



Возврат ранее утерянного гена *misty* в генотип мышей C57BL/Ks-Lepr^{db/+}

Т.Б. Бескова, Н.Н. Каркищенко, Х.Х. Семенов,
О.И. Степанова, Е.Л. Матвеевко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Московская область

Контактная информация: Бескова Татьяна Борисовна, тел. (495)561-5264

В коллекционном фонде НЦБМТ РАМН поддерживается мутантная линия мышей C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m, гомозиготы которых являются адекватной моделью сахарного диабета 2 типа. Особенность линии – гомозиготы обоего пола бесплодны. Линия поддерживается путем скрещивания гетерозигот. Отбору гетерозигот способствует мутантный рецессивный ген *misty*, который в гомозиготном состоянии осветляет окраску шерсти мышей. В результате кроссинговера маркерный ген был утерян, и отбор гетерозигот по внешним признакам стал невозможен. Восстановление маркерного гена *misty* в геноме мышей линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m явилось целью настоящей работы. Стандартными генетико-селекционными методами ген *misty* был переведен из линии MLR/Y в геном линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+, которой, соответственно, был возвращен прежний символ C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m.

Ключевые слова: геном, гетерозиготы, гомозиготы, сахарный диабет, биомодель.

Диабет 2 типа является самой распространенной формой сахарного диабета у людей. Из всех заболевших сахарным диабетом 85-90% имеют 2 тип данного заболевания. Сахарный диабет 2 типа – это хроническое заболевание, которое характеризуется нарушением механизмов взаимодействия инсулина с клетками за счет того, что рецепторы клеток теряют к нему чувствительность, или нарушением работы поджелудочной железы, приводящее к тому, что железа перестает синтезировать инсулин в нужном количестве.

Причиной возникновения диабета 2 типа является генетическая предрасположенность [3]. Мыши линии C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+m являются адекватной

биомоделью сахарного диабета 2 типа. Они имеют врожденный сахарный диабет со всеми клиническими его проявлениями: высокое содержание глюкозы в крови (превышение нормы в 5-6 раз), нарушение углеводного и липидного обмена и, как следствие, ожирение, полиурия, полифагия, полидипсия [6, 5]. В НЦБМТ РАМН (ранее НИЛЭБМ АМН СССР) эта линия поступила из Джексоновской лаборатории США в 1978 г., поддерживается в коллекционном фонде и используется в экспериментальной работе. Мутантный рецессивный ген Lepr^{db}-leptin receptor, в гомозиготном состоянии вызывающий диабет, локализован в 4-й хромосоме (8-я группа



Рис. 1. Мышь со светло-серой окраской шерсти, заметно отличающаяся от черной, взятой из того же помета, является гомозиготой по маркерному гену *misty*.

сцепления), там же расположен и ген *misty* (m). Последний, осветляя окраску шерсти у мышей гомозигот (+m/+m), является маркером оппозитной хромосомы, не несущей гена Lepr^{db} [2].

Поскольку мыши-диабетики (db/db) обоих полов бесплодны из-за ожирения (недоразвиты яичники и семенники, изменен гормональный фон), то линия поддерживается скрещиванием гетерозигот. При этом, наряду с гомозиготами (db+/db+) черного цвета с ожирением и гетерозиготами (db+/+m) черного цвета и нормального веса, выщепляются и нормальные гомозиготы (+m/+m), т.е. особи, которые являются носителями маркерного гена *misty* и имеющие темно-серую окраску. Они отличаются по масти от остальных животных, их легко выделить и удалить из разведения (рис. 1). Таким образом, ген *misty* способствует более эффективному ведению селекции. Однако в 1999 г., видимо, в результате кроссинговера, маркерный ген *misty* был утерян, новым символом линии становится C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+.

Вместе с утратой гена *misty* возможности отбора и выбраковки нормальных гомозигот (+m/+m) свелись к нулю. Это означает, что при производстве мышей

db/db скрещивание производится «вслепую», скрещиваются все генотипы, за исключением диабетиков. Ниже приведена схема производства мышей-диабетиков в зависимости от наличия или отсутствия маркерного гена *misty*.

Таким образом, при наличии гена *misty* производство мышей-диабетиков (db/db) возрастает в 3 раза по сравнению со скрещиванием, производимым «вслепую». Вместе с тем, для поддержания мутантных линий мышей, неспособных к естественному размножению, используется метод трансплантации яичников от мутантов-гомозигот (доноров) их фертильным сестрам (реципиентам) нормального фенотипа, чем мы и смогли воспользоваться [4]. Однако в данном случае, помимо технических трудностей, обусловленных сильным ожирением мышей-диабетиков, этот метод оказался еще и неэффективным в силу очень низкой плодовитости самок-реципиентов, что связано, по всей видимости, с гипофункцией яичников, трансплантированных от самок db/db.

Кроме того, мы пытались отбирать гетерозигот для скрещивания по показателю уровня сахара в крови, полагая, что у гетерозигот его уровень должен значительно превышать показатели нормальных мышей гомозигот (+/+). Результаты проведенного эксперимента показали несостоятельность и данного варианта отбора гетерозигот из-за отсутствия заметной разницы по уровню глюкозы в крови у исследуемых животных.

На основании изложенного, представляется наиболее целесообразным путь повторного введения маркерного гена *misty* в генотип мышей C57BL/Ks-Lepr^{db}+/+, что и явилось целью настоящей работы.

Схема производства мышей-диабетиков в зависимости от наличия или отсутствия маркерного гена *misty*

Вариант I – при наличии гена *misty* в производстве участвуют только гетерозиготы

Гаметы	db+	+m
Гаметы	db+/db+	db+/+m
+m	db+/+m	+m/+m

Ожидаемый выход потомства при скрещивании гетерозигот
 1 – db+/db+ – 25%
 2 – db+/+m – 50%
 1 – +m/+m – 25%

Вариант II – при отсутствии гена *misty* скрещивание производится «вслепую»
 1 – гетерозиготы гетерозиготы

Гаметы	db+	+
Гаметы	db+/db+	db+/+
+	db+/+	+/+

Выход потомства
 1 – db+/db+
 2 – db+/+
 1 – +/+

2 – гетерозиготы гомозиготы

Гаметы	db+	+
Гаметы	db+/+	+/+
+	db+/+	+/+

Выход потомства
 2 – db+/+
 2 – +/+

3 – гомозиготы гомозиготы

Гаметы	+	+
Гаметы	+/+	+/+
+	+/+	+/+

Выход потомства
 4 – +/+

Итого ожидаемый выход мышей при скрещивании «вслепую»:

1 – db+/db+ – 8,3%
 4 – db+/+ – 33,3%
 7 – +/+ – 58,3%

Материалы и методы

Носителями гена *misty* в коллекционном фонде Центра являются также мыши линии MLR/Y. Для перевода гена *misty* на генотип C57BL/Ks-Lepr^{db/+} была использована стандартная схема скрещиваний:

- скрещивание мышей MLR/Y и C57BL/10Sn с получением F1 – гетерозигот (черной масти), несущих ген *misty*;
- получение гибридов F2 и отбор гомозигот по гену *misty* (мышей темно-серого окраса);
- 10 последовательных скрещиваний гибридов F2 генотипа +m/+m с мышами C57BL/Ks-Lepr^{db/+}, проводя анализирующее скрещивание в каждом поколении;
- проверка потомков десятого кросса на носительство гена Lepr^{db/+m}.

Результаты и их обсуждение

Проверкой потомков десятого поколения было установлено одновременное носительство ими гена Lepr^{db/+} и *misty*, т.е. Lepr^{db/+m}, что позволило сформировать племенное ядро и в дальнейшем поддерживать линию методом тесного инбридинга – братско-сестринского скрещивания. В настоящее время, после введения гена *misty*, линия прошла 10 поколений (№10F10). С целью подтверждения идентичности животных вновь сформированного племенного ядра Lepr^{db/+m} с исходным племенным ядром – Lepr^{db/+} была проведена реципрокная изотрансплантация кожи по общепринятой методике [1, 2]. Ценность метода заключается в том, что он позволяет контролировать гомозиготность по большому числу генов, так как совместимость тканей – полигенный признак: дает возможность выявить очень слабые генетические различия между животными одной линии, обусловленные остаточной

гетерозиготностью или спонтанными мутациями. Критерием гомозиготности инбредных животных в опытах с трансплантацией кожи служит 100% приживление трансплантатов в пределах линии [7].

В опыте было использовано 7 мышей диабетиков – гомозигот из обоих племендер в возрасте 2–3 месяцев. Животные были разбиты на две группы: первые составляли 3 особи db/db – из племяндр C57BL/Ks-Lepr^{db/+}; вторую – 4 особи db/db из племяндр C57BL/Ks-Lepr^{db/+m}.

Результаты трансплантации кожных лоскутов представлены в табл. и на рис. 2. Отторжение трансплантатов по техническим причинам во внимание не принимается, поскольку устанавливается уже на 7-й день в момент снятия повязки, тогда как приживаемость кожных лоскутов определяется через 100 дней. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что все трансплантаты прижились стопроцентно. Следовательно, сублиния C57BL/Ks-Lepr^{db/+m} с восстановленным маркерным геном *misty* сохранила генетический статус линии. Она практически не отличается от исходной линии и фенотипически (по уровню глюкозы в крови). Так, если у исходной линии



Рис. 2. А – мышь, у которой трансплантат отторгся, хорошо видно пустое «окошко»; Б – трансплантат прижился, на нем имеется волосистой покров.

Таблица

Результаты трансплантации кожных лоскутов

Схема трансплантации	Количество трансплантантов	Количество прижившихся трансплантантов	Количество неприжившихся трансплантантов (в том числе по техническим причинам)
группа 1 группа 2	7	6	1 (1)
группа 2 группа 1	7	6	1 (1)
группа 1 группа 1	2	2	0 (0)
группа 2 группа 2	4	3	1 (1)

Примечание: В скобках указано число трансплантантов, отторгшихся по техническим причинам, каковыми могут быть кожный зуд (расчесывание места трансплантации), смещение трансплантанта в момент наложения повязки.

C57BL/Ks-Lepr^{db/+} уровень глюкозы составлял 18,7 моль/л, то у линии с восстановленным геном misty – C57BL/Ks-Lepr^{db/+} m он равен 17,8 моль/л, разница статистически недостоверна. Таким образом, линия C57BL/Ks-Lepr^{db/+} m вполне может быть использована в качестве адекватной модели сахарного диабета 2 типа.

Выводы

Длительная (на протяжении нескольких лет) и трудоемкая работа по восстановлению утерянного маркерного гена misty успешно завершена и оправдана следующими положениями. Во-первых, наличие гена misty в геноме линии мышей позволяет избежать неэффективных, слепо проводимых скрещиваний в племядре при производстве мышей диабетиков-гомозигот. Во-вторых, выход мышей диабетиков существенно увеличивается по сравнению со 100%-м скрещиванием всех потомков, что, в свою очередь, снижает затраты как материально-денежных средств, так и труда при получении биомоделей.

Список литературы

1. **Бескова Т.Б.** Модификация метода реципрокной трансплантации кожи у лабораторных мышей // Биомедицина. 2007. № 6. С.161-163.
2. **Бландова З.К.** Контроль гомозиготности инбредных линий мышей и крыс методом трансплантации кожи. Методические указания. М. 1982.
3. **Дубровская С.** Настольная книга диабетика. М.: РИПОЛ классик. 2009.
4. **Игнатьева Е.Л.** Микрохирургический метод поддержания мутантной линии мышей, неспособных к размножению / В сб.: Актуальные вопросы стандартизации лабораторных животных для медико-биологических исследований. М. 1988. С.76-78.
5. Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н.Каркищенко, С.В.Грачева. М.: Профиль-2С. 2010. 358 с.
6. **Степанова О.И., Каркищенко Н.Н., Баранова О.В., Галахова Т.В., Семенов Х.Х., Бескова Т.Б., Степанова Е.А., Закирьянов А.Р., Онищенко Н.А.**

Мутантные мыши C57BL/Ks-Lepr^{db/+} как генетическая модель сахарного диабета 2 типа // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. том 144. № 12. С. 664-667.

7. **Billingham R.E., Silvers W.K.** Inbred animals and tissue transplantation immunity // Plast and reconstr.: surg. and. transpl. bill. 1959. vol. 28. P.199-406.

Renewal of lost gene misty in genotype C57BL/Ks-Lepr^{db/+} mice

T.B. Beskova, N.N. Karkischenko, Kh.Kh. Semenov, O.I. Stepanova, E.L. Matveenko

In collection fund of Scientific Center of biomedical technologies under the RAMS mutant strain C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m mice is supporting, homozygote of these mice is adequate model of pancreatic diabetes II type. The special feature is that homozygote of both sex are infertile. Strain is supporting by heterozygote crossing. Mutant recessive gene misty promotes heterozygote selection. This gene in homozygote status refines mice hair color. As the result of crossingover marker gene was lost, and selection of heterozygote by external indication became impossible. Renewal of marker gene misty in genome of C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m mice strain is the aim of this work. Gene misty was transfer from strain MLR/Y in genome C57BL/Ks-Lepr^{db/+} strain by standard genetics and selection methods, so the name of strain C57BL/Ks-Lepr^{db/+}m was return back.

Key words: gene, heterozygotes, homozygotes, a diabetes, biomodel.