

## Використання таргетингу для вирішення проблем біології розвитку

О. В. Анопрієнко, О. В. Євсіков

Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

---

*В останні роки центр ваги ембріологічних досліджень змістився на вивчення ролі окремих генів в онтогенезі. Активне впровадження нових молекулярно-біологічних підходів, що дозволяють досліджувати функції генів та динаміку їхньої експресії в процесі розвитку організму, розпочалося з розробки технології культивування мишачих ES-клітин. В огляді розглянуто загальні принципи деяких сучасних методів — спрямованої модифікації генів за допомогою гомологічної рекомбінації, Cre—LoxP-системи сайт-спрямованої рекомбінації, стратегії «gene-trapping», оцінено їхні можливості та перспективи використання.*

---

Головним завданням біології розвитку як самостійної науки було і є вивчення реалізації механізму успадкування форми та «архетипу», тобто «плану будови» форми. Вочевидь, складність полягає в тому, що форма та «архетип» є результатом довготривалої послідовності подій, які починаються задовго до запліднення, і організм у мить свого зародження успадковує саме «план реалізації» цієї послідовності, а не «кінцевий продукт» [1]. Індивідуальний розвиток, який є, у першу чергу, просторово-часовим феноменом, реалізується в послідовній зміні наборів генів, які експресуються на кожному етапі, з чого випливає, що для нормального перебігу онтогенезу потрібна чітка просторово-часова координація цієї диференційованої експресії.

На геномному, тобто «фізичному», рівні вона забезпечується складною мережею взаємодій *цис*-регуляторних елементів генів з факторами транскрипції (експресія яких модулюється, в свою чергу, теж *цис*-регуляторами), а координована експресія цілих «батареї» генів (gene batteries) відбувається, скоріше за все, за рахунок того, що їхні *цис*-регуляторні послідовності мають гомологічні сайти-мішені для цих факторів [2]. І хоч цілком очевидно, що індивідуальний розвиток можна виразити в молекулярно-біологічних термінах, сама складність просторово-часової структури *цис*-регуляторної ме-

режі онтогенезу примушує дослідників концентрувати свої зусилля на небагатьох напрямках, що дають (у перспективі) шанс переходу біології розвитку на якісно новий рівень. «Молекулярно-біологічна революція» сучасності і, зокрема, накопичення та аналіз результатів з геномного секвенування різних організмів набагато випереджають наше розуміння функціонування як геномів у цілому, так і окремих їхніх компонентів. Так, біля 50 % генів дріжджів та унікальних EST (expressed sequence tags) послідовностей ссавців не мають гомологів з генами інших організмів та й аналіз гомології не завжди допомагає передбачити їхню біологічну функцію [3].

Можливо, з цієї причини центр ваги ембріологічних досліджень в останні роки перенесено на вивчення ролі окремих генів в онтогенезі. У зв'язку з цим розроблено декілька підходів, що дозволяють з'ясувати функції продуктів їхньої експресії. Один з них — продукція специфічних білків у клітинах, де за норми вони не експресуються. Але, якщо білок для здійснення своєї функції потребує ще одного або більше додаткових факторів, цей підхід стає недейовим. Інший метод полягає у вимиканні синтезу досліджуваного білка в продукуючих клітинах за допомогою антисенсових РНК. У цьому випадку не виключена слідова експресія, яка утруднює інтерпретацію фенотипового ефекту. Але в останні роки, з відкриттям явища РНК-інтерференції та малих інтерферуючих

РНК у ссавців, цей напрямок стає дуже перспективним. Розробку нових молекулярно-біологічних підходів, які дозволяють досліджувати функції генів та динаміку їхньої експресії *in vivo*, було розпочато з використання мишачих ES (embryonic stem) клітин. ES-клітини — недиференційовані плюрипотентні клітини, які одержують з внутрішньої клітинної маси (ВКМ) бластоцист [4—6]. Після введення в ембріон на стадії морули або бластоцисти вони беруть участь у формуванні як соматичних, так і статевих клітин [7, 8]. Такі підходи, як спрямована модифікація певних генів за допомогою гомологічної рекомбінації [9, 10], введення екзогенної ДНК [9, 11] та хромосомні маніпуляції за допомогою Cre-LoxP-системи [12, 13], дозволяють створити різні генетично модифіковані ES-клітинні лінії та відповідно лінії мишей для комплексного вивчення функції гена і регуляції його експресії.

Застосування гомологічної рекомбінації дозволяє ввести будь-яку необхідну мутацію в геном, а також коригувати мутації у нефункціональних генах [14]. Після трансфекції ДНК до ES-клітин та гомологічної рекомбінації цільовий ген стає мутантним. ES-клітини із змінним геном вводять до ембріона на стадії бластоцисти з наступною передачею химерних зародків самицям-реципієнтам. Якщо клітини з мутантним геном зробили свій внесок до популяції статевих клітин одержаної химери, то наступні схрещування дозволять одержати мишей, гомо- та гетерозиготних за змінним або вимкненим геном. Спочатку було висунуто припущення про те, що частота подій гомологічної рекомбінації в клітинах і, отже, успіх введення мутацій до гена за допомогою гомологічної рекомбінації залежать від транскрипційного стану цільового гена [15], але пізніше було показано, що і гени, експресії яких не спостерігається в ES-клітинах, успішно змінюються цим методом [16]. Для цілеспрямованої зміни гена в ES-клітинах використовують два типи векторів: інсерційні вектори та вектори заміщення [17]. Частіше використовують вектори останнього типу. Порівняно з випадковою інтеграцією гомологічна рекомбінація у клітинах еукаріотів — подія досить рідкісна і відбір таких рідкісних подій рекомбінації з великої множини випадкових інтеграцій має певні труднощі. Для вирішення проблеми виявлення клонів, у яких відбулася дійсна рекомбінація, розроблено стратегію позитивно-негативної селекції [18]. Векторна конструкція, яку для цього використовують, містить два гени: позитивний контроль — ген стійкості до неоміцину (*neo*), негативний — ген тимідинкінази (*tk*) вірусу простого герпесу (HSV-1),

відповідальний за чутливість клітин до аналога нуклеозидів ганцикловіру. Завдяки тому, що гомологічна рекомбінація відбувається між протяжними ділянками ДНК з великою гомологією, ген *neo*, фланкований геномними послідовностями, буде вбудовуватися до геному та давати можливість проводити селекцію клонів на середовищі з антибіотиком. Ген *tk*, як послідовність, негомологічна геномній, вбудовуватиметься лише при випадковій інтеграції і таким чином забезпечить клонам чутливість до ганцикловіру. Згодом на базі цього принципу було сконструйовано вектор, у якому ген *tk* знаходиться на обох кінцях введеного до клітин лінійного фрагмента ДНК (<http://www.biomednet.com/ldb/mklfld>). Такий підхід дозволяє зменшити кількість псевдопозитивних клонів, які можуть виникнути в результаті деградації кінців фрагмента та втрати одного гена *tk*.

Метод гомологічної рекомбінації дає можливість вносити відносно невеликі зміни в геном (делеції до 20 тис. п. н. [20]). При моделюванні у мишей хромосомних перебудов, асоційованих у людини з аномаліями розвитку, раковими та іншими захворюваннями, необхідно цілеспрямовано маніпулювати великими хромосомними фрагментами. Невелику кількість делецій на мишачій моделі створювали раніше в основному за допомогою іонізуючого випромінювання, але внесені зміни були випадковими. На сьогодні великі спрямовані перебудови викликають сайт-специфічною рекомбінацією [19—21].

Однією з найпростіших систем такої рекомбінації як у плані ензимології, так і розмірів сайту впізнавання є система лізогенного бактеріофага P1 [22]. Рекомбіназа Cre, білок розміром 38 кДа, каталізує рекомбінацію між специфічними LoxP-сайтами довжиною 34 п. н. Оскільки Cre спричинює рекомбінацію ланцюгів ДНК у строго визначеній орієнтації LoxP-сайтів, то перебудови, які здійснюються за допомогою цієї системи, цілком передбачувані. LoxP-сайти вводять до хромосоми за допомогою гомологічної рекомбінації. Для позитивної селекції клонів, які містять обидві LoxP-послідовності у визначеній орієнтації, до них вводять касети стійкості до різних антибіотиків (наприклад, пуроміцину та неоміцину). Ці маркери слугують також для визначення типу перебудови, що відбулася: делеції, інверсії або дуплікації. Маркерами для позитивної селекції клонів, у яких відбулася рекомбінація, є два комплементарних, але не функціональних фрагменти касети міні-гена гіпоксантинофосфорибозилтрансферази (*Hprt*) [23]. Фрагменти вводять у такий орієнтації до LoxP-сайтів, щоб у результаті рекомбінації відновлювалася фун-

кціональна активність ферменту. Рекombінація відбувається в ES-клітинах, дефектних за геном *Hprt*, що при культивуванні в селективних середовищах дає можливість добору необхідних клонів. Для події рекомбінатії вистачає тимчасової експресії Cre рекомбінрази, яку трансфікують до клітин у касеті для експресії. За допомогою цієї системи здійснюють як інтра-, так і інтерхромосомні перебудови [24].

Принципово можливо створити мишу з мутацією в будь-якому клонованому гені. Однак для генів, первинно виділених як кДНК клони, необхідно також одержати та охарактеризувати геномні клони, створити конструкцію з необхідною мутацією, відібрати ES-клони, в яких відбулася гомологічна рекомбінатія, створити химерну мишу, в якій клітини, що несуть мутацію, зробили внесок у популяцію статевих клітин, а для конструювання великих перебудов необхідно ще додаткові етапи. Незважаючи на те, що вже до 1995 року було цілеспрямовано вимкнено більше 700 генів [25], процедура залишається довготривалою та трудомісткою, тому для масштабного мутагенезу розробляли й інші підходи.

Доцільним для досягнення цієї мети є застосування стратегії «пастки для генів» («gene-trapping») [26–28]. В ES-клітині — трансфекцією або за допомогою ретровірусної трансдукції в складі ретровірусного вектора — вводять репортерний ген без промотору (зазвичай це *LacZ* ген *Escherichia coli*), який випадково вбудовують у геном, де він експресується в залежності від свого стану по відношенню до *cis*-регуляторних елементів місця інтеграції. Таким чином, гени-кандидати, які експресуються на визначеній стадії розвитку або у відповідь на якийсь сигнал, виявляються в більшості не за мутантним фенотипом, а за експресією репортера [29, 30].

Раніше було розроблено три типи векторів-пасток. Щоб відбулася експресія репортерного гена для «enhancer-trap» вектора потрібна інтеграція біля енансера. У векторі-пастці для промотора («promoter-trap») знаходиться послідовність лише репортера, отже, його експресія залежить від забудови в рамках зчитування з екзонними послідовностями в місці інтеграції. «Gene-trap» вектор на 5'-кінці репортерного гена містить акцепторний сайт сплайсингу. Внаслідок інтеграції в послідовність інтрона виникає злитий (fusion) транскрипт репортера з екзонною послідовністю, яка знаходиться перед сайтом інтеграції. Таким чином, користуючись цією стратегією, створюють великі бібліотеки ES-клонів, кожний з яких містить одиничний інтегрований вектор з репортерним геном. З клонів, у яких спостерігається досліджувана ек-

спресія репортерного гена, ендегенні послідовності можуть бути виділені за допомогою таких методів, як 5'-RACE (5'-rapid amplification of cDNA ends), інвертованої полімеразної ланцюгової реакції або клонуванням геномного фрагмента, що фланкує місце інтеграції. В подальшому було розроблено інші вектори, які розширювали можливості цього методу. Так, введення перед репортерним геном послідовності IRES (internal ribosomal entry site) з вірусом енцефаломіокардиту дозволяє обминути умову обов'язкової вбудови послідовності гена-репортера в рамку злитого продукту та збільшує ефективність «уловлювання» гена на 5% [31]. В цьому випадку відбуваються зчитування біцистронного транскрипта та відповідно незалежна трансляція репортера.

Для ефективного та швидкого секвенування місця інтеграції було розроблено спеціальний вектор [32]. Він являв собою човниковий вектор та містить ген стійкості до неоміцину, точку ініціації реплікації плазміді *pBR322*, ген стійкості до ампіциліну та унікальний сайт *EcoRI*. Геномну ДНК розщеплюють відповідною рестриктазою, лігують в умовах, що сприяють циркуляризації фрагментів, трансформують в *E. coli* та у «врятованій» таким чином плазміді секвенують геномний фрагмент.

Використання та розвиток техніки трансгенезу на початку 80-х років минулого століття почалося із введення до ембріональних клітин невеликих конструкцій на базі плазмідних векторів *pUC* або *pBR322*. При цьому адекватно охарактеризувати, наприклад, експресію генів людини, відповідальних за різні аномалії, у специфічному мишачому оточенні уявляється досить проблематичним. По-перше, в результаті випадкової інтеграції трансгена до геному рівень його експресії в одержаній трансгенній тварині варіює та залежить від факторів, які неможливо контролювати, таких як сайт інтеграції та копійність трансгена. По-друге, обмежений розмір трансгенних конструкцій на основі плазмідних векторів не дає можливості вводити та вивчати ген у комплексі з його регуляторними елементами, які можуть знаходитися на значних відстанях від кодувальної послідовності, а також генні комплекси.

Створення дріжджових штучних хромосом (YAC), здатних підтримувати фрагмент розміром до 1500 тис. п. н., посприяло вирішенню деяких з цих проблем. За допомогою техніки злиття дріжджових сферопластів YAC може бути введена до ES-клітин [33]. Цей підхід базується на вбудуванні в клітини конструкції з досить великим фрагментом геномної ДНК, яка, ймовірно, містить точку ініціації реплікації і упакована як еукаріотичний хроматин, але без сегрегаційної активності.

При цьому за відсутності селекції клітин спостерігається швидка втрата трансгена [33, 34]. Однак конструювання штучних хромосом ссавців (МАС) за аналогією з дріжджовими є проблематичним, оскільки за винятком теломерних ділянок [35, 36] інші елементи, які беруть участь в автономній реплікації і сегрегації хромосом, охарактеризовано недостатньо. При створенні МАС використовують підходи, що передбачають включення до вектора повторів, які присутні в хромосомах [37], застосування стратегії сегрегації вірусу Епштейна-Барр [38] та використання як вектора самої хромосоми або її досить великого фрагмента [39].

Вищезгадані підходи у наш час мають настільки широке розповсюдження в світі, а кількість охарактеризованих за їхньою допомогою генів така велика, що це дозволяє вже зараз зробити деякі нові висновки щодо функціонування та властивостей геномів ссавців. У кожному окремому випадку використання такої методики, незважаючи на її виняткову трудомісткість, є сповна обґрунтованим, однак при «погляді зверху» відкривається несподівана картина. Виявляється, що лише біля однієї чверті цих генів є життєво важливими для онтогенезу, тобто їхнє вимикання веде до загибелі ембріона на пре- та перинатальних стадіях розвитку. Спрямоване ж вимикання більш як двохсот генів, тобто біля 10 %, взагалі не має вираженого фенотипового ефекту. Оскільки таку вибірку (2000 з 20—30 тис. генів миші) можна вважати досить випадковою, то екстраполяція цих даних на геном в цілому уявляється цілком прийнятною. Виходячи з викладеного можна з високим ступенем визначеності зробити висновок стосовно того, що принцип надлишку геному діє також і на рівні генів, які експресуються. Це особливо важливо для сучасної ембріології та генетики розвитку, оскільки є ще одним підтвердженням того, що будь-який вузькоспрямований пошук (аналіз певного сигнального шляху або функція якого-небудь фактора росту) не може бути застосований при вивченні такої системи, як організм у процесі розвитку. Лише виокремлення визначених «фундаментальних цеглинок онтогенезу» [40] дозволить нам наблизитися до розуміння того, як функціонує ембріон.

*O. V. Anopriyenko, A. V. Evsikov*

The methods of targeted gene modifications in mammalian developmental studies, problems and prospects

#### Summary

*During past years, the main stream of developmental studies shifted towards the analysis of distinct genes role during embryogenesis. The development of mouse ES cell technology stimulated the use of modern molecular methods in these investigations. The review is*

*focused on the principles, potency and prospects of such procedures as targeted modification of specific genes by homologous recombination, chromosome manipulation by the Cre-LoxP system, and «gene trapping» strategy.*

*O. V. Anopriyenko, A. V. Evsikov*

Использование таргетинга для решения проблем биологии развития

#### Резюме

*В последние годы центр тяжести эмбриологических исследований сместился в сторону изучения роли отдельных генов в онтогенезе. Активное внедрение новых молекулярно-биологических подходов, позволяющих исследовать функции генов и динамику их экспрессии в процессе развития организма, началось с разработки технологии культивирования мышечных ES-клеток. В обзоре рассмотрены общие принципы некоторых современных методов — направленной модификации генов с помощью гомологической рекомбинации, Cre-LoxP-системы сайт-направленной рекомбинации, стратегии «gene-trapping», оценены их возможности и перспективы использования.*

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

1. Green P. B. Inheritance of pattern: Analysis from phenotype to gene // *Amer. Zool.*—1987.—27.—P. 657—673.
2. Arnone M. I., Davidson E. H. The hardwiring of development: organization and function of genomic regulatory systems // *Development.*—1997.—124.—P. 1851—1864.
3. Oliver S. G. From DNA sequence to biological function // *Nature.*—1996.—379.—P. 597—600.
4. Evans M. J., Kaufman M. H. Establishment in culture of pluripotent cells from mouse embryos // *Nature.*—1981.—292.—P. 154—156.
5. Martin G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1981.—78.—P. 7634—7638.
6. Brook F. A., Gardner R. L. The origin and efficient derivation of embryonic stem cells in the mouse // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 5709—5712.
7. Nagy A., Gocza E., Merentes D. E., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse // *Development.*—1990.—110.—P. 815—821.
8. Nagy A., Rossant J. Production of completely ES cell-derived fetuses // *Gene Targeting: A Principal Approach* / Ed. A. L. Joyner.—New York: Oxford Univ. press, 1993.—P. 147—179.
9. Smithies O., Gregg R. G., Boggs S. E., Korlewski M. A., Kucherlapati R. S. Insertion of DNA sequences into the human chromosomal beta-globin locus by homologous recombination // *Nature.*—1985.—317.—P. 230—233.
10. Thomas K. R., Capecchi M. R. Site directed mutagenesis by gene targeting in mouse embryo-derived stem cells // *Cell.*—1987.—51.—P. 503—512.
11. Strauss W. M., Dausman J., Beard C., Johnson C., Lawrence J. B., Jaenish R. Germ-line transmission of yeast artificial chromosome spanning the murine alpha 1 (I) collagen locus // *Science.*—1993.—259.—P. 1904—1907.
12. Ramirez-Solis R., Liu P., Bradley A. Chromosome engineering in mice // *Nature.*—1995.—378.—P. 720—724.
13. Smith A. J. H., De Sousa M. A., Kwabi-Addo B., Heppell-Partron A., Impley H., Rabbits P. A site-directed chromosomal translocation induced in embryonic stem cells by Cre-loxP recombination // *Nat. Genet.*—1995.—9.—P. 376—385.

14. Doetschman T., Maeda N., Smithies O. Targeted mutation of the *Hprt* gene in mouse embryonic stem cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1988.—85.—P. 8583—8587.
15. Mansour S. L., Thomas K. R., Capecchi M. R. Disruption of the proto-oncogene *int-2* in mouse embryo-derived stem cells: a general strategy for targeting mutations to non-selectable genes // Nature.—1988.—336.—P. 649—651.
16. Johnson R. S., Sheng M., Greenberg M. E., Kolodner R. D., Papaioannou V. E., Spiegelman B. M. Targeting of nonexpressed genes in embryonic stem cells via homologous recombination // Science.—1989.—245.—P. 1234—1236.
17. Hasty P., Rivera-Perez J., Chang C., Bradley A. Targeting frequency and integration pattern for insertion and replacement vectors in embryonic stem cells // Mol. Cell. Biol.—1991.—11.—P. 4509—4517.
18. Chauhan Sh. S., Gottesman M. M. Construction of a new universal vector for onserntional mutagenesis by homologous recombination // Gene.—1992.—120.—P. 281—286.
19. Zhang H., Hasty P., Bradley A. Targeting frequency for deletion vectors in embryonic stem cells // Mol. Cell. Biol.—1994.—14.—P. 2404—2410.
20. Sauer B. Manipulation of transgenes by site-specific recombination: use of Cre recombinase // Meth. Enzymol.—1993.—225.—P. 890—900.
21. Orban P. C., Chui D., Marth J. D. Tissue and site-specific DNA recombination in transgenic mice // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1992.—89.—P. 6861—6865.
22. Kuhn R., Schwenk F., Aguet M., Rajewsky K. Inducible gene targeting in mice // Science.—1995.—269.—P. 1427—1429.
23. Steinberg N., Hamilton D., Austin S., Yarmolinsky M., Hess R. Site-specific recombination and its role in the life cycle of bacteriophage P1 // Cold Spring Harbor Quant. Symp. Biol.—1981.—45.—P. 297—309.
24. Matzuk M. M., Finegold M. J., Su J. G. J., Hseuh A. J. W., Bradley A. Alpha-inhibin is a tumorsupressor gene with gonadal specificity in mice // Nature.—1992.—360.—P. 313—319.
25. Brandon E. P., Idzerda R. L., McKnight G. S. Targeting the mouse genome: a compendium of knockouts (part 1) // Curr. Biol.—1995.—5.—P. 625—634.
26. Gossler A., Joyner A. L., Rossant I., Skarnes W. C. Mouse embryonic stem cells and reporter constructs to detect developmentally regulated genes // Science.—1989.—244.—P. 463—465.
27. Friedrich G., Soriano P. Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice // Genes Develop.—1991.—5.—P. 1513—1523.
28. Forrester L. M., Nagy A., Sam M., Watt A., Stevenson L., Bernstein A., Joyner A. L., Wurst W. An induction gene trap screen in embryonic stem cells: identification of genes that respond to retinoic acid *in vitro* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1996.—93.—P. 1677—1682.
29. Gossler A., Zachgo J. Gene and enhancer trap screens in ES cell chimeras // Gene Targeting: A practical Approach / Ed. A. L. Joyner.—New York: Oxford Univ. press, 1993.—P. 181—227.
30. Joyner A. L. Gene targeting and gene trap screens using embryonic stem cells: New approaches to mammalian development // BioEssays.—1991.—13.—P. 649—656.
31. Xiong J.-W., Battaglini R., Leahy A., Stulnani H. Large-scale screening for developmental genes in embryonic stem cells and embryoid bodies using retroviral entrapment vectors // Develop. Dyn.—1998.—212.—P. 181—197.
32. Hicks G. G., Shi E.-G., Li X.-M., Li Ch.-H., Pawlak M., Ruley H. E. Functional genomics in mice by tagged sequence mutagenesis // Nat. Genet.—1997.—16.—P. 338—344.
33. Featherstone T., Huxley C. Extrachromosomal maintenance and amplification of yeast artificial chromosome DNA in mouse cells // Genomics.—1993.—17.—P. 267—278.
34. Wohlgemuth J. G., Kang S. H., Bulboaca G. H., Nawotka K. A., Cabs M. P. Long-term gene expression from autonomously replicating vectors in mammalian cells // Gene Ther.—1996.—3.—P. 503—512.
35. Brown W. R. A. Molecular cloning of human telomeres in yeast // Nature.—1989.—338.—P. 774—776.
36. Farr C. J., Fantes J., Goodfellow P., Cooke Th. Y. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1991.—88.—P. 7006—7010.
37. Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N. L., Cooke H., Masumoto H. Construction of YAC-based mammalian artificial chromosomes // Nat. Biotechnol.—1998.—16.—P. 431—439.
38. Kelleher Z. T., Eu H., Livanos E., Wendelburg B., Gulino S., Vos J.-M. Epstein-Barr-based episomal chromosomes shuttle 100 kb of self-replicating circular human DNA in mouse cells // Nat. Biotechnol.—1998.—16.—P. 762—768.
39. Tomizuka K., Yoshida H., Uejima H., Kugoh H., Sato K., Ohguma A., Hayasaka M., Hanaoka K., Oshimura M., Ishida I. Functional expression and germline transmission of a human chromosome fragment in chimaeric mice // Nat. Genet.—1997.—16.—P. 133—143.
40. Гилберт С. Ф., Олмütz Д. М., Рэфф Р. А. Новый синтез эволюционной биологии и биологии развития // Онтогенез.—1997.—28.—С. 325—343.

УДК 577.218

Надійшла до редакції 31.10.2000