УДК 636:59

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЭМБРИОНОВ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА (ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ)

КОРНИЕНКО Екатерина Валерьевна, *ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий*

РОМАНОВА Анастасия Борисовна, *ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий*

МАЛЕНКО Галина Петровна, *ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий*

В статье представлена обзорная информация о методах получения трансгенных эмбрионов крупного рогатого скота. На основании имеющихся данных можно сделать вывод, что все приведенные методы имеют ряд существенных ограничений, которые оказывают отрицательное воздействие на их эффективность. В результате этого вопрос разработки оптимального метода трансгеноза ооцитов и эмбрионов крупного рогатого скота остается открытым.

Трансгенные животные являются ключевым модельным объектом при изучении функции генов и причин различных заболеваний, разработке методов генной терапии и новых подходов к селекции в биомедицине и сельском хозяйстве [6, 9]. Одно из наиболее перспективных направлений в фармакологии – производство рекомбинантных белков в молочных железах животных, в первую очередь крупного рогатого скота [4, 11]. Выбор конкретного вида животных для производства рекомбинантного белка в молоке зависит от рыночного спроса, объема молока, вырабатываемого в течение цикла лактации, и скорости воспроизводства животных. Молочные коровы производят около 30 г белка на 1 л молока в течение ежегодной 305-дневной лактации [9]. Кроме того, производство рекомбинантных белков в молоке трансгенных коров позволяет получать больше продукции по сравнению с клеточными культурами при сравнительной дешевизне самого процесса, не требующего специальных условий, сред или линий клеток [9, 11]. На данный момент проводится разработка множества фармакологических препаратов, продуцируемых в молоке трансгенных животных, два из которых относительно недавно получили аккредитацию: антитромбин (Atryn®) и ингибитор С1-эстеразы (Ruconest®) [9].

Еще одним направлением генной модификации КРС является изменение качества молока за счет увеличения концентрации продуцируемого бета- и альфа-казеинов, включения лизоцима человека и снижения бета-лактоглобулина [6]. Наиболее распространенными на данный момент методами получения трансгенных животных являются микроинъекция чужеродной ДНК в мужской пронуклеус зиготы, микроинъекция комплексов ДНК-липосомы в цитоплазму зигот, вирус-опосредованная и спермий-опосредованная доставка экзогенной ДНК в ооциты и зиготы, соматическое клонирование с использованием в качестве донора генетического материала линий трансгенных клеток. Однако из-за видоспецифических особенностей строения ооцитов и ранних эмбрионов КРС, длительного периода времени, необходимого для оценки эффективности трансгеноза и получения рекомбинантного белка, полный потенциал метода получения трансгенных коров до сих пор полностью не реализован как при проведении научных исследований, так и в практике сельского хозяйства [6, 9, 11].

На данный момент наиболее распространенный метод получения трансгенных эмбрионов и трансгенного потомства у млекопитающих – микроинъекция экзогенной ДНК в мужской пронуклеус зиготы. Этот метод широко используется, например, для получения модельных объектов для изучения тканеспецифичной экспрессии генов и получения моделей заболеваний человека [13]. Однако его эффективность при работе с эмбрионами сельскохозяйственных животных существенно снижена [20] в связи с высоким содержанием липидных капель в цитоплазме ооцитов/зигот, сложностью определения оптимального времени микроинъекции, низким уровнем развития полученных в результате инъекции эмбрионов. При этом уровень выхода трансгенных эмбрионов не превышает 3 %. В большинстве из них наблюдается мозаичная экспрессия целевого гена и случайный характер встраивания вносимых генетических конструкций в геном эмбриона [9]. Доля полученных трансгенных телят также достаточно низка и не превышает 1–5 % при том, что даже для достижения подобных результатов требуется трансплантация большого количества микроинъецированных эмбрионов реципиентам. С учетом длительных периодов стельности и достижения продуктивного возраста потомства данный метод получения трансгенных коров остается малоприменимым в практике промышленного скотоводства [10].

Перспективным методом получения трансгенного крупного рогатого скота является доставка экзогенной ДНК в ооциты и зиготы с использованием в качестве вектора лентивирусов. При этом вирусные частицы либо вводят в перивителлиновое пространство ооцитов/зигот, либо добавляют в культуральную среду к лишенным блестящей оболочки ооцитам/зиготам, что существенно упрощает процедуру трансфекции. Основными лимитирующими факторами при использовании данного метода трансфекции остаются небольшая допустимая длина вносимой генетической конструкции и нерешенные вопросы возможной токсичности и угрозы биобезопасности, которые могут возникнуть при работе с вирусами [6, 8, 9].

Еще одним перспективным методом получения трансгенных эмбрионов крупного рогатого скота является соматическое клонирование (somatic cell nuclear transfer, SCNT) с использованием ядер предварительно трансфецированных соматических клеток. Основным преимуществом трансгеноза по методу SCNT является высокая доля получаемых трансгенных животных (90–100 %) [9]. Кроме того, при подготовке клеток-доноров ядер определяются локализация в геноме и количество копий целевого гена. Однако само клонирование сельскохозяйственных животных остается малоэффективным методом из-за низкой приживаемости полученных эмбрионов, большой доли самопроизвольных абортов и наличия аномалий развития у рожденного потомства [7]. Количество стельных коров после трансплантации клонированных эмбрионов не превышает 37 %, из которых только 9 % завершается рождением живого потомства [9]. Один из факторов, влияющих на приживаемость, – высокий апоптотический индекс клонированных эмбрионов и меньшее количество клеток во внутренней клеточной массе по сравнению с интактными эмбрионами. Данный недостаток может быть компенсирован за счет агрегации нескольких клонированных бластоцист, что позволяет получить большее количество живых клеток в эмбрионе и изменить соотношение количества клеток внутренней клеточной массы к клеткам трофоэктодермы с 1:1,5 до 1:4,8 [21]. Общая низкая эффективность метода SCNT в применении к крупному рогатому скоту, зависимость результатов от опыта оператора и необходимость использования сложного оборудования существенно снижают практическую применимость его вне научно-исследовательской лаборатории.

Более простым и практичным методом трансгеноза эмбрионов крупного рогатого скота представляется метод спермий-опосредованной доставки экзогенной ДНК в ооциты млекопитающих (spem-mediated gene transfer, SMGT), который основан на способности сперматозоидов многих видов животных связывать экзогенную ДНК [13]. В этом случае в качестве вектора для доставки генетических конструкций в ооциты используются непосредственно сперматозоиды соответствующего вида животных. При этом экзогенная ДНК включается в геном эмбриона либо в результате предварительной интеграции в геном сперматозоида до начала оплодотворения, либо в дальнейшем интегрируется в геном зиготы [13].

Применение метода SMGT в сочетании с искусственным осеменением и IVF позволило получить трансгенное потомство или трансгенные эмбрионы у мышей, свиней, коз, кур, кроликов [12, 13]. Однако в случае с КРС трансгенные эмбрионы или телята были получены только при сочетании SMGT с искусственным осеменением или интрацитоплазматической инъекцией обездвиженных трансфецированных сперматозоидов [9, 12, 13]. Последняя процедура в случае с КРС требует последующей искусственной активации ооцитов, что также может негативно сказываться на дальнейшем развитии полученных эмбрионов. На эффективность SMGT влияет множество факторов: источник сперматозоидов, структура и происхождение генетической конструкции, количество используемой ДНК, время инкубации, температура инкубационной среды и жизнеспособность сперматозоидов [13]. Кроме того, прямое связывание молекул ДНК с плазматической мембраной сперматозоида приводит к большей вероятности формирования внегеномных генетических структур, эписом [14].

Микроинъекция генетических конструкций в цитоплазму ранних эмбрионов млекопитающих часто используется для редактирования общей экспрессии генов эмбрионов. Однако при работе с ооцитами и ранними эмбрионами крупного рогатого скота инъекция кольцевых и линеаризованных плазмид в цитоплазму не давала положительных результатов [17]. Инъекция комплексов ДНК-липосомы (кольцевая плазмида, содержащая EGFP) в зиготы крупного рогатого скота позволила получить 40–50 % трансгенных бластоцист с различной степенью мозаицизма [17–19]. Применение данного метода существенно упрощает технологию и позволяет избежать множества технических сложностей, возникающих при проведении микроинъекции в пронуклеус, включая предварительное центрифугирование зигот. Использование липосом в свою очередь является простым, недорогим и высокопродуктивным способом трансфекции культивируемых клеток млекопитающих [15] и сперматозоидов [1]. Недостатком метода микроинъекции в цитоплазму, как и метода микроинъекции в пронуклеус, является некоторое повышение фрагментации геномной ДНК, которая, впрочем, не влияет на уровни дробления и формирования бластоцист, и высокая мозаичность экспрессии целевого гена в полученных эмбрионах [17–19]. Существует ряд способов преодоления мозаицизма: клонирование трансгенных бластомеров в возрасте 3 дней [3], дезинтеграция 3-дневных мозаичных эмбрионов с отбором трансгенных бластомеров и их последующей агрегацией [16], клонирование гамет [17]. Однако все эти методы достаточно трудоемки и технически сложны. Трансгенных телят, экспрессирующих целевой ген, при использовании метода микроинъекции ДНК в цитоплазму зигот КРС получено не было [17–19].

Таким образом, в настоящее время наиболее распространенные методы получения трансгенных эмбрионов и трансгенного потомства у млекопитающих (микроинъекция ДНК в пронуклеус, микроинъекция коплексов ДНК-липосомы в цитоплазму зигот, вирусопосредованная доставка ДНК, SCNT, SMGT) имеют ряд ограничений при работе с ооцитами и преимплантационными эмбрионами КРС. Кроме того, встраивание генетической конструкции после внесения в ооцит/зиготу при использовании большинства методов носит случайный характер. Возможным решением данной проблемы может стать применение методов целевой доставки ДНК в клетку с использованием искусственных нуклеаз с доменами «цинковых пальцев» (ZFNs), нуклеаз с доменами аналогов активаторов транскрипции (TALENs) или CRISPR-ассоциированных нуклеаз (CRISPR/Cas9) [9,11].

Наиболее стабильные результаты позволяет получить метод соматического клонирования с использованием в качестве доноров ядер линий трансгенных клеток. Однако низкая эффективность получения трансгенного потомства, как и в случае с другими вы-

шеперечисленными методами трансфекции ооцитов и зигот КРС, делает данный метод малоприменимым в практике сельского хозяйства. Разработка эффективных методов трансгеноза ооцитов и преимплантационных эмбрионов КРС остается перспективным направлением исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Bachiller D., Schellander K., Peli J., Ruthe U.* Liposome-Mediated DNA Uptake by Sperm // *Cells. Mol. Reprod. Dev.*, 1991, Vol. 30, P. 194–200.

2. *Bang J.I., Jin J.I., Ghanem N., Choi B.H., Fakruzzaman M., Ha A.N., Lee K.L., Uhm S.J., Ko D.H., Koo B.C. , Lee J.G., KongI. K.* Quality improvement of transgenic cloned bovine embryos using an aggregation method: Effects on cell number, cell ratio, embryo perimeter, mitochondrial distribution, and gene expression profile // Theriogenology, 2015, V. 84, P. 509–523.

3. *Bevacqua R.J., Pereyra-Bonnet F., Olivera R., Hiriart M.I., Sipowicz P., Fernandez-Mart n R., Radrizzani M., Salamone D.F.* Production of IVF transgeneexpressing bovine embryos using a novel strategy based on cell cycle inhibitors // *Theriogenology*, 2012, Vol. 78, P. 57–68.

4. *Bi Y., Liu X., Zhang L., Shao C., Ma Z., Hua Z., et a*l. Pseudo attP sites in favor of transgene integration and expression in cultured porcine cells identified by streptomyces phage phiC31 integrase // BMC Mol Biol., 2013, Vol. 14, P. 20.

5. *Bordingnon V., Keyston R., Lazaris A., Bilodeau AS., Pontes J.H.F., Arnold D., Fecteau G., Keefer C., Smith L.C.* Transgene expression of green fluorescent protein and germ line transmission in cloned calves derived from in vitro-transfected somatic cells // Biol Reprod, 2003, Vol. 68, P. 2013–2023.

6. *Fleming A., Abdalla E.A., Maltecca C., Baes C.F.* Invited review: Reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle // Arch. Anim. Breed., 2018, Vol. 61, P. 43–57.

7. *Keefer C. L.* Artificial cloning of domestic animals // P. Natl. Acad.Sci. USA, 2015, Vol.112, P. 8874–8878.

8. *Monzani P.S., Guemra S., Adona P.R., Ohashi O.M.* Working with Lentivirus for Generation of Transgenic Bovine Embryos. Pharm Anal Acta 5, 2014, P. 169.

9. *Monzani P.S., Adona P.R., Ohashi O.M., Meirelles F.V., Wheeler M.B.* Transgenic bovine as bioreactors: Challenges and perspectives // BIOENGINEERED, 2016, Vol. 7, No. 3, P. 123–131.

10. *Niemann H., Kind A., Schienieke A.* Productionofbiopharmaceuticals in transgenic animals. // Kayser O,Warzecha H (eds), Pharmaceutical Biotechnology– Drug discovery and Clinical Applications, 2nd edn.Wiley-Blackwell, Weinheim, Germany, 2012, 71–111 pp.

11. *Sekhavati M.H., Hosseini S.M., Tahmoorespur M., Ghaedi K., Jafarpour F., Hajian M., Dormiani K., Nasr-Esfahani M.H.* PhiC31-based site-specific transgenesis system for production of transgenic bovine embryos by somatic cell nuclear transfer and intracytoplasmic sperm injection // Cell J., 2018, Vol. 20, No. 1, P. 98–107.

12. *Shemesh M., Gurevich M., Harel-Markowitz E., Benvenisti L., Shore L.S., Stram Y.* Gene Integration Into Bovine Sperm Genome and Its Expression in Transgenic Offspring // Mol. Reprod. Dev., 2000, Vol. 56, P. 306–308.

13. *Smith K. R.* Sperm-Mediated Gene Transfer: Concepts and Controversies. – Bentham Science Publishers, 2012.

14. *Spadafora C.* Sperm-mediated 'reverse' gene transfer: a role of reverse transcriptase in the generation of new genetic information // Human Reproduction, 2008, P. 735–740.

15. *Suzuki R., Takizawa T., Negishi Y., Utoguchi N., Maruyama K.* Effective gene delivery with novel liposomal bubbles and ultrasonic destruction technology // International Journal of Pharmaceutics, 2008, Vol. 354, P. 49–55.

16. *Vajta G., Peura T.T., Holm P., P ldi A., Greve T., Trounson A.O., Callesen H.* New method for culture of zona-included or zona-free embryos: the Well of the Well (WOW) system // Mol. Reprod. Dev., 2000, Vol. 55, P. 256–264.

17. *Vichera G., Moro L., Salamone D.* Efficient Transgene Expression in IVF and Parthenogenetic Bovine Embryos by Intracytoplasmic Injection of DNA–Liposome Complexes // Reprod. Dom. Anim., 2011, Vol. 46, No. 2, P. 214–220.

18. *Vichera G., Moro L.N., Buemo C., Salamone D.* DNA fragmentation, transgene expression and embryo development after intracytoplasmic injection of DNA–liposome complexes in IVF bovine zygotes // Zygote , 2012, Vol. 22, No. 02, P. 195–203.

19. *Vichera G., Olivera R., Salamone D.* Oocyte genome cloning used in biparental bovine embryo reconstruction // Zygote, 2013, Vol. 21, No. 01, P. 21–29.

20. *Wall R.J.* Pronuclear microinjection. // Cloning Stem Cells, 2001, Vol. 3, P. 209–220.

21. *Wang Y.S., Tang S., An Z.X., Li W.Z., Liu J., Quan F.S., et al.* Effect of mSOF and G1.1/G2.2 media on the developmental competence of SCNTderived bovine embryos // Reprod Domest Anim, 2011, Vol. 46, P. 404–409.

Корниенко Екатерина Валерьевна, *научный сотрудник отдела экспериментальной эмбриологии, ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.*

Романова Анастасия Борисовна, *младший научный сотрудник отдела экспериментальной эмбриологии, ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.*

Маленко Галина Петровна, *д-р биол. наук, зав. отделом экспериментальной эмбриологии, ФГБНУ Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий. Россия.*

127422, г. Москва, ул. Костякова, д. 12, стр. 4.
Тел.: 89099017805.

Ключевые слова: *трансгеноз; крупный рогатый скот; эмбрион; ооцит.*

METHODS OF OBTAINING TRANSGENIC BOVINE EMBRYOS (REVIEW)

Kornienko Ekaterina Valerievna, *Researcher, Department of experimental embryology, Centre of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology. Russia.*

Romanova Anastasia Borisovna, *Junior Researcher, Department of experimental embryology, Centre of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology. Russia.*

Malenko Galina Petrovna, *Doctor of Biological Sciences, head of the Department of experimental embryology, Centre of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnology. Russia.*

Keywords: *transgene; bovine; embryo; oocyte.*

In the current work we present a review of scientific literature concerning methods of obtaining trangenic bovine embryo. Based on the current data a conclusion can be made that all listed methods of transgenesis have certain limits in application to bovine oocytes and embryos that significantly reduce their effectiveness. The question of optimal method development is still open.