

ПРОЯВЛЕНИЕ МУТАЦИИ *DOMINANT WHITE SPOTTING* У РАННИХ ЗАРОДЫШЕЙ МЫШЕЙ ПРИ КУЛЬТИВИРОВАНИИ *IN VITRO*

Вихлянцева Е.Ф.¹, Сахарова Н.Ю.¹, Ковалицкая Ю.А.²,
Смирнов А.А.¹, Малашенко А.М.³

¹*Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пуццино*

²*Пуцинский Государственный Университет, Пуццино*

³*Научный центр биомедицинской технологии РАМН, Москва*

Мутация Dominant White Spotting (*Kit^w*) наиболее полно изучена на мышах, для которых известно более 70 мутантных аллелей. Большинство аллелей приводит к гибели гомозиготных особей. Гетерозиготные животные жизнеспособны, но у них изменена окраска шерсти, нарушены кроветворение и гаметогенез (Green, 1989). Эта мутация известна и у человека. Внешне она проявляется в виде белых пятен на лбу и животе и белой пряди волос (пегость). Фенотипическое проявление мутации *Kit^w* у мышей связано с нарушениями строения гена *c-kit*, расположенного в 5-й хромосоме и кодирующего рецепторную тирозинкиназу (Chabot et al., 1988; Fleischman, 1992). Эта мутация представляет большой интерес для исследователей, так как *c-kit*-ген, кодирующий рецепторную тирозинкиназу вместе со своим лигандом SCF (stem cell factor), участвует в запуске многих важных внутриклеточных процессов, приводящих к делению и дифференцировке клеток (Ashman, 1999). Особое внимание обращено на роль мутаций *c-kit*-гена в функционировании репродуктивной системы (Kissel et al., 2000). Известно, что *c-kit*-рецепторы находятся в постакросомальной области сперматозоидов (Sandlow et al., 1997). В отношении оогенеза было показано, что в ооцитах, начиная со стадии малого роста и до стадии фолликула, идет накопление *c-kit*-транскриптов (Horie et al., 1991; Nishina et al., 1992).

Представляет большой интерес выяснение проявления этого гена в раннем эмбриогенезе, так как в этот период на жизнеспособность зародышей большое влияние оказывают ростовые факторы, действующие через рецепторы тирозинкиназного типа (Sitte et al., 2000; Kinsey, Schesinger, 1997), к которым и относятся *c-kit*-мембранные рецепторы. В отношении раннего эмбриогенеза известно, что экспрессия *c-kit* гена у зародышей мышей выявляется на стадии 8-ми бластомеров (Horie et al., 1991). Также была обнаружена активная экспрессия мРНК SCF и *c-kit* гена в имплантирующихся бластоцистах и в клетках эндометрия, что свидетельствует об их важной роли в процессе имплантации (Masahiro Mitsunari, 1999). Информация о роли *c-kit*-лигандной системы может быть получена при наблюдении за развитием мутантных зародышей. В связи с этим мы исследовали развитие ранних зародышей, полученных от мышей C57Bl/6 (B6), несущих аллель *Kit^{w-y}* или *Kit^{w-v}*, имеющих одинаковый фенотип. Аллель *Kit^{w-v}* известна давно, а аллель *Kit^{w-y}* возникла недавно у мышей B6, находящихся в коллекции НЦ биомедицинских технологий РАМН (Светлые горы). Для выяснения роли основного генотипа зародышей

В6 с аллелью Kit^{w-y} , их развитие сравнивали с развитием зародышей мышей линии WR, также несущих мутантный аллель Kit^{w-y} .

Для получения эмбрионального материала были использованы гетерозиготные мыши Kit^{w-v} и Kit^{w-y} , мыши C57Bl/6 (+/+), а также мыши линии WR с генотипом aa (+/+) и гетерозиготы (+/ Kit^{w-y}) в возрасте 8-10 недель.

Мы исследовали состояние эмбрионального материала, полученного из яйцеклеток самок В6 на 2-й день после оплодотворения. К этому времени оплодотворенные яйцеклетки проходят первое деление дробления и обычно находятся на стадии 2-х бластомеров. Однако, часть яйцеклеток не вступает в деление дробления. Мы сравнивали долю неразвивающихся яйцеклеток при различных вариантах скрещивания мутантных мышей с этим показателем у мышей с нормальным (диким) c-kit-геном (рис 1). В контрольном варианте (+/+ x +/+) количество неразвивающихся яйцеклеток составляло 26%. В случае спаривания мышей, несущих аллель Kit^{w-v} , с мышами В6 (+/+) эта доля была сопоставима с контролем. Однако, при скрещивании между собой гетерозиготных мышей (+/ Kit^{w-v} x +/ Kit^{w-v}) количество неразвивающихся яйцеклеток было значительно выше (43,1%).

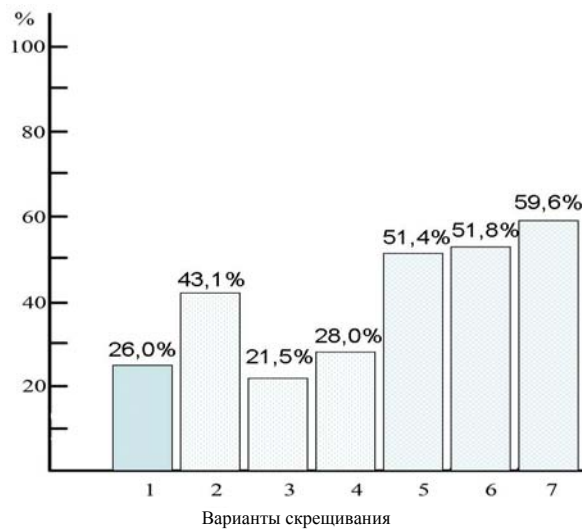


Рис. 1. Количество неразвивающихся яйцеклеток на 2-й день после оплодотворения у мышей C57Bl/6, несущих аллель Kit^{w-y} или Kit^{w-v} . Варианты скрещивания: 1- +/+ x +/+ (BL)-контроль, 2- +/ Kit^{w-v} x +/ Kit^{w-v} , 3 - +/ Kit^{w-v} x +/+, 4 - +/+ x +/ Kit^{w-v} , 5 - +/ Kit^{w-y} x +/ Kit^{w-y} , 6 - +/ Kit^{w-y} x +/+, 7 - +/+ x +/ Kit^{w-y} .

При всех вариантах скрещивания гетерозиготных мышей, несущих аллель Kit^{w-y} , количество неразвивающихся яйцеклеток было значительно больше контрольного уровня. Видно, что новая аллель Kit^{w-y} проявляет более выраженное негативное действие, чем аллель Kit^{w-v} , у мышей В6, и оно не зависит от того, самец или самка, или они оба являются носителями мутации.

Эти данные подтверждают важность c-kit-лиганд-рецепторной системы при гаметогенезе и оплодотворении и показывают, что нарушение её (в данном случае – рецепторной составляющей) приводит к уменьшению фертильной способности мышей. Мы показали, что аллель Kit^{w-y} в генотипе C57Bl/6 значительно снижает

количество яйцеклеток, способных к развитию. Затем мы проверили, как поведет себя эта мутация в другом генотипе. Для этой работы мы выбрали линию WR, также полученную в Светлых горах. В ее основе лежит хорошо известная 129-я линия, которая используется для получения эмбриональных стволовых клеток. Мутация Kit^{w-y} была переведена в генотип WR и мы исследовали, как она будет влиять на соотношение неразвивающихся яйцеклеток (рис. 2). Оказалось, что уровень неразвивающихся яйцеклеток у гетерозиготных мышей WR ($+/Kit^{w-y}$) незначительно превышал контрольный показатель и был гораздо ниже, чем при соответствующих вариантах скрещивания у мышей B6 ($+/Kit^{w-y}$). Так, при скрещивании гетерозиготных особей между собой у мышей линии WR он составил 38,6%, а у B6 – 59,6%. Это показывает, что степень негативного воздействия мутации Kit^{w-y} (ее экспрессивность) на процессы, происходящие при оплодотворении, определяется основным генотипом.

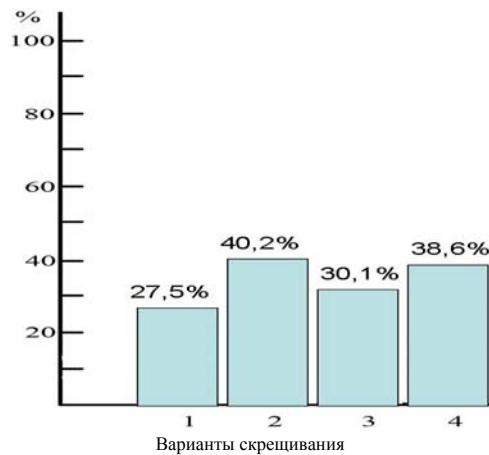


Рис. 2. Количество неразвивающихся яйцеклеток на 2-й день после оплодотворения у мышей WR, несущих аллель Kit^{w-y} . Варианты скрещивания: 1- $+/+ \times +/+$ (WR)-контроль, 2- $+/+ \times +/Kit^{w-y}$, 3- $+/Kit^{w-y} \times +/+$, 4- $+/Kit^{w-y} \times +/Kit^{w-y}$.

Затем мы исследовали развитие *in vitro* зародышей, полученных от мутантных мышей (рис. 3). Было показано, что развитие зародышей, полученных от скрещивания самок B6 и гетерозиготных самцов ($+/+ \times +/Kit^{w-v}$), не отличается от развития контрольных зародышей ($+/+ \times +/+$). Через три дня культивирования стадии бластоцисты достигло одинаковое количество зародышей (48,3% и 42,8% соответственно). В рассматриваемой подопытной группе были гетерозиготные зародыши и зародыши с диким геном (1:1). Таким образом, из этих данных следует, что в условиях *in vitro* гетерозиготные зародыши развиваются так же, как и нормальные. В случае скрещивания гетерозиготных мышей между собой ($+/Kit^{w-v} \times +/Kit^{w-v}$) количество сформированных бластоцист было значительно меньше (28,9%). В этой группе помимо диких и гетерозиготных зародышей были и гомозиготные (1:2:1). По-видимому, в первом случае гетерозиготные зародыши погибают во время формирования бластоцисты. Кроме того, сами бластоцисты при этом варианте скрещивания часто имели аномальное строение трофобласта и внутренней клеточной массы. Зародыши, полученные от скрещивания самок B6 и мутантных самцов, имели

нормальное строение с четко очерченным трофобластом и внутренней клеточной массой.

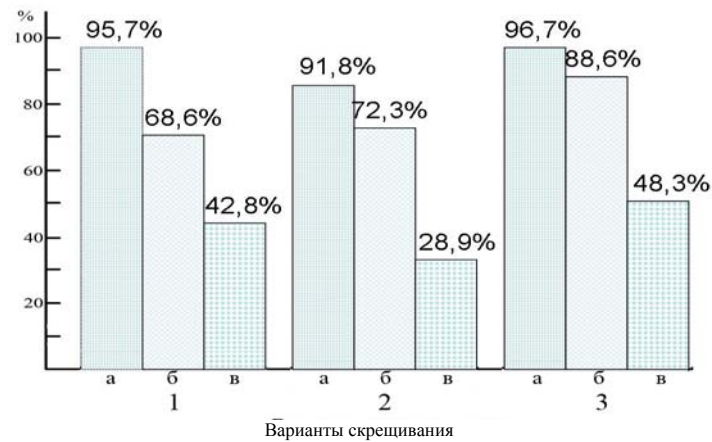


Рис. 3. Развитие *in vitro* зародышей мышей C57BL/6, несущих аллель Kit^{w-v} . Варианты скрещивания: 1- $+/+ \times +/+$ (BL)-контроль, 2- $+/Kit^{w-v} \times +/Kit^{w-v}$, 3- $+/+ \times +/Kit^{w-v}$. а- 4-8 кл. зародыши, б- ранняя компактизация, в- бластоцисты.

В случае аллели Kit^{w-y} (рис. 4), зародыши, полученные от скрещивания мутантных мышей с мышами В6, развивались так же, как и контрольные, что свидетельствует о нормальном развитии гетерозиготных зародышей. У зародышей, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных мышей ($+/Kit^{w-y} \times +/Kit^{w-y}$), жизнеспособность была намного ниже и количество сформированных бластоцист было намного меньше, чем в контроле (38,9% и 67,2% соответственно).

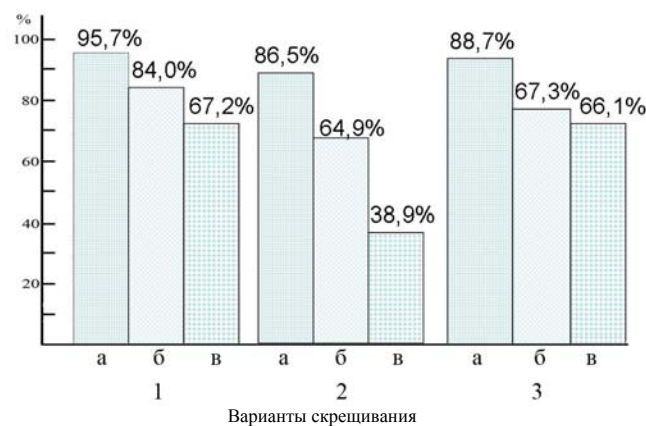


Рис. 4. Развитие *in vitro* зародышей мышей C57BL/6, несущих аллель Kit^{w-y} . Варианты скрещивания: 1- $+/+ \times +/+$ (BL)-контроль, 2- $+/Kit^{w-y} \times +/Kit^{w-y}$, 3- $+/+ \times +/Kit^{w-y}$. а- 4-ми кл. зародыши, б- 8-ми кл. зародыши/ранняя компактизация, в- бластоцисты.

По-видимому, и в этом случае гибнут прежде всего гомозиготные зародыши. Сравнение результатов культивирования зародышей с Kit^{w-v} и Kit^{w-y} аллелями показывает, что обе мутации в генотипе В6 сходно проявляют себя в раннем развитии, нарушая в основном формирование бластоцист у гомозиготных зародышей.

Наблюдение за развитием зародышей, полученных от скрещивания между собой гетерозиготных мышей WR, несущих мутацию Kit^{w-y} , показало, что развитие таких зародышей шло так же успешно, как и контрольных зародышей. Количество сформированных бластоцист в опыте ($+/Kit^{w-y} \times +/Kit^{w-y}$) было даже больше, чем в контроле ($+/+ \times +/+$) – 86,1% и 64,0% соответственно (рис 5). Это говорит о том, что в этом случае выживают и полностью проходят доимплантационное развитие *in vitro* не только гетерозиготные, но и гомозиготные зародыши. Эти данные подтверждают, что фенотипическое проявление мутации зависит от основного генотипа. В гомозиготном состоянии мутация Kit^{w-y} подавляет формирование бластоцист у зародышей с генотипом B6 и не нарушает этого процесса у зародышей с генотипом WR.

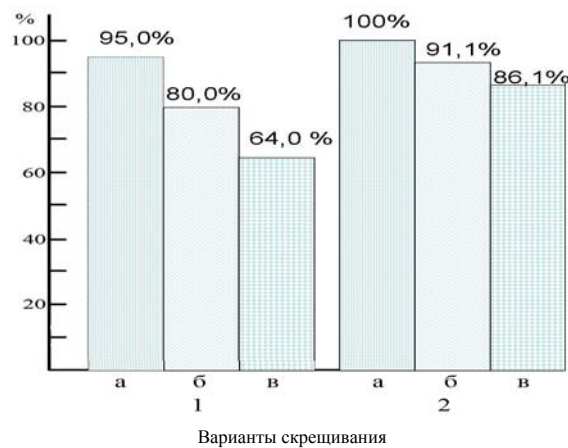


Рис. 5. Развитие *in vitro* зародышей мышей WR, несущих аллель Kit^{w-y} . Варианты скрещивания: 1- $+/+ \times +/+$ (WR)-контроль, 2- $+/Kit^{w-y} \times +/Kit^{w-y}$. а- 4-8 кл. зародыши, б- морулы/ранние бластоцисты, в- бластоцисты.

Таким образом, проведенные нами исследования обнаружили отрицательное влияние аллелей Kit^{w-v} и Kit^{w-y} на доимплантационное развитие мышей C57Bl. Выявленные различия в их проявлении в первые сутки после оплодотворения позволяют провести анализ причин ранней гибели яйцеклеток, которая может быть связана как с нарушениями в гаметогенезе у мутантных животных, так и с нарушениями в самом процессе оплодотворения. Мы показали, что на ранних стадиях дробления у зародышей B6, несущих аллели гетерозиготных мышей Kit^{w-v} и Kit^{w-y} , не снижается жизнеспособность, независимо от того, один или оба родителя несут мутантный ген. Однако, наблюдается резкое снижение образования бластоцист, полученных от обоих гетерозиготных родителей. По видимому, в условиях *in vitro* на этой стадии гибнут зародыши, гомозиготные по мутантным аллелям.

Было показано, что аллель Kit^{w-y} не оказывает отрицательного действия на формирование бластоцист у мышей WR. В условиях *in vitro* идет успешное доимплантационное развитие мутантных зародышей. Можно предполагать, что при этом сохраняются и гомозиготные зародыши. Таким образом, наши данные показывают, что фенотипическое проявление мутации Kit^{w-y} зависит от основного генотипа зародыша.

ЛИТЕРАТУРА

1. Green M.C.. Catalog of mutant genes and polymorphic loci. Genetic variants and strains of the laboratory mouse. Oxford, 1989: 12-40.
2. Chabot B., Stiphenson D.A., Chapman V.M. et al. The protooncogene c-kit encoding a transmembrane tyrosine kinase receptor maps to the mouse W locus. *Nature*, 1988, 335(17)88.
3. Fleischman R.A. Human piebald trait resulting from a dominant negative mutant allele of the c-kit membrane receptor gene. *J. Clin. Invest.*, 1992, 89: 1713-1717.
4. Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.*, 1999, Oct; 31(10): 1037-51.
5. Kissel H., Timochina I., Hardy M.P. et al. Point mutation in Kit receptor tyrosine kinase reveals essential roles for kit signalling in spermatogenesis and oogenesis without affecting other Kit responses. *EMBO J.*, 2000, 12:1312-1326.
6. Sandlow J.I., Feng H.L., Sandra A. Localization and expression of the c-kit receptor protein in human and rodent testis and sperm. *Urology*, 1997, 49: 494-500.
7. Horie K., Takahura K., Taii Sh., et al. The expression of c-kit protein during oogenesis and early embryonic development. *Biol. Reprod.*, 1991, 45: 547-552.
8. Nishina Y., Kobara Y., Sumi T. et al. Expression of c-kit protooncogen is stimulated by cAMP in differentiated F9 mouse teratocarcinoma cells. *Exp. Cell Res.*, 1992, 198: 352-356.
9. Sette C., Dolci S., Geremia R. et al. The role of stem cell factor and of alternative c-kit gene products in the establishment, maintenance and function of germ cells. *Int. J. Dev. Biol.*, 2000, 44: 599-608.
10. Kinsey W.H., Schlesinger J. Tyrosine kinase signalling of fertilization. *J. BBRC*, 1997, 240: 519-522.
11. Masahiro Mitsunari, Tasuku Harada, Masahiro Tanikawa, Tomio Iwabe, Fuminori Taniguchi and Naoki Terakawa. The potential role of stem cell factor and its receptor c-kit in the mouse blastocyst implantation. *Molecular Human Reproduction*, 1999, 5(9): 874-879.

**The manifestation of dominant white spotting mutation
in early mouse embryos cultivated in vitro**

Vikhlantseva E.F.¹, Sakharova N.Yu.¹, Kovalizkaya Yu.A.²,
Smirnov A.A.¹, Malashenko A.M.³

¹*Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS, Pushchino, Moscow region*

²*Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry (Pushchino Branch) of RAS,
Moscow region*

³*The Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow*

The development of early embryos of mice C57Bl/6(B6), bearing the mutations Kit^{w-y} or Kit^{w-v} was investigated. To find out the influence of ground genotype on phenotype expression of mutation, the development of mouse B6 (+/Kit^{w-y}) embryos was compared with that of mouse WR(+/Kit^{w-y}) embryos. It was shown that mutations Kit^{w-y} and Kit^{w-v} in genotype B6 significantly decreased the amount of egg cells capable of development. The negative influence of mutation Kit^{w-y} was more conspicuous. The amount of

developing egg cells in mice WR(+/*Kit^{w-y}*) was considerably higher than that in mice B6(+/*Kit^{w-y}*). The embryos, got from differently crossed mice B6(+/*Kit^{w-y}*) or B6(+/*Kit^{w-y}*), developed as well as the control ones at early cleavage stages. But there was the sharp drop in blastocyst quantity among the embryos, got from heterozygous mouse mating. The development of embryos, got from mating mice WR(+/*Kit^{w-y}*) between themselves, was as successful as in control. The mutation *Kit^{w-y}* in homozygous state seems to inhibit the blastocyst formation in B6 genotype embryos and doesn't break this process in WR genotype embryos.

Key words: mouse, mutation Kit^w, crossing, oviduct, embryos, development in vitro

Prob. Prod. Anim. Boil., 2007, 2:20-26