., Терлецкий В.П., Пивко Ю., Киселева Т.Ю. Репликация ДНК в пронуклеусах кролика // Сб. научных статей Украинской академии наук «Разведение и генетика с.х. животных» Киев. 1999. №31-32. С. 102-104.
53. Rosochacki S.J., Kozikova L.V., Poloszynowich J. Integracja genu reporterowego LacZ do zarodkow. 1 Krajowy kongres Biotechnologii. Wroclaw. Poland. 1999. P.111-117.
54. Козикова Л.В., Медведев С.Ю., Попов А.В., Андреева Л.Е., Яковлев А.Ф. Трансгенные животные // Зоотехния. 2000. №11. С.12-13.
55. Козикова Л.В., Росохацкий СИ. Мозаичная экспрессия гена LacZ у ранних эмбрионов кролика// Материалы 2-го всероссийского съезда ВОГиС С.-Петербург, 2000. т.2. С.82-83.
56. Козикова Л.В., Росохацкий СИ., Звиежковский Л., Терлецкий В.П. Влияние MAR-последовательностей на экспрессию гена LacZ //Сб. «Актуальные проблемы биологии в животноводстве». Боровск. 2000. С.401-402.
57. Rosochacki S.J., Kozikova L. Transgenic animals with growth hormone and growth hormone related genes// Molecular Farming. La Grande Motte (France). Ed. by J.P. Toutant, E. Balaz. 2000. P.132-143.
58. Rosochacki S.J., Kozikova L. Pronuclear microinjection, DNA integration, transgenic mosaicism in rabbit embryos // FEBS. 2001.V.268. P.216-219.
59. Rosochacki S.J., Duszewska A., Kozikova L., Olszewski R. Expression of GFP in microinjected bovine embryos //Animal Science Paper Report. 2001. №19. P. 193-202.
60. Kozikova L.V., S.I.Rosochacki, A.F.Yakovlev. Expression of GFP. gene in the rabbit embryos // 1th Intern.Congr. Biotechnology - state of the art and prospects of development. Moskow. 2002. P. 157-158.
61. Yakovlev A., Kozikova L., Medvedev S. Obtaining accelerated growth effect, when transfer of a somatotropic axis genes to the rabbits // 53th EAAP annual meeting. 2002. Cairo. P.84-85.
62. А.Ф.Яковлев, Л.В.Козикова, СКХМедведев, КБулла, С.Росохацкий. Анализ состояния трансгенных животных с генами соматотропной оси // Материалы симпозиума «Дни польской науки в России». СПб. 2002. С.31-34.
63. Козикова Л.В., Росохацкий СИ. Экспрессия репортерных генов в раннем эмбриогенезе у млекопитающих // Материалы симпозиума «Дни польской науки в России ». СПб. 2002. С.38-42.
64. Rosochacki S.J., Strzelecka M., Kozikova L., Matejczyk M., Oblap R., Poloszynowicz J., Zwierzchowski L. Expression of microinjected gene lacZ during first cleavages of rabbit embryos. Folia Biol. 2002. V.50. P. 61-67.
65. Козикова Л.В., Яковлев А.Ф. Селекция эмбрионов крупного рогатого скота по экспрессии гена GFP // Цитология. 2003. № 11. С.987.

66. Kozikova L.V., Rosochacki S.I. Noninvasive fluorescent screening of microinjected bovine embryos to predict trasgene integration // Folia biol. 2003. V. 51. P. 97-104.
67. Duszewska A., Kozikova L., Cybulska M, Korwin-Kossakowski M., Was B., Poloszynowicz J., Wicinska K., Szydlak H., Rosochacki S.J. The use of green fluorescent protein (GFP) to select bovine embryos // J. Animal Feed Science. 2003. V.12. 73-83.
68. Кози́кова Л.В., Росохацкий СИ., Яковлев А.Ф. Особенности первого раунда репликации ДНК в мужском и женском пронуклеусах кролика и активация эмбриональной экспрессии репортерных генов // Материалы 3-го всероссийского съезда ВОГиС. «Генетика в XXI в.: современное состояние и перспективы развития». Москва. 2004. Т. I. С.38.
69. Кози́кова Л.В., Яковлев А.Ф. Цитогенетический анализ эмбрионов кур, полученных путем искусственного осеменения криоконсервированной спермой разных сроков хранения // Цитология. 2004. Т.46. №9. С.803-804.
70. Кози́кова Л.В., Росохацкий СИ., Душевска А., Яковлев А.Ф. Активация эмбриональной экспрессии репортерных генов сельскохозяйственных животных // Материалы международной научной конференции «Молекулярная генетика, геномика и биотехнология». Минск. 2004. С.160-161.

Kos —

Подписано в печать 11.03.05
Формат 60x84 1/16 Бумага офсетная
Объем 2 печ. л. Тираж 100 экз. Заказ №85

Отпечатано на ризографе ГНУ СЗНИИМЭСХ

512

22 MAR 2005

1631