

ЛЕКЦІЯ № 6

Тема: Генетично контрольовані тварини

План:

1. Способи одержання різних ліній лабораторних тварин
 - 1.1 Аутбрідинг
 - 1.2 Інбридинг
 - 1.3 Трансгенні тварини
 - 1.4 Нокаутні тварини
 - 1.5 Коїзогенні тварини
 - 1.6 Рандомбредні тварини
 - 1.7 Стандартні тварини
 - 1.8 Мутантні тварини
2. Методи/способи оцінки та підтримання чистоти лінії лабораторних тварин

1. Способи одержання різних ліній лабораторних тварин

Виведені лінії лабораторних тварин дозволили проводити ряд недоступних раніше досліджень. Для вирішення конкретних завдань було виведено велику кількість ліній та субліній мишей та щурів. Так, наприклад, були отримані щури зі спонтанною гіпертонією (лінія SHR), щури-епілептики, що відрізняються підвищеною збудливістю нервової системи та слабкою активністю гальмівних нейронів, кілька ліній мишей, у яких розвивається ожиріння та/або діабет (лінії NZO, PBB, KK, AY) тощо.



NZO (Новозеландське ожиріння)

Існує кілька шляхів одержання певних ліній лабораторних тварин. Нижче розглянемо їх докладніше.

1. **Аутбрідинг.** 1-й спосіб - найбільш простий, що повсюдно використовується в селекції. Аутбридинг - метод розведення тварин за допомогою схрещування неспоріднених організмів, у тому числі і належать до різних ліній/пород і навіть видів. Нащадків такого типу схрещування називають гібридами, вони перевершують за рядом ознак обидві батьківські форми - це явище зветься гібридною потужністю або гетерозисом. Основним наслідком аутбридингу є приховування рецесивних ознак з допомогою переходу в гетерозиготне стан. У тому випадку, коли рецесивні ознаки небажані, нащадки 1-ї генерації (гібриди F1) від неспоріднених тварин зазвичай зовні

позбавлені їх, проте при подальшому розведенні ці ознаки можуть виникнути. З іншого боку, при аутбридингу з'являється можливість утворення нових, найчастіше несподіваних комбінацій генів, які можуть спричинити як найкращі, так і найгірші поєднання ознак. І тут також не можна передбачити можливість передачі цих поєднань у спадок. Ці особливості аутбредних ліній слід враховувати під час проведення експериментів й у відтворюваності результатів використовувати тварин-гібридів лише 1-го покоління (F1).

Приклади використання аутбредних мишей та щурів:

Приклади використання	Лінії
Миші	
Захворювання шкіри, імунодефіцитні стани иммунодефицитные состояния	SCID, J:NU
Старіння	CD-1
Алкогольна абстиненція, судоми	Mmjax:WSP1
Токсикологія, онкологія, вакцини	CD-1
Щури	
Токсикологія, онкологія, вакцини	SD, Wistar

2. **Інбридинг.** Дослідження з використанням аутбредних ліній тривали аж до 1930-х років, коли стало зрозуміло, що дані лінії тварин не є універсальними для всіх експериментів, тому що при постановці досліду з використанням біологічної тест-системи важливо, щоб тварини були генетично однорідними. У зв'язку з цим вчені вдаються до інбридингу – близькоспорідненого схрещування. Інбредні тварини гомозиготні та генетично однорідні, що забезпечує отримання повноцінних відтворених результатів та можливість їх повторення у будь-якій лабораторії. Генетична однорідність дозволяє витратити менше тварин для отримання доказових результатів. В інбредних лініях генетична однорідність, або гомозиготність тварин зберігається постійним спарюванням рідних братів і сестер у племінному ядрі лінії. Племінне ядро лінії є групою тварин однієї лінії, що розмножується у співвідношенні 1:1 рідних братів і сестер. Кожен інбредний штаб – це унікальне поєднання

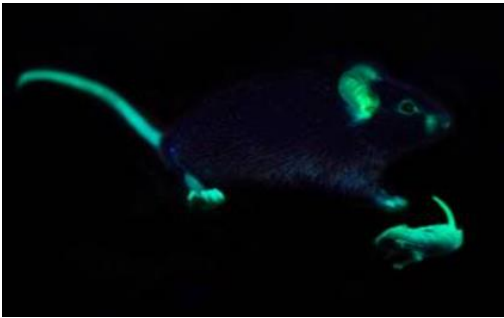
генетичного матеріалу, яке породжує унікальний фенотип. Багато таких фенотипних рис корисні в дослідженнях, деякі дозволяють вивести «моделі» хвороб, інші дають корисні фізіологічні, анатомічні або поведінкові характеристики

Приклади використання інбредних ліній мишей та щурів:

Приклади використання	Лінії
Миші	
Уподобання спирту (10%)	C57BL, C57BR/cd
Агресвця/боротьба	SJL, NZW
Аудіогенні судоми	DBA/2
Аутоімуна анемія	NZB
Амилоїдоз	YBR, SJL
Расщепление нёба	CL, A
Синдром Чедиака–Хигаши	SB
Гіпертонія та/або пороки серця	BALB/c, DBA/1, DBA/2
Гіперпролінемія та пролінурія	PRO
Ожиріння та/або діабет	NZO, PBB, KK, AY
Остеоартропатія колінних суглобів	STR/1
Полідипсія	SWR, SWV
Стійкість до міксовірусних інфекцій	A2G
Пухлини: лейкемія; аденома гіпофіза; карцинома щитовидної залози; пухлина молочної залози; трансплантовані гепатоми; інтерстиційно-клітинних пухлин насінників	F344/N, F344/N, F344/N, F344/N, AUG/LacSto F344/N
Повна відсутність спонтанних пухлин	X/Gf
Розлад харчування	A2G

На відміну від аутбредних ліній гризунів, у інбредних спостерігається специфікація залежно від завдань експерименту і практично для кожної патології, що моделюється, виведена своя лінія щурів або мишей. Найбільша кількість інбредних ліній створена на мишах, тоді як інбредних ліній щурів у рази менше.

3. Трансгенні тварини. Трансгенні форми несуть сегмент чужої ДНК, який введений в геном шляхом гомологічної рекомбінації, вставкою інфекційним агентом – ретровірусним вектором або негомологічною вставкою (мікроін'єкцією в пронуклеус).



B10.GFP

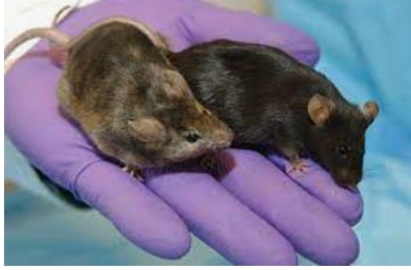
Виведені у 2013 р. Масть – чорна. Миші несуть ген зеленого білка: дають зелену флуоресценцію в ультрафіолетових променях. Зелений флуоресцентний білок (GFP) використовується як прижиттєвий маркер, що дозволяє досліджувати різноманітні процеси, що відбуваються всередині живих клітин і організмів. Злиття GFP з іншими білками зазвичай не впливає на активність, рухливість та локалізацію цих білків у клітині. Найбільш часто GFP застосовується як маркер методом генетичного злиття з іншими білками. Це дозволяє спостерігати за локалізацією і переміщенням білків, що досліджуються, в живих функціонуючих клітинах і з'ясувати їх біологічну функцію. Ген GFP, який під контролем певного промотора, можна використовувати для оцінки рівня експресії інших білків, ген яких перебуває під контролем того ж промотора. Чутливість флуоресценції до рН середовища й у всьому класу GFP білків. Ця властивість була використана для спостереження змін рН *in vivo*. *In vitro* інтенсивність флуоресценції при варіюванні рН може змінюватись більш ніж у 10 разів.

4. Нокаутні тварини.

Нокаут гена — це метод молекулярної генетики, у якому з організму видаляють чи роблять непрацездатними певні гени. Таким чином одержують організм, «нокаутний» за непрацюючими генами. Нокаутні організми допомагають дізнатися про функції генів, нуклеотидна послідовність яких відома.

Нокаутна миша — це генетично модифікована лабораторна миша, у чиєму організмі одне із генів цілеспрямовано нокаутровано шляхом видалення чи заміни якусь

послідовність нуклеотидів. З їхньою допомогою легко вивчати ролі секвенированих генів, чий функції ще визначено.



Секвенування геному миші 2002 р. розширило можливості дослідників. Маніпуляції з генами дозволяють отримати "нокаутних" тварин.

Нокаутні форми отримують мікроін'єкцією генетично змінених ембріональних стовбурових клітин в бластоцисту господаря. Руйнування, заміщення або подвоєння гена у стовбурових клітинах виробляють шляхом гомологічної рекомбінації між екзогенною ДНК та ендогенним геном (наприклад, блокуванням роботи цільового гена вбудовуванням гена резистентності до неоміцину).

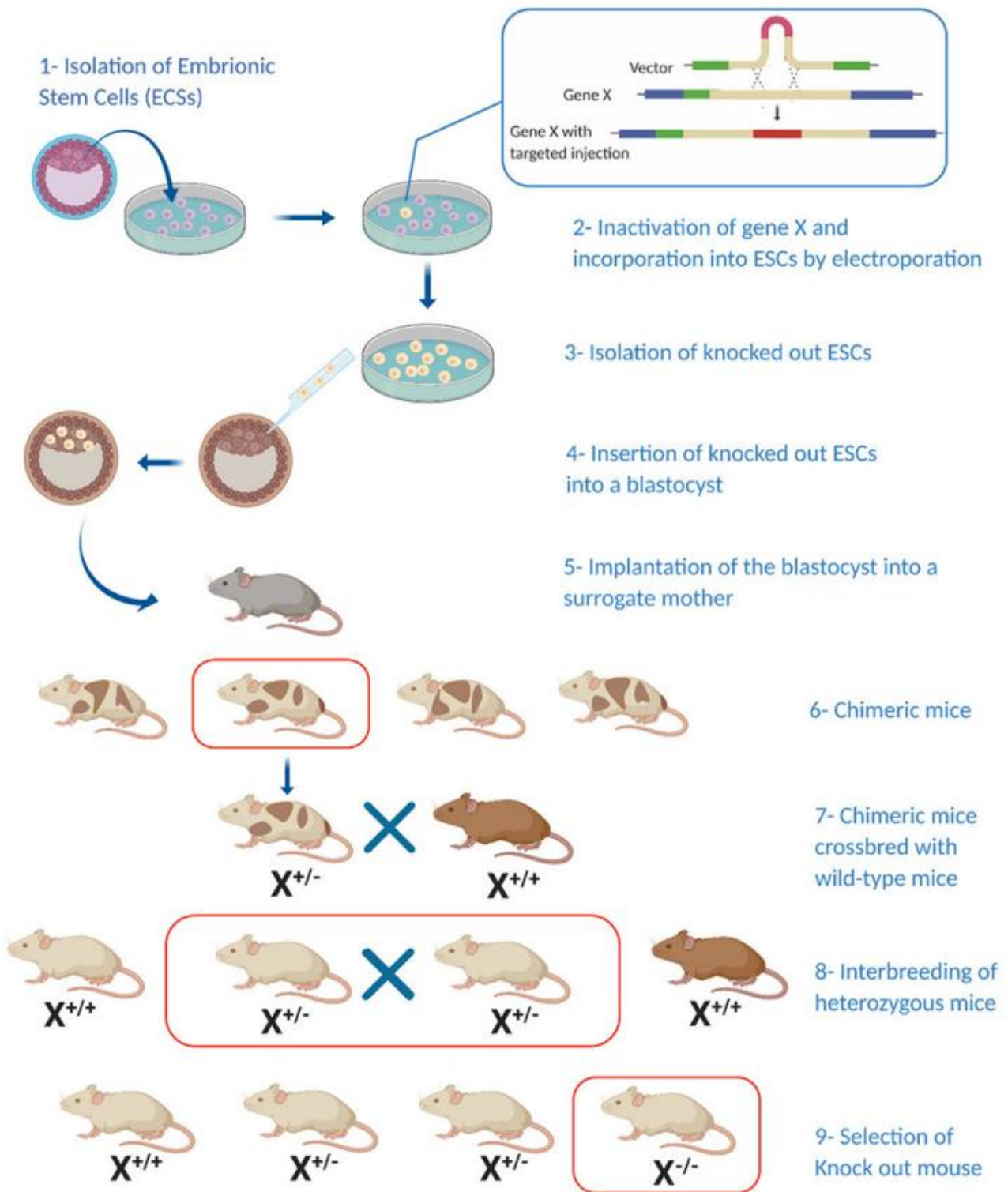


Рис. Створення нокаутної мишачої моделі: створення нокаутної мишачої моделі включає включення попередньо сконструйованого гена-мішені в ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) (1-3) з подальшим їх включенням в бластоцисту, а потім в сурогатну мишу (4-5). Химерне потомство схрещують з мишами дикого типу, а

новонароджених гетерозиготних мишей знову схрещують щоб одержати гомозиготного потомства, яке несе цікаву мутацію (6-9). (X */* - гетерозиготність/гомозиготність по гену-мішені)

5. Коїзогенні тварини. Коїзогенними (або конгенними) називають генетично ідентичні лінії, що відрізняються лише за одним локусом. Справжня коїзогенність можлива лише у разі одиничної мутації в інбредній лінії. Ізогенний стан досягається шляхом введення гена однієї лінії у генетичну основу іншої лінії. Конгенні лінії - це інбредні лінії тварин, що відрізняються тільки в одному локусі. Там можна вивчати ефект одного чи групи тісно зчеплених генів. Виведено понад 100 таких ліній мишей. Більшість їх різняться по основному локусу гістосумісності (H-2) і виведені на генетичній основі інбредної лінії мишей C57BL/10. Ці лінії є конгенно-резистентними, так як при реципрокному обміні пухлини, що трансплантуються, або шкірні трансплантати відторгуються. На конгенно-резистентних лабораторних тваринах виконують дослідження з імунології та імуногенетики.

Наближення до ізогенного стану може бути досягнуте шляхом **уведення гена однієї лінії на генетичну основу іншої** за допомогою послідовних зворотних схрещувань.

Крос починається з двох ліній, **одна** з яких дає генетичну основу для **конгенної лінії** і повинна бути ізогенною, тобто *однорідною* за всіма генами. Цю лінію називають **інбредним партнером**. **Інша** лінія дає локус, за яким конгенні лінії будуть відрізнятися, тому її називають **донорською лінією**.

Запроваджуваний локус зчеплений із сегментом хромосоми, будучи її частиною. У цьому сегменті можуть бути присутніми інші гени як "домішки". Довжина цієї "чужорідної" хромосоми і число домішкових генів будуть зменшуватися зі збільшенням числа зворотних схрещувань з інбредною лінією. Лінія, виведена таким шляхом, яка наближається до коїзогенного стану, але не може досягти його повністю, називається **конгенною**. Конгенна лінія і її інбредний партнер мають назву **конгенна пара**.

6. Рандомбредні тварини.

Рандомбредінг - система контрольованого схрещування тварин з метою підтримки максимальної генетичної різноманітності зі свідомим винятком будь-якої селекції. Метод рандомізації сприяє підтримці у популяції максимальної генетичної гетерогенності.

Неінбредні, нелінійні тварини закритих колоній розмножуються за певною, здебільшого – ротаційною системою, що забезпечує рандомізацію схрещувань. Кожна така колонія характеризується певними частотами генів та генотипів, тварини гетерозиготні по невизначеному числу генів, і тому сама колонія та кожна вибірка з неї

генетично гетерогенні. Тварини цієї категорії фенотипно менш однорідні, ніж гібриди. Необхідною умовою збереження біологічних особливостей нелінійних тварин та відтворюваності результатів експериментів є підтримання гетерозиготності за збереження стабільності генетичної структури колонії.

7. Стандартні тварини. Тварини із закритих колоній, що розмножуються за ротаційною системою протягом не менше 4 поколінь при втраті гетерозиготності менше 1% на покоління, прийнято вважати стандартними.

Інбредні та рандомбредні тварини найбільше цінні за своїми властивостями, тому як належать до генетично контролюємих тваринам. Генетична характеристика інбредних та рандомбредних тварин неоднакова й обумовлена різнотипною системою розведення. Лінійні тварини генетично однорідні, а рандомбредні – фенотипічно однорідні з певним розмахом генетичної мінливості. Рандомбредних тварин бажано використовувати при вивченні дії різних подразників на популяцію, яка складається із генетично різнорідних особин.

8. Мутантні тварини.

1XS3-nu Масть – агуті, голі миші. Фенотип *nude* – перший описаний приклад дефекту шкіри, що успадковується, причиною якого є відсутність експресії, а не мутація генів кератинів.



B10-hr rhY/+ Масть – чорна. Локалізація: Chr14:70552212-70573548 bp, + strand

Розташування на генетичній карті: Chr14, 36.32 cM

Потенційно потужний інструмент для прояснення ролі продукту гена *hairless* у фізіології волосяних фолікулів. Модель вивчення такого порушення зростання волосся в людини, як атріхія.



C57BL/6-Smk Масть - попеляста. 60% smk/smk самок та ~8% +/-smk самок стерильні внаслідок атрезії (зрощення) піхви.



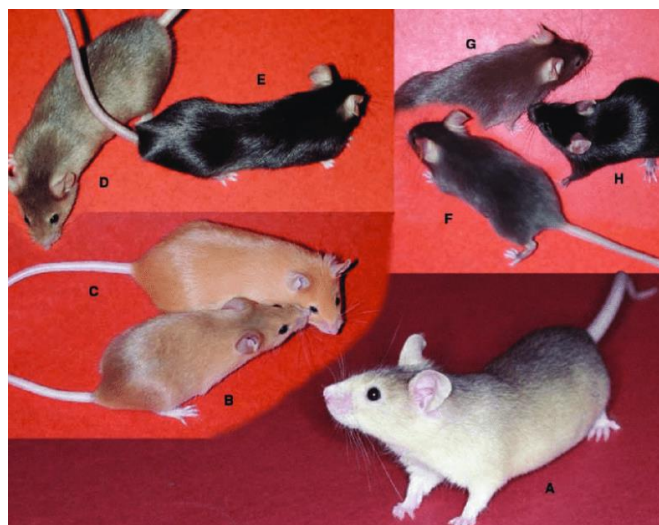
C57BL/10-Ssm/+ Масть – чорна з білими плямами. Даних немає у жодному вигляді. Підходять для вивчення чоловічої стерильності. У Kv з Y у 2013 р. на N16F10.



Tabby Масть – агуті, «муарові». Генотип - Та, X-хромосома. Підтримуються на генотипі F1 (CBA/CXB6). Ген використовується для дослідження частот втрат та нерозбіжності статевих хромосом.



Приклади мутацій фарбування мишей. Усі миші відносяться до лінії C57BL/6J, крім (A) – JU/CtLm-A у /а.



2. Методи/способи оцінки та підтримання чистоти лінії лабораторних тварин

Для підтримки чистоти лінії досить регулярно проводити моніторинг тварин і суворо дотримуватися методики розведення.

Перші ознаки порушення чистоти лінії можна відстежити за двома параметрами: плодючість та поведінка.

Плодючість необхідно регулярно відстежувати при відтворенні тварин для найбільш ефективного управління колонією. Раптове зростання плодючості лінійних тварин може бути викликане гібридною потужністю, що не властиве для інбредних тварин.

Необхідно ретельно вивчати поведінку тварин. Більшість ліній має спокійний темперамент, у той час як гібриди F1 бувають більш активними та нервовими. Зміни у темпераменті тварин мають стати приводом для ретельного дослідження із застосуванням різних методів оцінки чистоти лінії, наприклад, трансплантації шкіри.

Генетичне зараження порушує чистоту лінії та призводить до викривлення результатів експериментів. Порушення чистоти лінії можливе внаслідок окремих мутацій, а також випадкової участі в процесі розведення виробника з іншої лінії. Небезпека генетичної контамінації особливо велика, як у одному приміщенні містяться кілька ліній з однаковим забарвленням хутра. Генетичний контроль не може запобігти порушенням чистоти ліній, проте він дуже важливий для забезпечення якості лабораторних тварин. Генетичний контроль залежно від кількості досліджуваних маркерів може бути поділений на наступні категорії:

1. Характеризація лінії. Дана процедура проводиться для підтвердження генотипу інбредних ліній та створення генотипу нових ліній шляхом перевірки великої кількості локусів – маркерів. Відповідно до біологічних функцій маркери поділяються на 6 груп: біохімічні, морфологічні, імуногенетичні, молекулярні генетичні, фармакогенетичні та цитогенетичні. Найбільш підходящі з точки зору точності, простоти виконання, ефективності та економічності – маркери біохімічної та імуногенетичної груп, оскільки

кількість локусів у них відома краще, ніж в інших маркерах, та їх виявлення простіше здійснити.

2. Моніторинг I. Проводиться з метою періодичного підтвердження генетичного профілю лінії, яка відтворюється в розпліднику.

3. Моніторинг II. Проводиться на підтвердження приватних підгруп, які можуть бути охарактеризовані мінімальним набором маркерів, дозволяють виділяти цю групу тварин в відокремлену лінію. Так, наприклад, 5 найбільш часто зустрічаються інбредних ліній (AKR, C3H/He, DBA/2, BALB/c і C57BL/6) можна розпізнати, використовуючи 4 біохімічні маркери (Hbb, Car-2, Gri-1, Idh-1).

Після застосування кожна лінія повинна проходити характеризування з метою підтвердження генотипу. Потім, якщо лінія відповідає лінії очікуваним характеристикам, вона з певною періодичністю піддається Моніторингу I. Через кілька років повторюють процедуру характеристизації. За потребою проводять Моніторинг II.

Крім дослідження маркерів, є інші способи перевірити чистоту лінії лабораторних тварин.

- Реципрокна ізотрансплантація шкіри дозволяє контролювати гомозиготність за великою кількістю генів, оскільки тканинна сумісність є полігенною ознакою. Цей прийом дозволяє виявити дуже слабкі генетичні різниці між тваринами однієї лінії, зумовлені залишковою гетерозиготністю чи спонтанними мутаціями. Метод технічно досить простий і вимагає великих матеріальних витрат. Мишей та щурів для контролю відбирають у віці 25–30 днів. Трансплантація здійснюється на 2-, 3-місячних мишах та 3-, 3,5-місячних щурах, але не раніше 6-тижневого віку [6].

- Масовий SNV (single nucleotide variant, одиничні нуклеотидні варіанти) аналіз дозволяє диференціювати особин та лінії. Він полягає у пошуку відмінностей у послідовності ДНК розміром в один нуклеотид (A, T, G або C) у геномі. Однак цей метод недостатньо добре охарактеризований, часто виникають складності поділу та помилки секвенування.

- Повногеномне або повноекзомне секвенування дозволяє порівнювати геноми окремих особин. Але в даний час даний метод є дорогим, у зв'язку з чим застосування їх у рутинних дослідженнях є недоцільним.

- Використання мікросателітів як ДНК-маркерів – найпопулярніший на сьогоднішній день метод генетичного моніторингу.

Мікросателіти – це короткі тандемні повтори, що складаються з 2-6 пар нуклеотидів. Вони характеризуються стабільним наслідуванням, у зв'язку з чим вони є надзвичайно консервативними від однієї генерації до іншої; унікальністю для індивіда; повною ідентичністю всім клітин однієї й тієї ж індивідуума; високим ступенем поліморфності серед різних ліній. Таким чином, мікросателітні послідовності широко застосовуються для персональної ідентифікації, у популяційній генетиці та для побудови філогенетичних зв'язків у систематиці.

Існує кілька шляхів аналізу мікросателітів. Усі вони засновані на використанні методу полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) з праймерами, комплементарними або безпосередньо мікросателітним послідовностям, або ділянках між ними. Крім того, стає

популярним метод мультиплексної ПЛР. У цьому випадку використовується більше 1 пари олігонуклеотидних праймерів. При цьому контроль здійснюється відразу за декількома ДНК-маркерами. Перевагою даного методу є те, що оцінку чистоти лінії можна проводити на будь-якому етапі доклінічного дослідження або до нього в найкоротший термін.

Якщо в процесі експериментів відбулося випадкове схрещування з тваринами іншого генотипу, відновити гомозиготність лінії, зберігши вихідний генотип практично неможливо. Такі тварини підлягають знищенню.