

УДК 636.52/58:57.089.36

РАЗРАБОТКА МЕТОДИЧЕСКИХ ПОДХОДОВ ПО ВВЕДЕНИЮ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА В ЭМБРИОНАЛЬНЫЕ И СОМАТИЧЕСКИЕ КЛЕТКИ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ*А.Н. Ветох, Т.О. Котова, Л.А. Волкова, Е.К. Томгорова, Н.А. Волкова**ВИЖ имени академика Л.К. Эрнста», п. Дубровицы, Московская область, Россия*

Генетическая модификация сельскохозяйственных животных, в том числе птицы, является одним из приоритетных направлений современной биотехнологии и агротехнологий, направленных на решение широкого спектра фундаментальных и прикладных задач. Данный подход уже давно используется в качестве одного из приемов улучшения генотипа существующих пород для придания им устойчивости к различным возбудителям вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, повышения эффективности усвоения корма, получения рекомбинантных белков с яйцом. На сегодняшний день с использованием конститутивных и тканеспецифических промоторов получены генетически модифицированные птицы, экспрессирующие репортерные гены LacZ и GFP, бактериальный ген β -лактамазы, интерферон человека $\alpha 2b$ β -интерферон человека, гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, моноклональные антитела, антагонист рецептора β -интерлейкина и гормон роста человека (1–5). Однако применявшиеся технологии модификации генома для животных и птицы до 2012 года носили высоко неспецифичный характер, за исключением модельных научных систем. С 2012 года технология CRISPR/Cas9 последовательно вытесняет прочие технологии промышленного транскрипционного редактирования. Имеется ряд работ по успешному использованию данной технологии для модификации клеток млекопитающих с последующим получением особей с заданными свойствами. Так, используя систему CRISPR/Cas9, Park K.E. с соавт. выполнили редактирование гена NANOS2 в эмбрионах свиней (6). Было показано, что свиньи с диаллельным нокаутом NANOS2 характеризуются специфическим для самцов отсутствием генеративных клеток, в то время как другие аспекты тестикулярного развития у них в норме. Самцы с одноаллельным нокаутом и самки с нокаутом аллелей на обеих гомологичных хромосомах оказались плодовиты, что открывает возможности для ведения генетически-модифицированной линии и получения необходимого количества стерильных самцов-реципиентов посредством простого скрещивания гомозиготных по мутантному аллелю самок и гетерозиготных самцов. Однако особенности эмбрионального развития птиц не позволяют использовать для генноинженерных манипуляций, как классический метод микроинъекции, так и соматическое клонирование, что требует поиска альтернативных подходов.

Исходя из вышеизложенного, нами были оптимизированы методические подходы по редактированию эмбриональных клеток кур и перепелов посредством (а) генетической модификации эмбрионов *in vivo*; (б) генетической трансформации ПЗК в культуре *in vitro* с последующей их трансплантацией эмбрионам-реципиентам.

Для генетической модификации эмбрионов кур *in vivo* использовали лентивирусный вектор. Вирусные векторы, полученные на основе рекомбинантных лентивирусов, характеризуются, как правило, высокой эффективностью интеграции в геном клетки-хозяина, что делает использование данных векторных систем оптимальным для трансформации эмбриональных клеток. Вирусный препарат вводили непосредственно в зародышевый диск на 24 часу инкубации яиц. Ввиду введения вирусного препарата в многоклеточный эмбрион, полученные после генно-инженерных манипуляций особи являлись мозаиками. При этом важное значение имеет эффективность трансформации репродуктивных органов (яичники, семенники), т.к. модифицированные половые клетки в последующем могут быть использованы для получения потомства с внесенными признаками. В наших исследованиях результативная трансформация репродуктивных органов отмечалась у 61 % полученных особей.

Эффективность модификации половых клеток может быть повышена посредством целенаправленной трансфекции их предшественников – примордиальных зародышевых клеток. Данная технология предполагает выделение данного типа клеток из эмбрионов, их трансфекцию в культуре *in vitro* и последующую трансплантацию эмбрионам-реципиентам. После трансплантации донорские примордиальные зародышевые клетки в процессе развития эмбриона дифференцируются в мужские и женские половые клетки. В рамках оптимизации отдельных этапов данной технологии была

проведена серия экспериментов по выделению, генетической трансформации и трансплантации донорских ПЗК кур и перепелов. Оптимальные результаты были получены при обработке эмбрионов 0,05 % раствором трипсина в течение 5 минут: полученная суспензия состояла, преимущественно, из разобренных клеток, количество нежизнеспособных клеток не превышало 5 %. Полученная клеточная суспензия состояла из разных типов эмбриональных клеток. Для очистки примордиальных зародышевых клеток от других типов клеток проводили их разделение по адгезии. Трансформацию полученной культуры осуществляли с использованием различных методов: липофекции, электропорации и вирусной трансдукции. При использовании электропорации эффективность трансформации клеток-мишеней достигала 12 %. Результативность трансформации примордиальных зародышевых клеток липофильным агентом не превышала 1 %. Оптимизация по количеству ДНК и трансфекционного агента не способствовала повышению эффективности данного показателя. Трансформированные клетки были введены в дорсальную аорту 2,5 – дневных эмбрионов-реципиентов. Перед введением донорских ПЗК эмбрионы-реципиенты были обработаны бусульфаном с целью удаления собственных (эндогенных) ПЗК. Оптимальная концентрация данного препарата для элиминации эндогенных ПЗК составила 80 мкг/эмбрион. Наличие рекомбинантной ДНК в половых клетках реципиентов было установлено как у эмбрионов, так и полученных особей.

Исследования выполнены при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект № 18–29–07079

ЛИТЕРАТУРА

- Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., Petite J.N. Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase // *Dev. Dyn.* V. 2003. 226: 439–445.
- Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W. et al. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens // *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2011. 75(4): 646–649.
- Lillico S.G., Sherman M.J., McGrew C.D. et al. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens // *PNAS.* 2007. 104 (6): 1771–1776.
- Kwon S.C., Choi J.W., Jang H.J. et al. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white // *Biology of Reproduction.* 2010. 82:1057–1064.
- Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K. et al. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system // *J Biosci Bioeng.* 2012. 113 (2): 146–153.
- Park K. – E., Kaucher A.V., Powell A. et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. // *Scientific Reports,* 2017, 7:40176