

УДК 576.5

## ТРАНСГЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ АСПЕКТЫ

© 2013 г. **О.Л. Серов**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики  
Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия, e-mail:

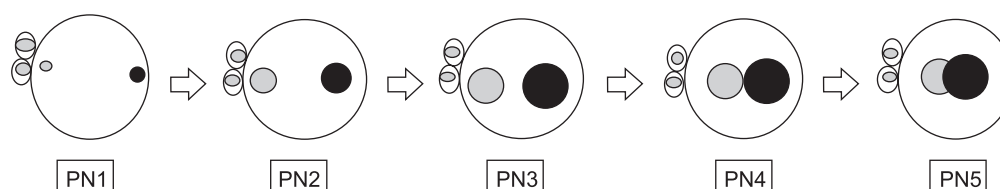
Поступила в редакцию 5 июня 2013 г. Принята к публикации 1 ноября 2013 г.

Геном клетки любого животного и растения постоянно контактирует с чужеродной ДНК других видов или прокариотической ДНК бактерий, грибов, вирусов и т. д. Как правило, цитоплазма клетки «справляется» с этим потоком чужеродной ДНК, поступающей с продуктами питания, расщепляя ее до нуклеотидов в специализированных цитоплазматических структурах, таких как лизосомы. В результате чужеродная ДНК не доходит до ядра клеток и, следовательно, лишена возможности «включиться» в ее геном. Исключением являются ретровирусы, способные проникать через клеточные мембраны и достигать ядра клетки и даже встраиваться в ее геном, становясь его облигатным наследуемым компонентом. Это отдельная тема, связанная с эволюцией взаимоотношений геномов вирусов (паразитов) и клеток животных и растений, в ходе которой выработался специальный механизм, позволяющий чужеродной ДНК встраиваться в геном клеток-мишеней, тем самым его модифицируя.

Немногим более 30 лет назад исследователи разработали способ переноса генов, чужерод-

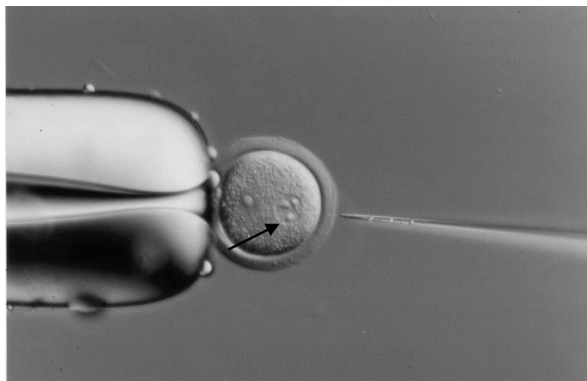
ной ДНК от одного вида животных к другому (Gordon *et al.*, 1980; Brinster *et al.*, 1981). Учитывая решающую роль цитоплазмы в «охране» генома от чужеродной ДНК, авторы разработали метод прямой микроинъекции рекомбинантной ДНК в мужской пронуклеус (на стадии P3–P4) (рис. 1) зигот мыши. Пронуклеус – аналог ядра – практически не содержит ферментов, деградирующих ДНК, потому инъекцированная ДНК может сохраняться продолжительное время, не менее одного клеточного цикла, а в реальности сохраняется даже после 3–5 делений.

Сама процедура инъекции в пронуклеус осуществляется под микроскопом с помощью микроманипулятора (рис. 2), в результате чего в пронуклеус инъекцируется 2000–4000 копий рекомбинантной ДНК в объеме 1–2 пкл. После микроинъекции пронуклеус увеличивается в объеме, что является свидетельством успешности процедуры. Поскольку процедура травматична, экспериментальные зиготы после инъекции кратковременно культивируют (2–3 ч), затем визуально идентифицируют и удаляют поврежденные зиготы. Неповрежденные



**Рис. 1.** Схема развития одноклеточного эмбриона мыши.

Хроматин мужского (отцовский) и женского (материнский) пронуклеусов представлены темным и серым цветами соответственно. PN1 – небольшие пронуклеусы расположены по периферии эмбриона; PN2 – пронуклеусы увеличиваются в размерах и начинают двигаться к центру эмбриона; PN3 – пронуклеусы продолжают увеличиваться в размерах и сближаться; PN4 – большие пронуклеусы находятся рядом в центре эмбриона; PN5 – пронуклеусы сливаются и вступают в митоз.



**Рис. 2.** Начальный момент подведения микропипетки с раствором ДНК (справа) к зиготе мыши, удерживаемой пипеткой-присоской.

Справа в зиготе хорошо виден мужской пронуклеус (показан стрелкой), а слева – женский.

экспериментальные зиготы трансплантируют хирургическим путем в воронку матки суперовулированных (псевдобеременных) самок (рис. 3). Несмотря на сложность процедуры микроинъекции ДНК в зиготы, квалифицированный оператор способен инъектировать 50–70 зигот за один опыт и затем трансплантировать приемным матерям.

Судьба инъектированной ДНК в зиготах складывается по-разному. В небольшом объеме ядра введенная ДНК присутствует в высокой концентрации, что приводит к образованию конкатенатов, т. е. комплексов из нескольких молекул, связанных нековалентными связями. Как отмечалось выше, введение рекомбинантной ДНК осуществляется на стадии P3–P4 (рис. 1), т. е. в тот период, когда идет активная репликация ДНК в пронуклеусах реципиентного генома. Именно в ходе репликации, в момент образования репликационных вилок, создаются условия физического контакта хромосомной и экзогенной ДНК через образование нековалентных связей. Следствием такого контакта являются «вовлечение» экзогенной ДНК в репликацию хромосомной ДНК и встраивание (интеграция) чужеродной ДНК в хромосому реципиентного генома. Интегрированную чужеродную ДНК в реципиентном геноме принято называть **трансгеном**, так как она становится компонентом генома и, следовательно, способна наследоваться в последующих клеточных поколениях. Важно подчеркнуть, что, как правило,

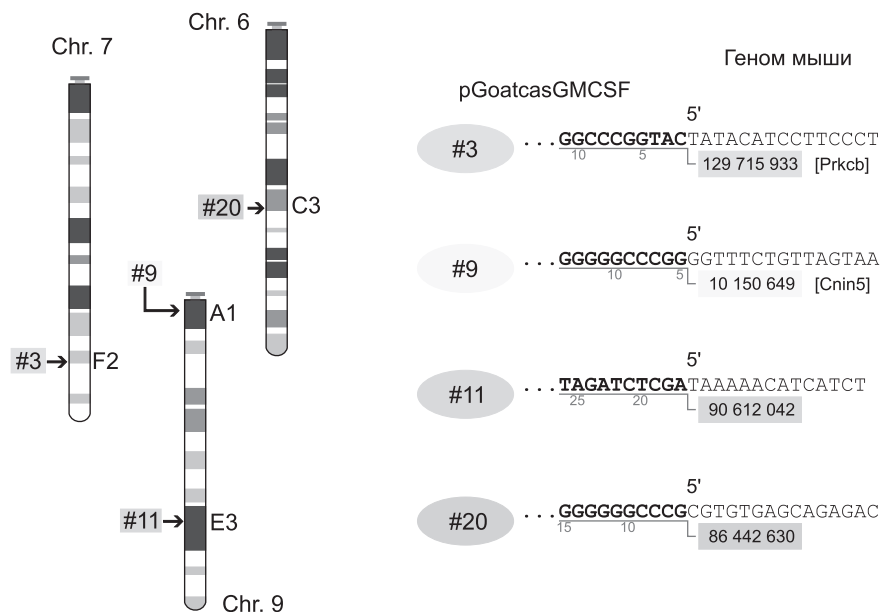


**Рис. 3.** Схема получения трансгенных животных путем инъекции чужеродной ДНК в зиготы.

интеграция происходит в одно место реципиентного генома, что иллюстрирует рис. 4. Важно отметить, что зачастую интеграция осуществляется в нескольких копиях, благодаря конкатенатам, образовавшимся до интеграции, о чем упоминалось выше.

Идентификация трансгенных животных среди родившихся особей из инъектированных зигот проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера (рис. 5). Нередко последовательности ДНК трансгенов не имеют гомологичных последовательностей в геноме реципиента, и потому подбором праймеров можно надежно идентифицировать трансгенных животных.

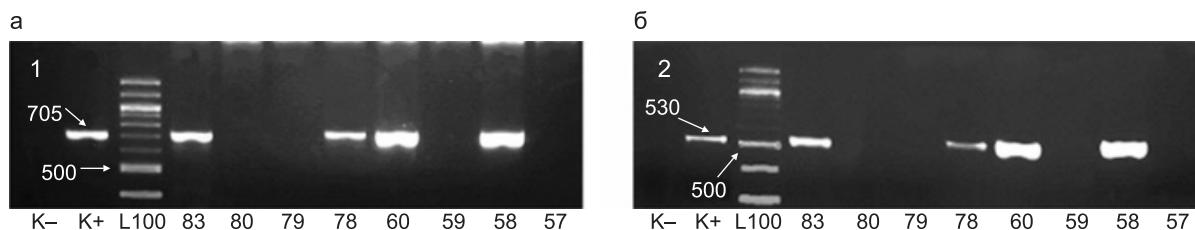
Сама процедура введения в геном животных чужеродной ДНК получила название **трансгенез** или реже **трансгеноз**. Однако, если интеграция чужеродной ДНК не произошла на



**Рис. 4.** Хромосомная локализация трансгена pGoatcasGMCSF у 4 трансгенных мышей #3, #9, #11 и #20, ставших основателями линий (Burkov *et al.*, 2013. P. 949–964).

Видно, что у трансгенных мышей #3 и #20 интеграция трансгена произошла в хромосомы 6 (Ch. 6) и 7 (Ch. 7), а у двух других интеграция прошла в хромосому 9 (Ch. 9), но в разные ее районы.

Справа представлены последовательности ДНК (выделены серым цветом) в местах инсерций трансгена (выделены черным цветом) на физической карте мыши.

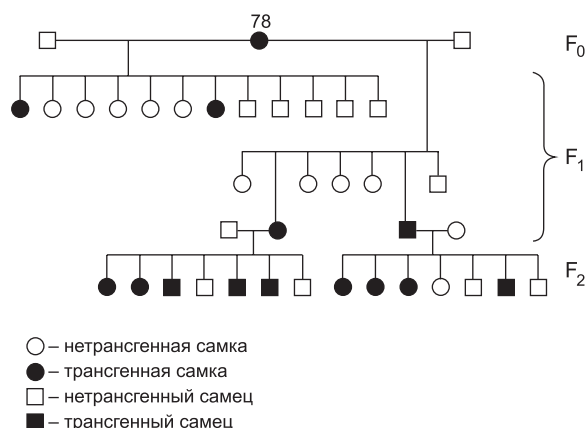


**Рис. 5.** Идентификация трансгенных животных с помощью ПЦР и с использованием праймеров, комплементарных (а) к 5'-последовательности промотора трансгена и последовательности внутри гена *hG-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор человека); к правой части гена *hG-CSF* и 3'-нетранс-крируемой области трансгена (справа) (б) (Serova *et al.*, 2011). Видно, что среди 8 исследованных животных 4: #83, #78, #60 и #58 позитивны по присутствию фрагментов ДНК ожидаемого размера, 705 п.о. (слева) и 530 п.о. (справа) соответственно. Позитивный контроль (К+) – рекомбинантная ДНК трансгена; негативный контроль (К-) – ДНК отсутствует; L100 – фрагменты маркерной ДНК разного молекулярного веса с шагом 100 п.о.

одноклеточной стадии, она может произойти на более поздней стадии, например на стадии 2 или 4 клеток. В этом случае развивающийся эмбрион будет мозаиком, состоящим из двух типов клеток, которые содержат трансген, и клеток, в которых он отсутствует, поскольку они являются потомками трансгенных и нетрансгенных бластомеров.

Другим важным последствием мозаицизма является то, что и гаметы трансгенного живот-

ного будут представлены также двумя типами – с трансгеном и без трансгена. В результате этого мозаицизма гамет в потомстве F<sub>1</sub> таких трансгенных животных от скрещивания с нетрансгенными животными будет наблюдаться отклонение от менделевского расщепления 1 : 1 (рис. 6) в пользу увеличения нетрансгенных потомков. Рис. 6 и 7 иллюстрируют мозаичное и менделевское наследование трансгенов у двух трансгенных животных. Частота мозаицизма варьирует от

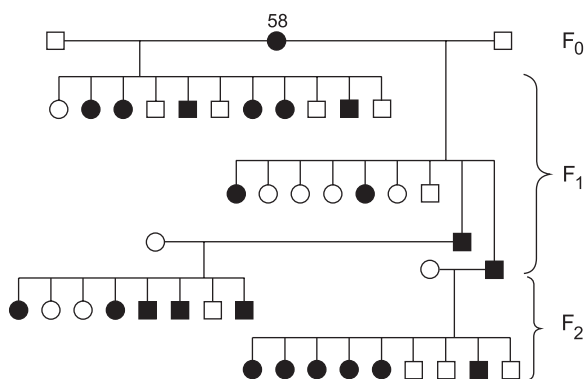


**Рис. 6.** Мозаичный тип наследования трансгена в потомстве  $F_1$  трансгенной самки #78 от скрещивания ее с 2 нетрансгенными самцами.

Видно значительное отклонение от ожидаемого 1 : 1 у потомков  $F_1$ , однако в последующих поколениях наблюдается менделевское расщепление, близкое к 1 : 1.

10 до 20 % среди трансгенных животных так называемого поколения  $F_0$ , т. е. родившихся и развившихся из инъецированных зигот.

Как отмечалось выше, интеграция трансгена происходит случайным образом, т. е. трансген попадает в разное хромосомное окружение (контекст). Следствием этого является достаточно выраженная вариабельность в экспрессии трансгена у разных трансгенных животных, от полного отсутствия экспрессии до уровня, сопоставимого с таковым аутентичного гена. В работах первых десятилетий такая вариабельность объяснялась именно влиянием хромосомного окружения трансгена. По мере накопления знаний о регуляции генов стало очевидным, что первоначальное упрощенное представление о достаточности «минимального» промотора для обеспечения надежной экспрессии трансгена распространялось слишком широко. Поводом послужило исследование трансгенных мышей, несущих конструкцию, включающую ген гормона роста человека, «слитого» с промотором гена эластазы крыс размером 213 п.о. (Ornitz *et al.*, 1985). Эти авторы наблюдали экспрессию гена гормона роста человека только в ацинарных клетках поджелудочной железы, т. е. в клетках, в которых активен ген эластазы. Однако большинство генов, особенно характеризующихся тканеспецифичной или стадиеспецифичной экспрессией, регулируются многими транскрипционными факторами, сайты

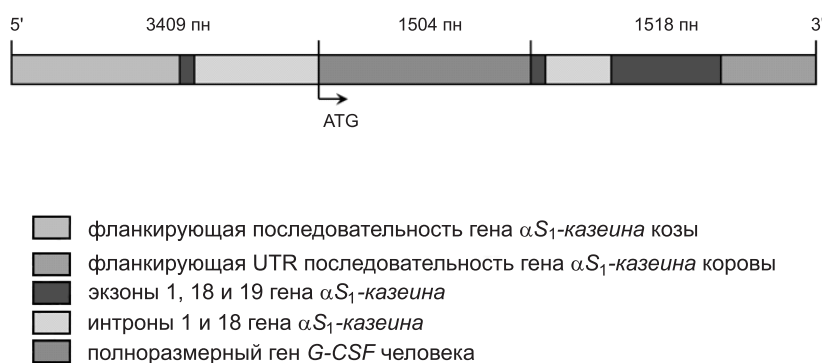


**Рис. 7.** Менделевское наследование трансгена в  $F_1$  и  $F_2$  трансгенной самки #58 от скрещивания с нетрансгенными животными.

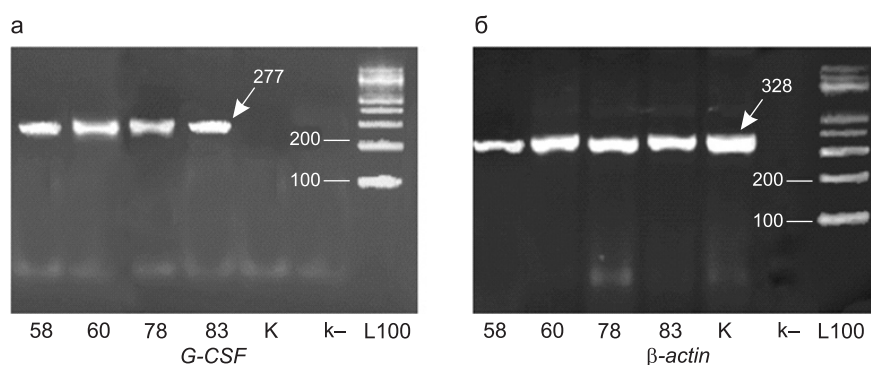
Обозначения те же, что и в рис. 6.

которых могут располагаться на протяженных 5'-фланговых последовательностях промоторов, нередко превышающих 10 и более тыс. п.о. С учетом этого неперенным условием при создании конструкций является сохранение ключевых регуляторных элементов в промоторах, контролирующей экспрессию целевого гена. В качестве примера можно рассмотреть создание конструкции, в которой 5'-фланговый район гена  $\alpha S_1$ -казеина козы был «слит» с полноразмерным геном *G-CSF* (кодирует гранулоцит-колониестимулирующий фактор) человека и 3'-нетранслируемым районом гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы (Serova *et al.*, 2011) (рис. 8). Присутствие 3409 п.о. фрагмента промотора  $\alpha S_1$ -казеина козы в конструкции достаточно для корректной экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей в молочной железе, и только в период лактации (рис. 9).

Тем не менее до сих пор не существует способов предотвращения эктопической экспрессии трансгенов, т. е. предсказуемый профиль экспрессии трансгена по органам и тканям может в реальности наблюдаться в тканях и клетках, в которых используемый промотор в норме неактивен. Большинство исследователей полагают, что причиной эктопической экспрессии является то, что в конструкции трансгена не представлены регуляторные последовательности, в норме расположенные за десятки тыс. п.о. от самого гена. Действительно, такие отдаленные системы



**Рис. 8.** Схема организации трансгена, содержащего 5'-фланкирующую последовательность вместе с промотором гена  $\alpha S_1$ -казеина козы размером 3409 п.о., ген *G-CSF* человека и 3'-фланкирующую последовательность гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы (Serova *et al.*, 2011).



**Рис. 9.** Анализ транскриптов гена *G-CSF* человека (а) и гена  $\beta$ -actin (б) в молочной железе у лактирующих трансгенных самок мышей: #58, #60, #78 и #83 и нетрансгенной самки (К). Видно, что транскрипт гена *G-CSF* человека ожидаемого размера (277 п.о.) присутствует у трансгенных самок, отсутствует у нетрансгенной, тогда как транскрипт (328 п.о.) гена  $\beta$ -actin (активен во всех клетках) определяется у всех анализируемых самок.

К – отрицательный контроль ОТ-ПЦР (не добавлена мРНК); L100 – маркер молекулярной массы.

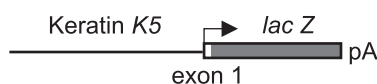
регуляции показаны для ряда генов, хотя для большинства генов это нехарактерно.

Для того чтобы преодолеть эктопическую экспрессию трансгенов, было предложено использовать большие фрагменты геномной ДНК (размером от 100 до 500 тыс. п.о.), включающей целевой ген. Для этого предлагается использовать векторы на основе ВАС клонов или искусственных хромосом (YAC клоны). Однако, как показали более поздние исследования, при инъекции гигантскими молекулами геномной ДНК имеет место их физическая «поломка» или перестройки при интеграции в хромосому реципиентного генома (Chandler *et al.*, 2007; Le Saux *et al.*, 2010).

За прошедшие более 30 лет с момента разработки технологии трансгенеза животных этот подход эффективно использовался и активно

применяется в настоящее время как в фундаментальных, так и прикладных исследованиях. Наиболее популярным методом анализа функции гена является маркировка его экспрессии в клетках в ходе развития трансгенных животных. Стратегия такого подхода основана на создании конструкций, в которых промотор разного размера анализируемого гена «слит» с геном-репортером, например, *lacZ* (кодирует бета-галактозидазу *E. coli*) (рис. 10) или GFP (кодирует «зеленый флуоресцентный белок», green fluorescent protein) (рис. 11).

Будучи введенным в геном животных, такой трансген позволяет визуализировать клетки, в которых активен анализируемый ген, путем гистохимического окрашивания их на активность бета-галактозидазы (в геноме млекопитающих такого фермента нет) (рис. 12).



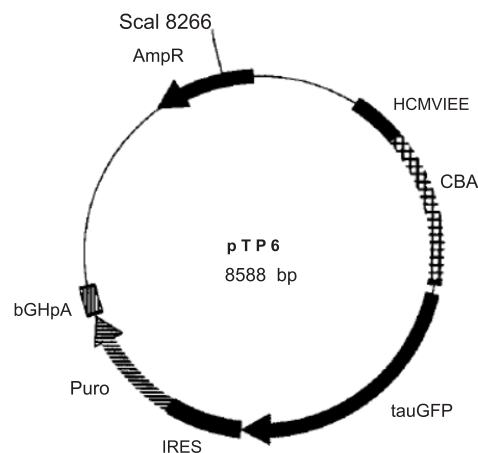
**Рис. 10.** Структура трансгена K5Z, в котором промотор гена кератина коровы размером 5300 п.о. «слит» с геном-репортером *lacZ E. coli* вместе с сигнальной последовательностью полиаденилирования SV40 (pA) (Ramírez *et al.*, 2001. P. 341–350).

Другой пример с использованием *GFP* позволяет визуализировать клетки, позитивные по экспрессии трансгена. На рис. 11 показана конструкция, несущая ген *GFP* под контролем промотора гена  $\beta$ -актина, активного в клетках любого типа.

Трансгенные мыши, несущие такой трансген в своем геноме, содержат меченые зеленым флюоресцентным белком клетки (рис. 13).

Визуализация экспрессии трансгена позволяет оценивать функцию промоторов с использованием в конструкциях разные их размеры. Такая стратегия позволила выявить функциональные регуляторные сайты у многих генов, имеющих клеточно- или тканеспецифичную экспрессию.

Разработанные экспериментальные подходы по получению трансгенных животных неизбежно привели к использованию трансгенных животных в прикладных целях в качестве «био-реакторов»-продуцентов биологически ценных белков человека. Наиболее популярными и продвинутыми технологиями является получение трансгенных животных (козы, овцы, коровы и т. д.), в геном которых введены конструкции, находящиеся под контролем промоторов «молочных генов», как это показано на рис. 8. «Молочные гены» – это группа генов, которые экспрессируются исключительно в эпителиальных клетках молочной железы, причем особенно активно в период лактации. Белки молока млекопитающих представлены главным образом  $\alpha S_1$ -,  $S_2$ -,  $\beta$ - и  $\kappa$ -казеинами (более 70 % всех белков молока), а также лактальбуминами и лактаглобулинами. У грызунов в молочной железе активен еще один ген, *acid whey*, кодирующий «кислый» белок. В качестве примера можно рассмотреть конструкцию, представленную на рис. 8, в которой 5'-фланкирующая последовательность, включающая промотор гена  $\alpha S_1$ -казеина козы, «слита» с полноразмерным



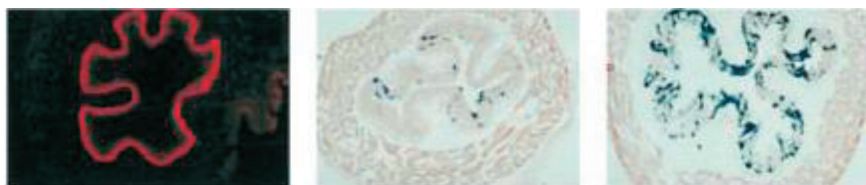
**Рис. 11.** Конструкция tauGFP с геном-репортером «зеленый белок» (*GFP*) под контролем промотора гена  $\beta$ -актина курицы (CBA) и селективируемым геном устойчивости к пурамицину (Puro) (Pratt *et al.*, 2000. P. 19–28).

геном *G-CSF* человека и 3'-фланкирующей последовательностью гена  $\alpha S_1$ -казеина коровы. При создании этой конструкции предусматривалось, что при введении ее в геном мышей или коз она будет обеспечивать экспрессию гена *G-CSF* человека в молочной железе трансгенных животных. Анализ экспрессии гена *G-CSF* человека у трансгенных мышей показал присутствие транскриптов этого гена только в молочной железе (рис. 9). Более того, иммунофлюоресцентный анализ с использованием меченых антител против гранулоцит-колониестимулирующего фактора (Г-КСФ) человека показал, что этот белок присутствует только в эпителиальных клетках молочной железы (рис. 14).

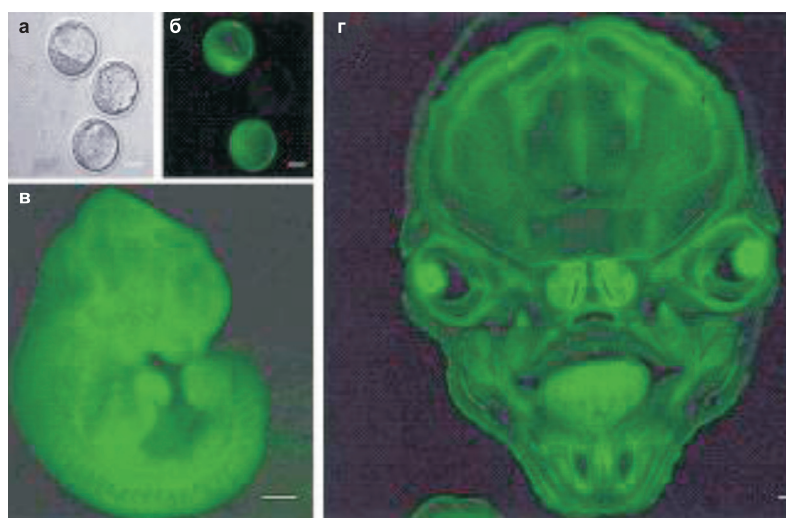
Независимый Вестерн-блот анализ Г-КСФ в молоке трансгенных мышей показал присутствие белка, причем в двух формах – гликозилированной и негликозилированной (рис. 15). Важно отметить, что гликозилированная форма Г-КСФ человека функционально соответствует той форме, которая синтезируется в норме у человека, тогда как негликозилированная менее активна.

Важно отметить, что секретируемый белок Г-КСФ человека в молоке трансгенных мышей (рис. 16) обладает функциональными свойствами, сопоставимыми с нативным Г-КСФ человека.

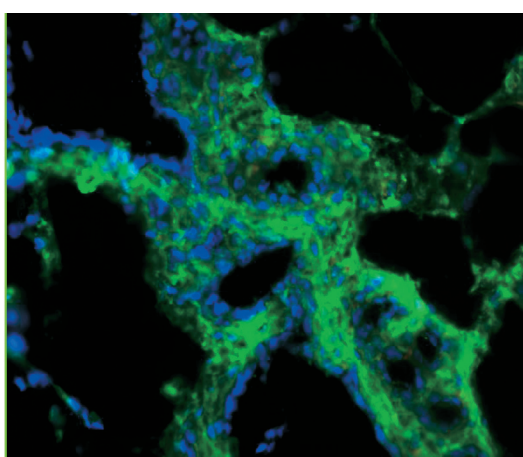
На рис. 17 показаны результаты колониеобразующей активности образцов молока по стимулированию пролиферации клеток-предшест-



**Рис. 12.** Сравнение экспрессии эндогенного гена *keratin 5* в клетках пищевода (крайний слева, окраска с мечеными антителами против кератина 5) и трансгена K5Z в двух трансгенных линиях мышей в клетках пищевода (в середине и крайний справа, гистохимическая окраска на  $\beta$ -галактозидазу *E. coli*). Видно, что у одного трансгенного животного экспрессия трансгена K5Z (крайний справа) напоминает таковую эндогенного гена, тогда как у другого только часть клеток эпителия пищевода экспрессирует трансген K5Z (в центре), т. е. имеет место мозаичный тип экспрессии (Ramírez *et al.*, 2001. P. 341–350).

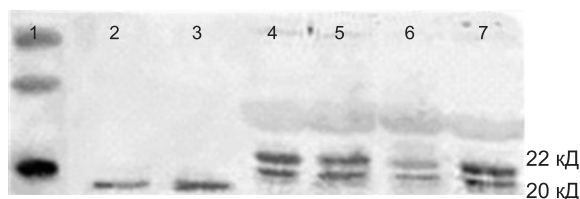


**Рис. 13.** Экспрессия репортерного гена *GFP* у гетерозиготных по трансгену двух (б) из трех бластоцист (а), у эмбриона 10-го дня развития (в); г – распределение «зеленого белка» в структурах головы эмбриона. Можно видеть, что все клетки позитивны по экспрессии *GFP* на всех стадиях развития (Pratt *et al.*, 2000. P. 19–28).



**Рис. 14.** Иммунофлуоресцентный анализ Г-КСФ человека в молочной железе трансгенной самки мыши на 10-й день лактации.

Видно, что большинство эпителиальных клеток позитивны по Г-КСФ (зеленый цвет). ДНК ядер клеток подкрашены DAPI.



**Рис. 15.** Результаты Вестерн-блот анализа молока трансгенных мышей с использованием антител против Г-КСФ человека.

1 – маркеры с различными молекулярными весами в кД; 2, 3 – препараты рекомбинантного Г-КСФ человека (негликозилированный -20 кД); 4–7 – молоко трансгенных самок, содержащее как гликозилированную форму Г-КСФ с молекулярным весом 22 кД, так и негликозилированную форму.

венников гранулоцитарного ряда на примере пуповинной крови человека. Видно, что колонии содержат клетки гранулоцитарного ряда на разных стадиях дифференцировки. Клетки пуповинной крови обработаны молоком трансгенной самки мыши, разведенным в 30000 раз.

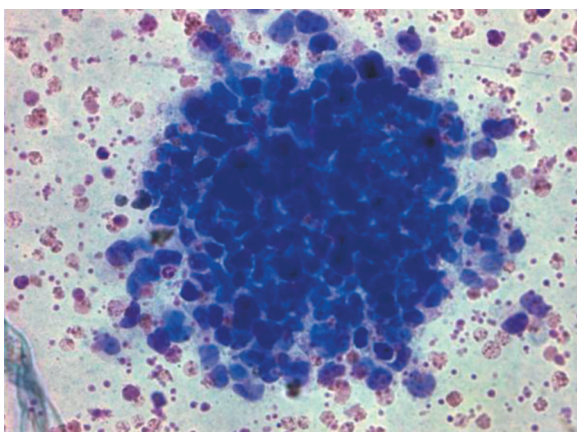
Суммируя результаты, полученные на трансгенных мышах, несущих ген *G-CSF* человека под контролем регуляторной последовательности гена  $\alpha S_1$ -казеина козы, следует добавить, что продукция белка Г-КСФ человека достигала 1 мг в миллилитре молока. Из этого следует, что молоко с таким содержанием целевого белка может служить источником для его очистки. Вполне понятно, что мыши для этой цели не подходят. Однако полученные данные о параметрах экспрессии данной конструкции привлекательны и могут быть использованы для получения трансгенных коз как продуцентов Г-КСФ человека.

Такой эксперимент провели, были получены трансгенные козы, несущие такую же конструкцию. Анализ молока трансгенных коз подтвердил, что в период лактации уровень Г-КСФ человека в молоке достигал 2 мл/мл. Это достаточный уровень для использования молока трансгенных коз в качестве источника для выделения Г-КСФ человека для медицинских целей.

В настоящее время получены различные виды трансгенных животных, секретирующих с молоком рекомбинантные белки человека. Некоторые из таких белков находятся на стадии клинических испытаний либо уже представлены на фармацевтическом рынке (табл.).



**Рис. 16.** Образец молока трансгенной мыши.



**Рис. 17.** Колония клеток-предшественников гранулоцитарного ряда, полученная из клеток пуповинной крови человека после обработки молоком трансгенной мыши (разведение 30000 раз).

Так, например, белок антитромбин-3 человека (торговая марка ATryn, GTC Biotherapeutics, USA), продуцируемый в молочной железе трансгенных коз, успешно прошел все фазы преclinical и клинических испытаний и в данный момент представлен на рынке. ATryn используется в клинике для восстановительной терапии пациентов, перенесших кардиопульмонарное шунтирование. В настоящее время компанией GTC Biotherapeutics с использованием «молочных биореакторов» получены, по крайней мере, еще 11 различных ценных белков человека. Другая биотехнологическая компания, Pharming BV, наладила выпуск фермента



Таблица

Перечень белков, получаемых из молока трансгенных животных, отобранных для создания терапевтических препаратов (Niemann, Kues, 2007; Kues, Niemann, 2011)

Препарат	Компания	Биореактор	Стадия подготовки препарата
АТгуп (рекомбинантный антитромбин III человека)	GTC Biotherapeutics	Коза	Европа: Одобрено EMEA США: одобрено FDA
Ингибитор С-1-эстеразы	Pharming	Кролик	Фаза 3
ММ-093 ( $\alpha$ -фетопротеин)	Merrimack and GTC Biotherapeutics	Коза	Фаза 2
$\alpha$ -глюкозидаза	Pharming	Кролик	Фаза 3 Европа: одобрено EMEA
Гормон роста человека	BioSidus	Корова	Преclinical испытания
Альбумин	GTC Biotherapeutics	Корова	Преclinical испытания
Фибриноген	Pharming	Корова	Преclinical испытания
Коллаген	Pharming	Корова	Преclinical испытания
Лактоферин	Pharming	Корова	Преclinical испытания
$\alpha$ -1-антитрипсин	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания
Малярийная вакцина	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания
Моноклональные антитела CD 137 (4-1BB)	GTC Biotherapeutics	Коза	Преclinical испытания

альфа-глюкозидазы человека, продуцируемого в молоке трансгенных кроликов.

В трансгенезе сельскохозяйственных животных представляет интерес также относительно новое направление – продукция в молочной железе особых рекомбинантных белков-антидотов. В частности, это антитела против фосфорорганических соединений, используемых в химической промышленности и в качестве инсектицидов в сельском хозяйстве. Одним из таких белков является фермент бутирилхолинэстераза. К настоящему времени рекомбинантная бутирилхолинэстераза уже получена в молочной железе трансгенных мышей и коз, ее концентрация в молоке составляет до 5 г/л.

Суммируя выше описанное, можно констатировать, что использование трансгенных животных в качестве биореакторов – реальность с хорошей перспективой развития в будущем.

#### ЛИТЕРАТУРА

- Brinster R.L., Chen H.Y., Trumbauer M. *et al.* Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs // *Cell*. 1981. V. 27. No. 1. Pt 2. P. 223–231.
- Burkov I.A., Serova I.A., Battulin N.R. *et al.* Expression of the human granulocyte–macrophage colony stimulating factor (hGM-CSF) gene under control of the 50-regulatory sequence of the goat alpha-S1-casein gene with and without a MAR element in transgenic mice // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 949–964.
- Chandler K.J., Chandler R.L., Broeckelmann E.M. *et al.* Relevance of BAC transgene copy number in mice: transgene copy number variation across multiple transgenic lines and correlations with transgene integrity and expression // *Mamm. Genome*. 2007. V. 18. P. 693–708.
- Gordon J.W., Scangos G.A., Plotkin D.J. *et al.* Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA // *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1980. V. 77. P. 7380–7384.
- Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis // *Prev. Vet. Med.* 2011. V. 102. P. 146–156.
- Le Saux A., Houdebine L.-M., Jolivet G. Chromosome integration of BAC (bacterial artificial chromosome): evidence of multiple rearrangements // *Transgenic Res.* 2010. V. 19. P. 923–931.
- Niemann H., Kues W.A. Application of transgenesis in livestock for agriculture and biomedicine // *Anim. Reprod. Sci.* 2003. V. 79. P. 291–317.
- Niemann H., Kues W.A. Transgenic farm animals: an update // *Reprod. Fertil. Dev.* 2007. V. 19. P. 762–770.
- Ornitz D.M., Palmiter R.D., Hammer R.E. *et al.* Specific expression of an elastase-human growth hormone fusion gene in pancreatic acinar cells of transgenic mice // *Nature*. 1985. V. 13. P. 600–602.

- Pratt T., Sharp L., Nichols J. *et al.* Embryonic stem cells and transgenic mice ubiquitously expressing a Tau-tagged green fluorescent protein // *Dev. Biol.* 2000. V. 228. P. 19–28.
- Ramírez A., Milot E., Ponsa I. *et al.* Sequence and chromosomal context effects on variegated expression of keratin 5/lacZ constructs in stratified epithelia of transgenic mice // *Genetics.* 2001. V. 158. P. 341–350.
- Serova I.A., Dvoryanchikov G.A., Andreeva L.E. *et al.* A 3,387 bp 50-flanking sequence of the goat alpha-S1-casein gene provides correct tissue-specific expression of human granulocyte colony-stimulating factor (hG-CSF) in the mammary gland of transgenic mice // *Transgenic Res.* 2011. V. 21. P. 485–498.