

**МОЗАИЧНАЯ ЭКСПРЕССИЯ РЕПОРТЕРНОГО ГЕНА *lacZ*  
ПОД КОНТРОЛЕМ 5'-РЕГУЛЯТОРНЫХ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ  
ГЕНА АЛЬФА-S<sub>1</sub>-КАЗЕИНА У ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ**

© И. А. Серова,<sup>1</sup> Л. Е. Андреева,<sup>2</sup> Н. В. Хайдарова,<sup>2</sup> Л. П. Б. Дуас,<sup>3</sup>  
Г. А. Дворянчиков,<sup>4</sup> И. А. Бурков,<sup>1</sup> Н. В. Багинская<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, *irina\_serova2004@mail.ru*,

<sup>2</sup> Институт молекулярной генетики РАН, Москва, *leandr@img.ras.ru*,

<sup>3</sup> *Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, luciene@biof.ufrj.br, u*

<sup>4</sup> *University of Miami School of Medicine Miami, FL, USA, gdvor@yahoo.com*

Явление неравномерной экспрессии трансгена в клетках и тканях трансгенных животных получило название клеточного мозаицизма. Данное сообщение посвящено исследованию клеточного мозаицизма у потомков пяти трансгенных мышей-основателей, несущих репортерный ген *lacZ* под контролем 5'-регуляторных последовательностей разной длины гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* коровы и козы. В молочных железах лактирующих самок всех трансгенных линий выявлялась активность β-галактозидазы *E. coli*, но распределение было различным. Наблюдались два типа клеточного мозаицизма: дольковый, или клональный, когда большинство или все клетки дольки были позитивны по β-галактозидазе, и стохастический, проявляющийся только в индивидуальных клетках, разбросанных по всей молочной железе. Предполагается, что стохастический тип экспрессии трансгена осуществляется только в клетках на терминальной стадии дифференцировки лактирующей молочной железы, а клональный тип возникает из пролиферирующей клетки-предшественницы, способной к формированию целой дольки. Эктопическая экспрессия гена-репортера у исследованных потомков пяти линий трансгенных животных была выявлена только в подчелюстной слюнной железе в линиях двух основателей, № 16 и 37, и в фолликулах яичников на стадии атрезии в линии № 37. Такая слабовыраженная эктопическая экспрессия исследованных трансгенов свидетельствует о том, что использованные при их конструировании 5'-регуляторные последовательности разной длины гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* способны обеспечить достаточно надежную тканеспецифичность их экспрессии.

Ключевые слова: трансгенез, клеточный мозаицизм, ген-репортер *lacZ*.

Клеточный мозаицизм в экспрессии трансгенов широко изучается в последнее время с точки зрения феноменологии этого явления и поиска механизмов его формирования. Экспрессия одного и того же трансгена может варьировать в широких пределах среди потомков разных линий и внутри одной трансгенной линии животных (Krepulat et al., 2005). Даже у клонированных трансгенных эмбрионов млекопитающих, произошедших из одной клетки, экспрессирующей трансген, наблюдаются различные уровни экспрессии в разных бластомерах (Park et al., 2002). В настоящее время ведутся интенсивные исследования для расшифровки механизмов возникновения клеточного мозаицизма у трансгенных животных как одной из важных фундаментальных проблем генной регуляции. Точное предсказание уровня экспрессии экзогенных генов в тканях и органах трансгенных животных также важно при создании животных-биореакторов.

Эффективность экспрессии трансгенов напрямую зависит как от структуры самого трансгена (Festenstein et al., 1996; Pape et al., 1999; Ramirez et al., 2001; Pantano et al., 2003; Liew et al., 2007), так и от последовательностей реципиентного генома в месте его интеграции (Dorer, He-

nikof, 1994; Dobie et al., 1996; Martin, Whitelaw, 1996; Smith et al., 2008; Williams et al., 2008). Показано также, что уровень экспрессии трансгена может зависеть или не зависеть от количества его копий (Garrick et al., 1998; Ramirez et al., 2001; Kwaks et al., 2003; Williams et al., 2008), его гомо- или гемизиготности (Dobie et al., 1996; Opsahl et al., 2002, 2003), от эпигенетического переключения между статусом экспрессии трансгена и сайленсинга (Garrick et al., 1998; Krepulat et al., 2005; Ramunas et al., 2007), может изменяться с возрастом животного (Robertson et al., 1996; Schulz et al., 2007; Wang et al., 2008), а также по другим, пока неизвестным причинам (Swenson et al., 2007). Все это приводит к вариабельности экспрессии трансгена на уровне целого организма и на уровне ткани.

Одним из методов оценки экспрессии трансгенов на клеточном уровне является использование генов-репортеров, в частности гена β-галактозидазы *E. coli* (*lacZ*). Достоинством этого подхода является возможность выявления клеточного мозаицизма в ткани-мишени, а также визуализации эктопической экспрессии трансгена.

Ранее нами была показана высокая тканеспецифическая активность гена гранулоцит-колониестимулирую-

щего фактора (Г-КСФ) человека под контролем 5'-регуляторных элементов различной длины гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* коровы в молочных железах лактирующих трансгенных мышей. Полученные данные показали широкую вариабельность в секреции Г-КСФ человека в молоке трансгенных мышей внутри одной линии и между животными разных линий (Дворянчиков и др., 2005).

С использованием этих же регуляторных последовательностей были созданы два вектора, pCLZ1 и pCLZ2, с геном-репортером *lacZ*, находящимся под контролем различающихся по длине регуляторных элементов гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* коровы, а также вектор pCLZ3 под контролем промоторно-энхансерной области гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* козы, высокогомологичной (95 % гомологии) промотору гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* коровы (Ramunno et al., 2005).

Целью исследования было изучение клеточного мозаицизма, т. е. оценка доли клеток с активным трансгеном в молочной железе у трансгенных мышей, несущих три разные конструкции, различающиеся длиной 5'-промоторных областей гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина*. Помимо этого, мы исследовали эктопическую экспрессию трансгенов.

## Материал и методика

Генно-инженерные конструкции. На основе рекомбинантной плазмиды pβgal-Basic (фирма Clontech), содержащей ген *lacZ*, были созданы три конструкции, различающиеся длиной 5'-регуляторной области гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина*: pCLZ1 — 721 п. н. (вместе с 1-м экзоном гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* коровы), pCLZ2 — 2001 п. н., включающую в себя 1-й экзон и 1-й интрон, и pCLZ3 — 3409 п. н., содержащую промоторно-энхансерный участок (–1943 п.н. до стартового кодона) и 1-й экзон, 1-й интрон и нетранслируемое начало (10 п. н.) 2-го экзона гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* козы.

Получение трансгенных мышей. Плазмидную ДНК (pCLZ1, pCLZ2 и pCLZ3) обрабатывали рестриктазами Xho I и Sal I. Смесь фрагментов подвергали электрофорезу в 0.8%-ном геле агарозы в присутствии красителя Crystal Violet (10 мкг/мл). Фрагменты ДНК размером 5.4 т. п. н. вырезали из агарозного геля после электрофореза рестриктной ДНК pCLZ1 и 10 т. п. н. после электрофореза рестриктных плазмид pCLZ2 и pCLZ3. ДНК из геля элюировали и очищали с помощью колонок Quick Spin фирмы QIAGEN.

Высокоочищенную ДНК разводили в ТЕ-буфере до концентрации 10 нг/мкл (Brinster et al., 1985). Микроинъекции ДНК производили в мужской пронуклеус зигот, полученных от скрещивания гибридных мышей F<sub>1</sub>(CBA×C57Bl), как описано ранее (Андреева, Серова, 1992).

Идентификация трансгенных животных с помощью ПЦР. Идентификацию трансгенных мышей проводили путем анализа лизатов тканей кончика хвоста мышей (длиной около 2 мм) по протоколу, размещенному на сайте [http://www.jax.org/imr/tail\\_nonorg.html](http://www.jax.org/imr/tail_nonorg.html), в буфере 50 mM KCl, 10 mM Трис, pH 8.3, содержащем 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 мг/мл желатина, 0.45 % (об/об) Nonidet P-40 и 0.45 % (об/об) Tween 20. В качестве прямого и обратного праймеров использовали *LacZ1* — 5'-acc-acc-gaa-gtg-acc-acc-gaa-t-3' и *LacZ2* — 5'-aag-cca-acg-ctt-att-acc-sag-c-3'. Продолжительность реакции составляла: 95 °C — 60 с, затем 35 циклов в режиме 95 °C — 30 с,

58 °C — 30 с, 72 °C — 30 с при удлинении последней стадии синтеза до 3 мин.

Гистохимическое выявление β-галактозидазы в тканях трансгенных мышей. Приготовление криостатных гистологических препаратов и проведение гистохимической реакции на β-галактозидазу выполняли по методам, описанным ранее (Ma et al., 2002). В качестве негативного контроля использовали образцы тканей от нетрансгенных мышей, а в качестве позитивного — от трансгенных мышей линии 129/Sv Rosa 26 :lacZ с конститутивной экспрессией гена *lacZ* во всех органах и тканях.

## Результаты

В экспериментах по микроинъекциям рекомбинантных ДНК в зиготы мышей были получены по одному основателю трансгенных линий: самец № 16 с конструкцией *pCLZ1* и самка № 37 с конструкцией *pCLZ2* и три основателя — самки № 7, 36 и 48 с конструкцией *pCLZ3*. В линии основателя № 16 наблюдалось отклонение от ожидаемого менделевского наследования трансгена: в пяти пометах F<sub>1</sub> трансген был выявлен только у самок, тогда как у 18 исследованных самцов он обнаружен не был. Важно отметить, что соотношение полов в потомстве было близко к ожидаемому 1 : 1 (20 самок и 18 самцов), что исключает наличие летального влияния трансгена на самцов. Такой характер наследования указывает на локализацию трансгена в X-хромосоме самца-основателя № 16, при скрещивании которого с нетрансгенными самками в F<sub>1</sub> все самки наследуют его X-хромосому, а самцы наследуют X-хромосому от нетрансгенных матерей. Следует также отметить, что у самца-основателя № 16 половина потомков в F<sub>1</sub> унаследовали трансген, что свидетельствует о включении его в геном на одноклеточной стадии развития эмбриона. Аналогичное, менделевское, наследование трансгена в F<sub>1</sub> наблюдалось у всех основательниц с трансгеном *pCLZ3*.

В линии самки-основательницы № 37 с конструкцией *pCLZ2* соотношение трансгенных и нетрансгенных потомков в F<sub>1</sub> было близко к 1 : 4. Такое отклонение от ожидаемого наследования трансгена 1 : 1 позволяет предположить, что интеграция трансгена произошла на стадии 2—4 бластомеров, т. е. самка-основательница № 37 представляла собой типичного мозаика по гаметам.

Гистохимический анализ β-галактозидазы как индикатора экспрессии трансгена у потомков проводили в F<sub>1</sub>—F<sub>3</sub>. Были сформированы следующие экспериментальные группы трансгенных животных (по 3—5 особей): 3-3.5-месячные самки и самцы; 4-недельные виргинные самки; самки на 14-е и 18-е сут беременности; лактирующие самки через 10 сут после рождения потомства. На криостатных срезах анализировали следующие органы и ткани: молочные железы, печень, почки, подмышечные лимфоузлы, селезенку, тимус, легкие, сердце, подчелюстные слюнные железы, семенники (кроме линии № 37), матку, яичники и кожу.

Экспрессия гена-репортера *lacZ* была выявлена в эпителиальных клетках лактирующей молочной железы у самок всех трансгенных линий, хотя по характеру проявления была различной. У самок линии № 16 с конструкцией *pCLZ1* и всех линий с конструкцией *pCLZ3* β-галактозидазная активность носила сходный характер и выявлялась точечными позитивными сигналами в отдельных клетках,

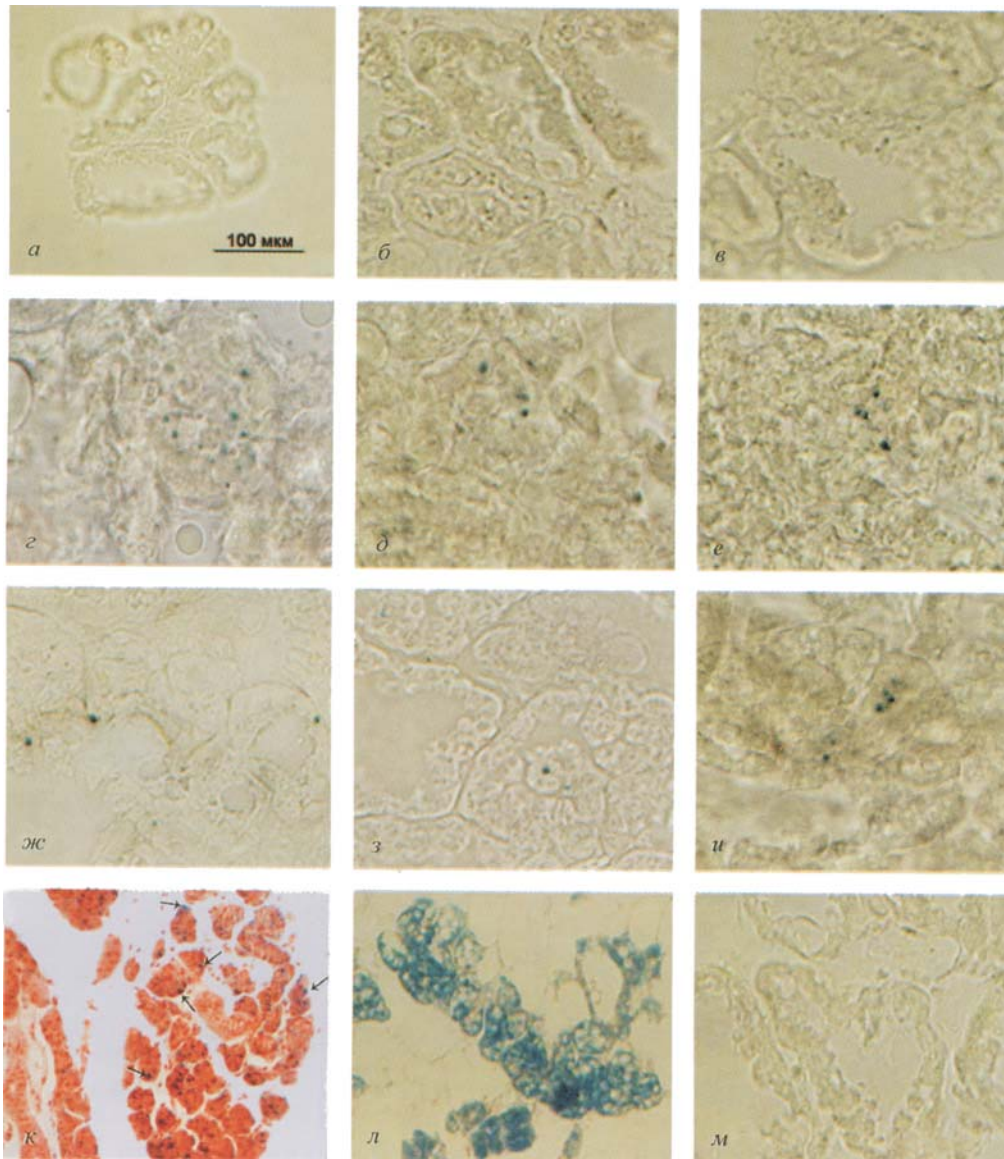


Рис. 1. Гистохимический анализ  $\beta$ -галактозидазной активности гена *lacZ* в молочных и слюнных железах трансгенных мышей с конструкцией *pCLZ1* у самок линии № 16 (а–е, к) и *pCLZ3* у линий № 7, 36 и 48 (ж–и).

Молочная железа: а — виргинной самки (экспрессия отсутствует); б — беременной самки на 14-е сут (экспрессия отсутствует); в — беременной самки на 18-е сут (экспрессия отсутствует); г–е — лактирующих самок линии № 16 (экспрессия видна в виде голубых точек); ж–и — лактирующих самок № 7, 36 и 48 соответственно (экспрессия видна в виде голубых точек); л — положительный контроль: самка линии 129/SvRosa 26 *LacZ*; м — отрицательный контроль: нетрансгенная самка; к — подчелюстная слюнная железа: экспрессия видна в виде голубых точек. Криостатные срезы 10 мкм. Окрашивание 1%-ным сафранином. Об. 20 $\times$ , ок. 10 $\times$ .

стохастически расположенных в дольках молочных желез лактирующих самок (рис. 1, г–и). Не было выявлено долек, полностью состоящих из позитивных клеток. Следует отметить, что экспрессия трансгена обнаружена на довольно низком уровне, большинство эпителиальных клеток в молочных железах были негативными, особенно с конструкцией *pCLZ3*. В молочных железах виргинных самок (рис. 1, а), а также у самок на 14-е и 18-е сут беременности в этих линиях экспрессии гена *lacZ* обнаружено не было (рис. 1, б, в).

Результаты анализа молочных желез у трансгенных самок в линии самки-основателя № 37 с конструкцией *pCLZ2* свидетельствуют о более высокой экспрессии трансгена, причем наблюдалась связь ее с такими физиологическими состояниями самок, как половое созревание, беременность и лактация (рис. 2). Например, у вир-

гинных самок не обнаружено экспрессии гена *lacZ* в молочной железе (рис. 2, а). Однако на 14-е и 18-е сут беременности уже появляются единичные эпителиальные клетки с экспрессией  $\beta$ -галактозидазы, расположенные как в протоках, так и в дольках молочной железы (рис. 2, б, в). У лактирующих самок позитивные эпителиальные клетки имели более высокую активность  $\beta$ -галактозидазы (рис. 2, г–е).

Обращает на себя внимание особый тип клеточного мозаицизма по экспрессии гена *lacZ* у этой линии, выражающейся чередованием целых долек позитивных и негативных по активности  $\beta$ -галактозидазы (рис. 2, г–е). Достаточно сложно определить долю позитивных и негативных долек во всей молочной железе, однако очевидно, что количество позитивных долек было существенно меньше, чем негативных. Интересно отметить, что нам не

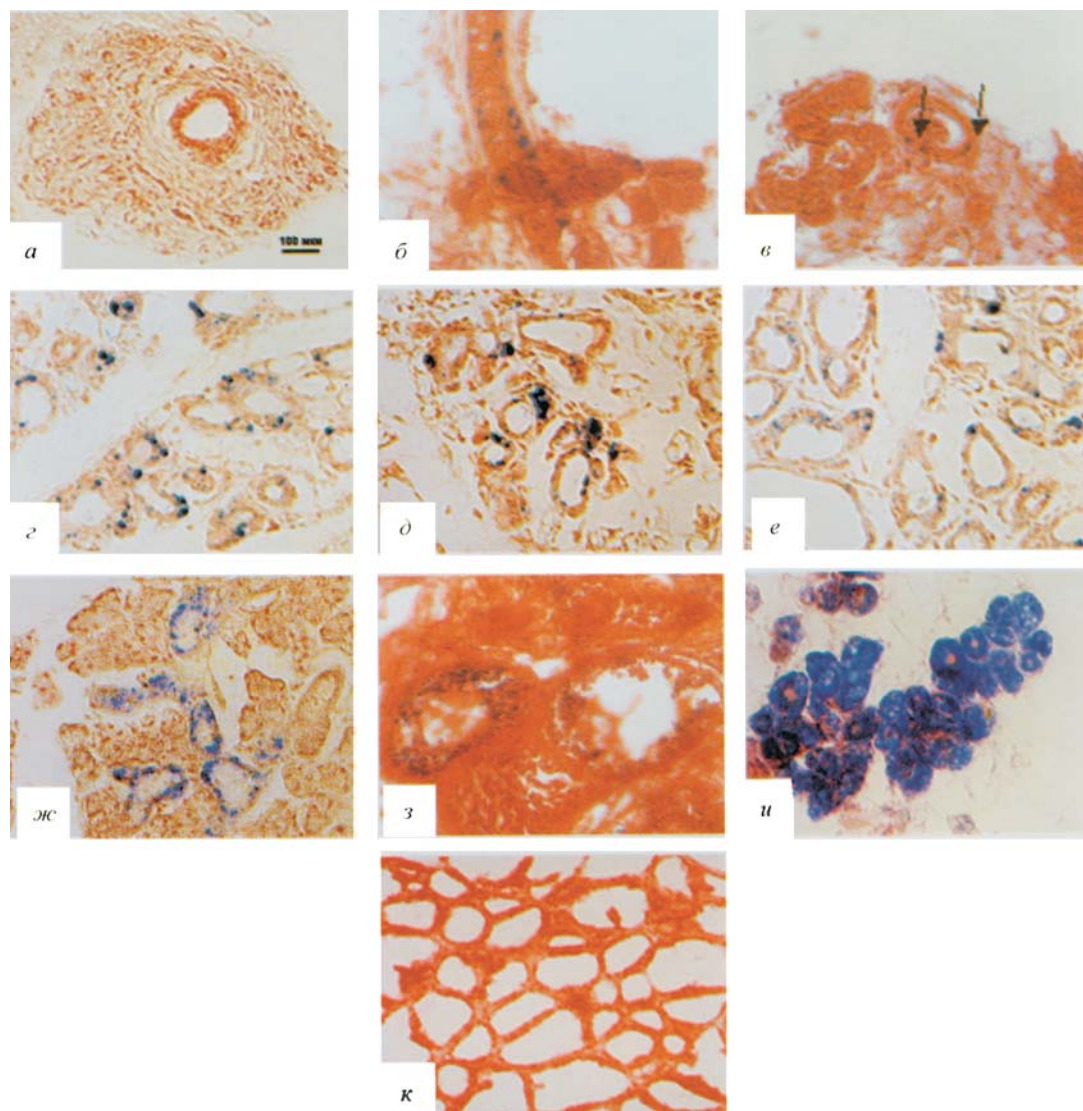


Рис. 2. Гистохимический анализ  $\beta$ -галактозидазной активности гена *lacZ* в молочных и слюнных железах и яичниках трансгенных мышей с конструкцией pCLZ2 у самок линии № 37.

Молочная железа: *a* — виргинной самки (экспрессия отсутствует); *б* — беременной самки на 14-е сут (экспрессия видна в отдельных клетках первичных долек, указано *стрелками*); *в* — беременной самки на 18-е сут (экспрессия видна в отдельных эпителиальных клетках первичных долек, указано *стрелками*); *г*–*е* — лактирующих самок (положительные *голубые* клетки формируют целые дольки); *и* — положительный контроль: самка линии 129/vRosa 26 LacZ; *к* — отрицательный контроль: нетрансгенная самка; *ж* — подчелюстная слюнная железа: положительные *голубые* клетки формируют целые дольки; *з* — яичник: положительные *голубые* клетки видны внутри дегенерирующего фолликула. Криостатные срезы 10 мкм. Окрашивание 1%-ным сафранином. Об. 20 $\times$ , ок. 10 $\times$ .

встречались отрицательные по активности  $\beta$ -галактозидазы дольки, в которых присутствовали бы единичные позитивные клетки. Разные лактирующие самки линии № 37 различались по количеству долек, позитивных по экспрессии *lacZ*: например, у одних в каждом поле зрения присутствовали одна или несколько позитивных долек, занимающих все поле зрения, тогда как у других одну позитивную дольку обнаруживали только при просмотре нескольких полей зрения. Предположительно «дольковый» мозаицизм является следствием развития долек либо из положительных, либо из отрицательных по экспрессии трансгена клеток-предшественниц развивающейся под гормональным влиянием молочной железы.

При исследовании органов и тканей (печени, почек, лимфоузлов, селезенки, тимуса, легких, сердца, семенников, матки и кожи) у трансгенных потомков всех линий не было обнаружено активности  $\beta$ -галактозидазы ни в од-

ной экспериментальной группе животных. Эктопическая экспрессия гена-репортера была обнаружена в подчелюстной слюнной железе у трансгенных самок и самцов линий № 16 (рис. 1, *к*) и № 37 (рис. 1, *ж*). Интересно, что активность  $\beta$ -галактозидазы у потомков линии № 16 выявлялась в виде мелких дискретных сигналов, аналогичных таковым, которые выявлялись в молочных железах лактирующих самок этой линии (рис. 1, *к*), а описанный выше «дольковый» характер экспрессии гена-репортера в молочных железах трансгенных самок линии № 37 проявлялся и при его эктопической экспрессии в слюнных железах (рис. 1, *ж*).

Активность  $\beta$ -галактозидазы была выявлена также в яичниках трансгенных самок линии № 37 (рис. 2, *з*), но не обнаружена в остальных линиях. Скопления позитивных клеток были отмечены в структурах, напоминающих фолликул на стадии атрезии.

Следует также отметить, что мы наблюдали неспецифическую реакцию на  $\beta$ -галактозидазу в редких клетках лимфоузлов как у трансгенных, так и у нетрансгенных животных, а также в клетках Лейдига семенников у нормальных и трансгенных самцов.

### Обсуждение

Природа клеточного мозаицизма у трансгенных животных до настоящего времени остается неизвестной. Некоторые авторы связывают этот феномен с эффектом положения трансгена, в частности с расположением его вблизи гетерохроматина (Dobie et al., 1996; Festenstein et al., 1996; Guy et al., 1996), другие — с повышенной копийностью интегрированного трансгена (Dorer, Henikoff, 1994; Garrick et al., 1998). Однако имеются примеры, в которых мозаицизм наблюдался у животных и с единичными копиями трансгена, и на достаточном удалении его от гетерохроматиновых областей (Ramirez et al., 2001). Далеко не всегда также удавалось избежать вариабельности экспрессии трансгена, содержащего элементы, потенциально блокирующие влияние прилежащих к трансгену последовательностей в месте его интеграции: например, LCR (locus control regions) (Festenstein et al., 1996; Robertson et al., 1996; Guy et al., 1997), инсуляторы (Jakobsson et al., 2004), MAR-элементы (Manzini et al., 2006) и даже искусственные хромосомы (Liu et al., 2004).

Этот перечень факторов, не влияющих на клеточный мозаицизм у трансгенных животных, продолжают и результаты, полученные в данной работе, а именно: можно заключить, что длина 5'-регуляторной области гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* молока существенно не меняет экспрессию

гена-репортера. Действительно, конструкции с самым коротким (721 п. н) и самым длинным (3409 п. н.) регуляторными районами показали сходный характер экспрессии гена *lacZ*, а с промежуточным (2101 п. н.) — проявили отличающийся от них вариант клонального клеточного мозаицизма. Мы наблюдали фенотипически сходное проявление экспрессии трансгена у № 16 линии с локализацией его в X-хромосоме и у линий № 7, 36 и 48 с локализацией в аутосомах. Это свидетельствует в пользу отсутствия связи клеточного мозаицизма с хромосомной локализацией трансгена.

Полученные нами результаты показали наличие клеточного мозаицизма у трансгенных животных при относительно выраженной тканеспецифической экспрессии всех трех генных конструкций. Характер мозаицизма различался: так, у лактирующих самок с конструкциями *pCLZ1* и *pCLZ3* позитивные клетки с точечными сигналами были хаотично разбросаны в дольках молочной железы. У самок с конструкцией *pCLZ2* наблюдался «дольковый» мозаицизм, т. е. обнаруживались целиком положительные дольки, расположенные среди полностью негативных. Складывается впечатление, что «дольковый» мозаицизм является следствием развития долек либо из позитивных по экспрессии гена-репортера клеток-предшественниц молочных желез, либо из негативных. Интересно, что аналогичным был и характер эктопической экспрессии гена *lacZ* в слюнной железе — дискретный с конструкцией *pCLZ1* и «дольковый» с *pCLZ2*. Возможное объяснение для этого феномена может быть в том, что включение гена-репортера в первом случае происходит на терминальной стадии дифференцировки эпителиальных клеток молочной или слюнной железы, т. е. экспрессия начинается в клетке, утратившей способность к делению. С конструкцией *pCLZ2* активация гена-репортера,

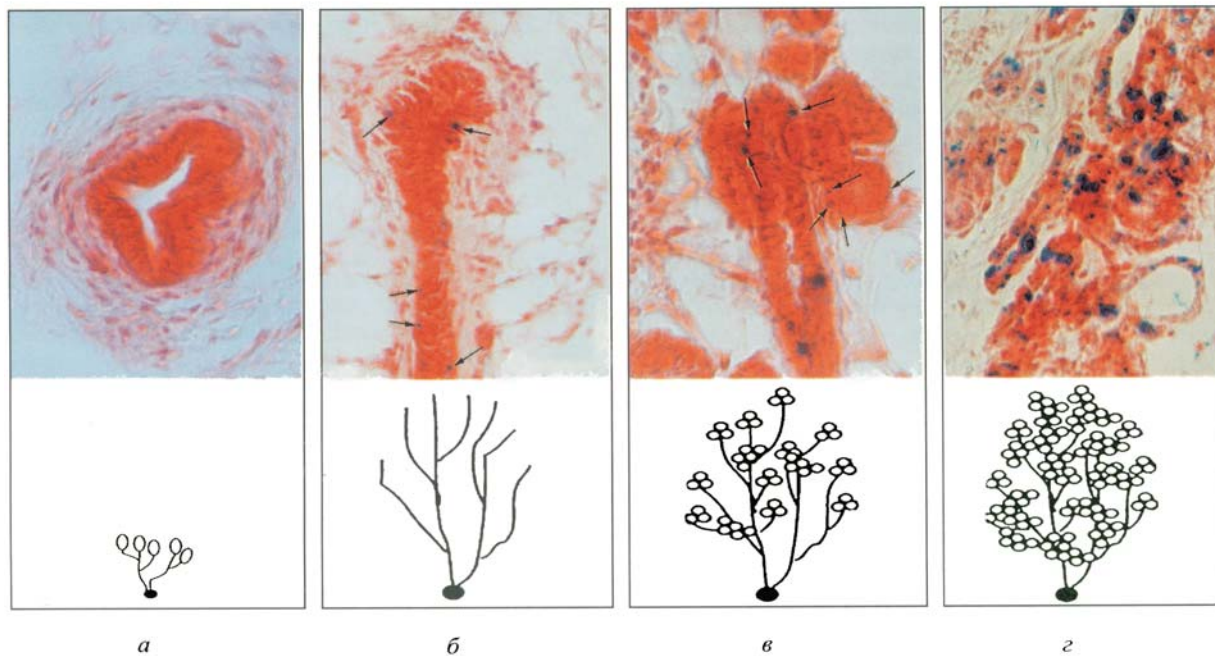


Рис. 3. Динамика включения экспрессии гена-репортера *lacZ* в молочной железе трансгенных самок с конструкцией *pCLZ2* на разных стадиях развития молочной железы.

*a* — виргинная самка (экспрессия отсутствует); *б* — беременность 14 сут (экспрессия видна в отдельных эпителиальных клетках протоков, указано стрелками); *в* — беременность 18 сут (экспрессия видна в отдельных эпителиальных клетках протоков и первичных долек, указано стрелками); *г* — лактация 10 сут (положительные голубые клетки формируют целые дольки). Верхний ряд — криостатные срезы 10 мкм; окрашивание 1%-ным сафранином. Об. 20 $\times$ , ок. 10 $\times$ ; нижний ряд — схема развития молочной железы.

по-видимому, происходит в клетке-предшественнице с высоким пролиферативным потенциалом, в результате чего формируется клон, группа позитивных клеток по активности β-галактозидазы, формирующих дольку молочной или слюнной железы.

Наглядно этот вариант формирования «долькового» мозаицизма можно представить, привлекая данные о закономерностях развития молочной железы из классической работы (Hennighausen, Robinson, 1998) (рис. 3). Ген-репортер подпадает под регуляцию ансамбля регуляторных факторов на стадии беременности. Если у виргинных самок экспрессия *pCLZ2* еще не определяется (рис. 3, а), то на 14-е сут беременности, когда начинается процесс пролиферации эпителия протоков молочной железы, уже появляются единичные позитивные по активности β-галактозидазы клетки, возможно и являющиеся предшественницами будущих позитивных долек (рис. 3, б). На 18-е сут беременности эти клетки четко видны в еще слабо развитых первичных дольках (рис. 3, в), деление которых к моменту лактации формирует грозди секретирующих долек, часть из которых остаются позитивными по экспрессии трансгена (рис. 3, з).

Аналогичный «дольковый» мозаицизм в кишечнике и желудке «зеленых» мышей с конструкцией *EGFP* наблюдали и другие авторы, хотя в большинстве тканей у этих мышей отмечался стохастический тип мозаичности в экспрессии трансгена в индивидуальных клетках (Biankin et al., 2007).

Полученные результаты свидетельствуют о том, что использованные в данном исследовании генетические конструкции с 5'-регуляторными областями гена *альфа-S<sub>1</sub>-казеина* молока независимо от их длины проявили высокую степень тканеспецифичности в экспрессии гена-репортера, что согласуется с ранее полученными данными (Дворянчиков и др., 2005). Эктопическая экспрессия выявлена у мышей двух трансгенных линий (№ 16 и 37) в подчелюстной слюнной железе, являющейся, как и молочная железа, экзокринной. Позитивная реакция на β-галактозидазу в яичниках трансгенных самок линии № 37, обнаруженная в дегенерирующих фолликулах, возможно, носит неспецифический характер, свойственный для очага разрушающейся ткани. Однако в любом случае, даже если это и связано с эктопической экспрессией трансгена, очевидно, что она незначительна. Следует заметить, что невысокая эктопическая экспрессия, как правило, не нарушает физиологию и продолжительность жизни трансгенных мышей (Дворянчиков и др., 2005; Chrenek et al., 2007), если это не касается высокоактивных рекомбинантных белков с выраженным физиологическим действием, например таких, как эритропоэтин (Uusi-Oukari et al., 1997), что нарушает развитие трансгенных особей и даже делает затруднительным само получение трансгенных животных.

Обнаруженный нами факт включения экспрессии трансгена на разных стадиях развития молочной железы добавляет онтогенетический аспект в изучение проблемы возникновения клеточного мозаицизма у трансгенных животных. Необходимо понять, какие факторы вызывают включение трансгена на разных стадиях дифференцировки клеток.

Работа проведена при финансовой поддержке подпрограммы «Динамика генофондов» программы фундаментальных исследований президиума РАН «Биоразнообразие и динамика генофондов».

## Список литературы

- Андреева Л. Е., Серова И. А. 1992. Влияние микроманипуляций, используемых для трансгенеза, на раннее развитие мыш. Онтогенез. 23 (6) : 637—643.
- Дворянчиков Г. А., Серова И. А., Андреева Л. Е., Дукас Л. П. Б., Азеведо С., Серов О. Л. 2005. Секретция биологически активного гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора (Г-КСФ) человека в молоке трансгенных мышей. Генетика. 41(10) : 1330—1337.
- Biankin S. A., Collector M. I., Biankin A. V., Brown L. J., Kleeberger W., Devereux W. L., Zahnow C. A., Baylin S. B., Watkins D. N., Sharkis S. J., Leach S. D. 2007. A histological survey of green fluorescent protein expression in «green» mice: implications for stem cell research. Pathology. 39 : 247—251.
- Brinster R. L., Chen H. Y., Trumbauer M. E., Yagle M. K., Palmiter R. D. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 82 : 4438—4442.
- Chrenek P., Ryban L., Vetr H., Makarevich A. V., Uhrin P., Paleyanda R. K., Binder B. R. 2007. Expression of recombinant human factor VIII in milk of several generations of transgenic rabbits. Transgenic Res. 16 : 353—61.
- Dobie K. W., Lee M., Fantes J. A., Graham E., Clark A. J., Springbett A., Lathe R., McClenaghan M. 1996. Variegated transgene expression in mouse mammary gland is determined by the transgene integration locus. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 93 : 6659—6664.
- Dorer D. R., Henikoff S. 1994. Expansions of transgene repeats cause heterochromatin formation and gene silencing in *Drosophila*. Cell. 77 : 1—20.
- Festenstein R., Tolaini M., Corbella P., Mamalaki C., Parrington J., Fox M., Miliou A., Jones M., Kioussis D. 1996. Locus control region function and heterochromatin-induced position effect variegation. Science. 271 : 1123—1125.
- Garrick D., Fiering S., Martin D. I. K., Whitelaw E. 1998. Repeat-induced gene silencing in mammals. Nature Genet. 18 : 56—59.
- Guy L. G., Kothary R., DeRepentigny Y., Delvoe N., Ellis J., Wall L. 1996. The beta-globin locus control region enhances transcription of but does not confer position-independent expression onto the *lacZ* gene in transgenic mice. EMBO J. 15 : 3713—3721.
- Guy L. G., Kothary R., Wall L. 1997. Position effects in mice carrying a *lacZ* transgene in cis with the beta-globin LCR can be explained by a graded model. Nucl. Acids Res. 25 : 4400—4407.
- Hennighausen L., Robinson G. W. 1998. Think globally, act locally: the making of a mouse mammary gland. Genes. Develop. 12 : 449—455.
- Jakobsson J., Rosenqvist N., Thompson L., Barraud P., Lundberg C. 2004. Dynamics of transgene expression in a neural stem cell line transduced with lentiviral vectors incorporating the cHS4 insulator. Exp. Cell. Res. 298 : 611—23.
- Krepulat F., Lohler J., Heinlein C., Hermannstadter A., Tolstogon G. V., Deppert W. 2005. Epigenetic mechanisms affect mutant p53 transgene expression in WAP-mutp53 transgenic mice. Oncogene. 24 : 4645—4659.
- Kwaks T. H., Barnett P., Hemrika W., Siersma T., Sewalt R. G., Satijn D. P., Brons J. F., van Blokland R., Kwakman P., Kruckeberg A. L., Kelder A., Otte A. P. 2003. Identification of anti-repressor elements that confer high and stable protein production in mammalian cells. Nat. Biotechnol. 21 : 553—558.
- Liew C. G., Draper J. S., Walsh J., Moore H., Andrews P. W. 2007. Transient and stable transgene expression in human embryonic stem cells. Stem Cells. 25 : 1521—1528.
- Liu Z., Zhao C., Fan B., Dai Y., Zhao Z., Wang L., Zheng M., Feng J., Chen Y., Duan Y., Li N. 2004. Variable expression of human lactoferrin gene in mice milk driven by its 90 KB upstream flanking sequences. Anim. Biotechnol. 15 : 21—31.
- Ma W., Rogers K., Zbar B., Schmidt L. 2002. Effects of different fixatives on beta-galactosidase activity. J. Histochem. Cytochem. 50 : 1421—1424.
- Manzini S., Vargiolu A., Stehle I. M., Bacci M. L., Cerri M. G., Giovannoni R., Zannoni A., Bianco M. R., Forni M., Donini P., Papa M., Lipps H. J., Lavitrano M. 2006. Genetically modi-

fied pigs produced with a nonviral episomal vector. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 17672—17677.

Martin D. I., Whitelaw E. 1996. The vagaries of variegating transgenes. Bioessays. 18 : 919—923.

Opsahl M. L., McClenaghan M., Springbett A., Reid S., Lathe R., Colman A., Whitelaw C. B. 2002. Multiple effects of genetic background on variegated transgene expression in mice. Genetics. 160 : 1107—1112.

Opsahl M. L., Springbett A., Lathe R., Colman A., McClenaghan M., Whitelaw C. B. 2003. Mono-allelic expression of variegating transgene locus in the mouse. Transgenic Res. 12 : 661—669.

Pantano T., Rival-Gervier S., Prince S., Menck-Le Bourhis C., Maeder C., Viglietta C., Houdebine L. M., Jolivet G. 2003. *In vitro* and *in vivo* effects of a multimerized alphas 1-casein enhancer on whey acidic protein gene promoter activity. Mol. Reprod. Develop. 65 : 262—268.

Pape J. R., Skynner M. J., Allen N. D., Herbison A. E. 1999. Transgenics identify distal 5'- and 3'-sequences specifying gonadotropin-releasing hormone expression in adult mice. Mol. Endocrinol. 13 : 2203—2211.

Park K. W., Lai L., Cheong H. T., Cabot R., Sun Q. Y., Wu G., Rucker E. B., Durtschi D., Bonk A., Samuel M., Rieke A., Day B. N., Murphy C. N., Carter D. B., Prather R. S. 2002. Mosaic gene expression in nuclear transfer-derived embryos and the production of cloned transgenic pigs from ear-derived fibroblasts. Biol. Reprod. 66 : 1001—1005.

Ramirez A., Milot E., Ponsa I., Marcos-Gutiérrez C., Page A., Santos M., Jorcano J., Vidal M. 2001. Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/*lacZ* constructs in stratified epithelia of transgenic mice. Genetics. 158 : 341—350.

Ramunas J., Montgomery H. J., Kelly L., Sukonnik T., Ellis J., Jervis E. J. 2007. Real-time fluorescence tracking of dynamic transgene variegation in stem cells. Mol Ther. 15 : 810—817.

Ramunno L., Cosenza G., Rando A., Pauciullo A., Illario R., Gallo D., Di Berardino D., Masina P. 2005. Comparative analysis

of gene sequence of goat CSN1S1 F and N alleles and characterization of CSN1S1 transcript variants in mammary gland. Gene. 345 : 289—299.

Robertson G., Garrick D., Wilson M., Martin D. I., Whitelaw E. 1996. Age-dependent silencing of globin transgenes in the mouse. Nucl. Acids Res. 24 : 1465—1471.

Schulz T. J., Glaubitz M., Kuhlow D., Thierbach R., Birringer M., Steinberg P., Pfeiffer A. F., Ristow M. 2007. Variable expression of Cre recombinase transgenes precludes reliable prediction of tissue-specific gene disruption by tail-biopsy genotyping. PLoS One. 2 : e1013.

Smith J. R., Maguire S., Davis L. A., Alexander M., Yang F., Chandran S., French-Constant C., Pedersen R. A. 2008. Robust, persistent transgene expression in human embryonic stem cells is achieved with AAVS1-targeted integration. Stem Cells. 26 : 496—504.

Swenson E. S., Price J. G., Brazelton T., Krause D. S. 2007. Limitations of green fluorescent protein as a cell lineage marker. Stem Cells. 25 : 2593—2600.

Uusi-Oukari M., Hyttinen J.-M., Koronen V.-P., Vasti A., Alhonen L., Janne O. A., Janne J. 1997. Bovine  $\alpha$ S1-casein gene sequences direct high level expression of human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in milk of transgenic mice. Transgenic Res. 6 : 75—84.

Wang Y., Flemming B. P., Martin C. C., Allen S. R., Walters J., Oeser J. K., Hutton J. C., O'Brien R. M. 2008. Long-range enhancers are required to maintain expression of the autoantigen islet-specific glucose-6-phosphatase catalytic subunit-related protein in adult mouse islets *in vivo*. Diabetes. 57 : 133—141.

Williams A., Harker N., Ktistaki E., Veiga-Fernandes H., Roderick K., Tolaini M., Norton T., Williams K., Kioussis D. 2008. Position effect variegation and imprinting of transgenes in lymphocytes. Nucl. Acids Res. 36 : 2320—2329.

Поступила 28 I 2009

#### MOSAIC EXPRESSION OF THE *lacZ* REPORTER-GENE UNDER CONTROL OF 5'-REGULATORY SEQUENCES OF THE $\alpha$ -S<sub>1</sub>-CASEIN GENE IN TRANSGENIC MICE

I. A. Serova,<sup>1</sup> L. E. Andreeva,<sup>2</sup> N. V. Khaidarova,<sup>2</sup> L. P. B. Dias,<sup>3</sup> G. A. Dvoryanchikov,<sup>4</sup>  
I. A. Burkov,<sup>1</sup> N. V. Baginskaya<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics Siberian Branch of RAS, Novosibirsk, irina\_serova2004@mail.ru,

<sup>2</sup> Institute of Molecular Genetics RAS, Moscow, leandr@img.ras.ru,

<sup>3</sup> Institute of Biophysics Carlos Chagas Filho, Federal University of Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, luciene@biof.ufri.br, and

<sup>4</sup> University of Miami School of Medicine, Miami, FL, USA, gdvor@yahoo.com

Phenomenon of mosaic expression at cellular level is widely presented in tissues and organs of transgenic animals. The communication is concerned a study of the mosaics in transgenic mice carrying the *lacZ* reporter-gene under control of the bovine and goat  $\alpha$ -S<sub>1</sub>-casein genes with 5'-flanked sequences of various extent: pCLZ1 — 721bp, pCLZ2 — 2001 bp and pCLZ3 — 3409 bp constructs. Five transgenic founders were generated by injection of the recombinant DNA into zygotes: pCLZ1 — N 16, pCLZ2 — N 37 and pCLZ3 — N 7, N 36, and N 48. Positive for  $\beta$ -galactosidase activity cells were detected in lactating mammary glands of all transgenic females, however, distribution of the positive cells was variable. We observed two types of mosaics: clonal or «lobule» type with positive cells filling the whole of the globule or stochastic type with single positive cells scattered over one or different lobules. Two types of mosaics were characteristic of all the transgenic animals, although, females carrying the pCLZ2 transgene showed «lobule» type more often than transgenic animals with the transgenes pCLZ and pCLZ3. It is suggested that the stochastic type of mosaics occurs in the cells at terminal stage of differentiation, whereas the «lobule» type arises from positive for P-galactosidase proliferating precursors. Analysis of the inheritance of the transgenes in different lines demonstrated that the pCLZ1 transgene was inserted in the X-chromosome of the founder whereas the other two localized in autosomes. Localization of the pCLZ1 transgene in the X-chromosome did not influence the mosaicism; it was similar to that of transgenic animals carrying the transgenes in autosomes. Ectopic expression of the reporter-gene was detected in mandibular glands from the offsprings of the founders N 16 and N 37 only, as well as in atreted follicles in N 37. The weak ectopic expression suggests that the 5S-flanked regulatory sequences used in the constructs are able to provide perfect tissue-specific expression of the reporter-gene.

Key words: transgenesis, cell mosaicism, reporter-gene, *lacZ*.