



ВЕТЕРИНАРИЯ VETERINARY SCIENCE

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-2-162-169

Научная статья

Эффективность использования лентивирусных векторов для трансформации сперматогенных клеток семенника петухов *in vivo*

Н.А. Волкова, А.Н. Ветох*, Л.А. Волкова,
Н.А. Зиновьева

Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. академика Л.К. Эрнста,
Московская область, Российская Федерация
*anastezuya@mail.ru

Аннотация. Клетки гонад самцов рассматриваются в качестве перспективных клеток-мишеней для введения рекомбинантной ДНК в рамках получения генетически модифицированных особей с заданными признаками. Использование стволовых клеток семенников, а именно клеток сперматогоний, представляет наибольший интерес. Данный тип клеток в ходе дифференциации может давать начало многочисленной популяции зрелых половых клеток у самцов, которые в случае их генетической трансформации могут быть использованы для осеменения самок с целью получения потомства трансгенов. Цель исследования — изучить эффективность применения лентивирусных векторов для локальной трансформации клеток сперматогенного ряда в семенниках петухов. Использовали лентивирусный вектор, содержащий репортерный ген ZsGreen под контролем CMV промотора. Трансформацию сперматогенных клеток петуха *in vitro* осуществляли путем инфицирования вирусным препаратом, *in vivo* — посредством множественной инъекции вирусного препарата в паренхиму семенников петухов ($n = 5$). Эффективность трансформации оценивали по экспрессии репортерного гена ZsGreen в трансфицированных сперматогенных клетках. Успешность использования лентивирусных векторов для генетической трансформации сперматогенных клеток семенника петуха была показана в ходе экспериментов как *in vitro*, так и *in vivo*. Эффективность трансформации данного типа клеток в культуре *in vitro* варьировала от 45 до 57% и составила в среднем $48 \pm 4\%$. В экспериментах *in vivo* экспрессия гена-репортера ZsGreen в клетках сперматогенного эпителия семенников была обнаружена практически у всех экспериментальных петухов. Количество семенных канальцев с трансформированными клетками сперматогенного ряда варьировало у петухов, исследованных в ходе опыта, от 10 до 22% и составила в среднем $16 \pm 2\%$. При этом эффективность генетической

© Волкова Н.А., Ветох А.Н., Волков Л.А., Зиновьева Н.А., 2019.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License
<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

трансформации сперматогенных клеток семенников (эффективность трансгенеза) достигала $1,8 \pm 0,2\%$. Полученные результаты подтверждают успешность применения лентивирусных векторов с целью создания особей с генетически измененными половыми клетками методом трансформации сперматогенных клеток семенников петухов *in vivo*, а также возможность получения потомков с заданными свойствами от этих мужских особей.

Ключевые слова: петухи, сперматогенные клетки семенников, генетическая трансформация, лентивирусный вектор, трансгенез

Введение

Применение половых клеток самцов рассматривается как один из способов получения сельскохозяйственных животных с измененным геномом, в т.ч. птицы [1, 2]. При этом в качестве клеток-мишеней для введения рекомбинантной ДНК могут использоваться как зрелые мужские половые клетки — спермии, так и их предшественники на более ранних сроках дифференцировки — сперматогонии, сперматоциты и сперматиды [3—5]. С точки зрения эффективности трансгенеза из всей популяции клеток сперматогенного эпителия главный интерес представляет генетическая модификация сперматогонии. Данный тип клеток относят к стволовым клеткам семенников [6]. В процессе дифференцировки они дают начало значительной популяции зрелых мужских половых клеток [7]. Исходя из этого генетическая трансформация половых клеток самцов на стадии сперматогоний позволяет повысить эффективность трансгенеза по сравнению с проведением генно-инженерных манипуляций с другими типами сперматогенных клеток, в т.ч. спермиями.

Генетическая трансформация сперматогоний возможна с использованием двух методических подходов: 1) трансфекцией культуры данных клеток *in vitro* с дальнейшим их введением в семенники самцов-реципиентов, подвергшихся химической стерилизации, и 2) трансформацией клеток сперматогенного ряда *in vivo* путем инъекционной обработки генной конструкцией непосредственно в семенники взрослых особей [8—11]. С точки зрения материальных и временных затрат наиболее предпочтительным является второй подход, так как манипуляции проводятся на взрослых самцах, что сокращает сроки получения трансгенных особей. Генетическая трансформация сперматогенных клеток, в том числе сперматогоний, *in vivo* возможна с использованием векторов, основанных на ретро- и лентивирусах. Метод базируется на их природной способности переносить рекомбинантную ДНК в соматические клетки. Таким образом, применение генных конструкций, которые получены на основе этих вирусов, позволяет осуществлять трансформацию отдельных органов и тканей уже во взрослых особях. Ранее нами была показана возможность использования ретровирусных векторов для локальной трансформации клеток семенников петухов и хряков [12]. Мы изучили эффективность использования лентивирусных векторов для генетической трансформации сперматогоний петухов *in vivo*.

Материалы и методы

В работе использовали лентивирусный вектор, содержащий репортерный ген *ZsGreen* под контролем *CMV* промотора. Источником генной конструкции был выбран вирусный препарат.

Трансформацию культуры клеток сперматогоний петуха *in vitro* выполняли с помощью инфицирования препаратом, содержащим рекомбинантный лентивирус. Эффективность заражения клеток определяли как отношение количества полученных генетически трансформированных клеток к общему числу клеток, подвергшихся инфицированию.

Внесение генных конструкций в паренхиму семенников петухов ($n = 5$) *in vivo* проводили путем множественных инъекций вирусного препарата (5—8 инъекций на семенник).

По достижении половозрелости от опытных самцов отбирали пробы тканей семенников для анализа экспрессии рекомбинантного белка с использованием флуоресцентной микроскопии. Гистологические срезы толщиной 5 мкм готовили на криостате. От каждого самца проанализировали не менее 15 гистологических срезов.

Результаты и обсуждение

Для оценки возможности использования генных конструкций на основе лентивирусного вектора вначале был проведен ряд исследований по трансформации клеток сперматогоний петухов *in vitro* в культуре. Использование лентивирусного препарата в проведенных экспериментах показало эффективность трансформации клеток-мишеней у петухов, а количество модифицированных клеток варьировало от 45 до 57% и составляло в среднем $48 \pm 4\%$.

Результаты, полученные в ходе *in vitro* исследований, послужили заделом для проведения дальнейших опытов по переносу рекомбинантной ДНК *in vivo* в сперматогенные клетки петухов.

Ранее в наших исследованиях было изучено, что оптимальным периодом для проведения биоинженерных манипуляций с клетками сперматогенного эпителия у петухов является возраст от 1 до 8 недель [13]. В этот возрастной период популяция сперматогенных клеток в семенных канальцах преимущественно представлена сперматогониями и клетками Сертоли. Используя эту наработку, введение генной конструкции проводили в семенники петухов, подобранных по возрасту, который составил 2 месяца.

По достижении половозрелости у опытных петухов была изучена экспрессия репортерного гена ZsGreen в клетках сперматогенного эпителия. Наличие трансформированных флуоресцирующих сперматогенных клеток в семенных канальцах семенников было установлено у всех опытных петухов. Количество семенных канальцев на одном срезе, в которых наблюдались трансформированные клетки, варьировало от 10 до 22% в зависимости от индивидуальных особенностей самцов, что составило в среднем $16 \pm 2\%$ (табл. 1). При этом в одном семенном канальце среднее число трансформированных клеток сперматогенного ряда составило $12 \pm 1\%$ при общей эффективности трансгенеза (отношение числа трансформированных сперматогенных клеток к их общему числу во всех исследованных семенных канальцах) $1,8 \pm 0,2\%$.

Таблица 1

**Эффективность использования лентивирусного вектора
для генетической трансформации клеток семенников петухов *in vivo***

Показатель	Инд. номер опытной птицы				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Исследовано срезов <i>n</i>	15	20	15	18	15
<i>Эффективность трансформации семенных канальцев</i>					
Количество срезов с трансформированными семенными канальцами <i>n</i> , %	10 (65)	15 (75)	11 (72)	9 (50)	7 (44)
Доля трансформированных канальцев на срезе, %	10	15	22	17	16
<i>Эффективность трансформации сперматогенных клеток</i>					
Среднее количество сперматогенных клеток в одном семенном канальце: всего <i>n</i> трансформированных* <i>n</i>	702 12	685 14	625 16	652 10	692 8
Число семенных канальцев на исследованных срезах <i>n</i>	221	210	185	196	204
Общее количество сперматогенных клеток: в трансформированных канальцах <i>n</i> во всех исследованных канальцах <i>n</i>	2 652 155 142	2 940 143 850	2 960 115 625	1 960 127 792	1 632 141 168
Общая эффективность трансгенеза**, %	1,7	2,0	2,6	1,5	1,2

Примечание: * среднее число трансформированных клеток в одном семенном канальце — отношение числа трансформированных сперматогенных клеток к общему числу исследованных семенных канальцев;

** общая эффективность трансгенеза — отношение числа трансформированных сперматогенных клеток к их общему числу во всех исследованных канальцах.

Table 1

**Efficiency of using a lentiviral vector for genetic transformation
of rooster testicular cells *in vivo***

Indicator	Experimental bird number				
	№ 1	№ 2	№ 3	№ 4	№ 5
Investigated slices, <i>n</i>	15	20	15	18	15
<i>The effectiveness of the transformation of the seminiferous tubules</i>					
The number of slices with transformed seminiferous tubules <i>n</i> , %	10 (65)	15 (75)	11 (72)	9 (50)	7(44)
The proportion of transformed tubules at the slice, %	10	15	22	17	16
<i>The efficiency of transformation of spermatogenic cells</i>					
The average number of spermatogenic cells in one seminiferous tubule: total <i>n</i> transformed* <i>n</i>	702 12	685 14	625 16	652 10	692 8
The number of seminiferous tubules in the studied slices <i>n</i>	221	210	185	196	204
The total number of spermatogenic cells: in transformed tubules <i>n</i> in all studied tubules <i>n</i>	2 652 155 142	2 940 143 850	2 960 115 625	1 960 127 792	1 632 141 168
The overall efficiency of transgenesis**, %	1.7	2.0	2.6	1.5	1.2

Note: *The average number of transformed cells in one seminiferous tubule is the ratio of the number of transformed spermatogenic cells to the total number of testicular tubules examined;

**The total efficiency of transgenesis is the ratio of the number of transformed spermatogenic cells to their total number in all studied tubules.

Таким образом, проведенные нами исследования показали возможность использования лентивирусных векторов для трансформации генома петухов в сперматогенных клетках семенников *in vivo* с целью создания особей с генетически трансформированными половыми клетками для дальнейшего получения трансгенного потомства с заданными признаками.

Информация о финансировании

Исследование проведено в рамках выполнения государственного задания, регистрационный номер темы АААА-А18-118021590132-9.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Brinster R.L. Germline stem cell transplantation and transgenesis // *Science*. 2002. Vol. 296. № 5576. P. 2174—2176. doi: 10.1126/science.1071607.
2. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects // *Reproduction*. 2014. Vol. 147. № 3. P. R65—R74. doi: 10.1530/REP-13-0466.
3. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation // *Bioassays*. 1998. Vol. 20. № 11. P. 302—324. doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199811)20:11<955::AID-BIES11>3.0.CO;2-8.
4. McLean D.J. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function // *Cell Tissue Research*. 2005. Vol. 322. № 1. P. 21—31. doi: 10.1007/s00441-005-0009-z.
5. Brinster R.L., Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture // *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1998. Vol. 9. № 4. P. 401—409. doi: 10.1006/scdb.1998.0205.
6. De Rooij D.E., Griswold M.D. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000 // *Journal of andrology*. 2012. Vol. 33. № 6. P. 1085—1095. doi: 10.2164/jandrol.112.016832.
7. Жункейра Л.К., Карнейро Ж. Гистология: атлас, учебное пособие / под ред. В.Л. Быкова. М.: ГЭОТАР Медиа, 2009.
8. Yu F., Ding L.J., Sun G.B., Sun P.X., He X.H., Ni L.G., Li B.C. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells // *Molecular Reproduction and Development*. 2010. Vol. 77. № 4. P. 340—347. doi: 10.1002/mrd.21147.
9. Oatley J.M. Spermatogonial stem cell biology in the bull: development of isolation, culture, and transplantation methodologies and their potential impacts on cattle production // *Society of Reproduction and Fertility supplement*. 2010. Vol. 67. № 7. P. 133—143.
10. Савченкова И.П., Коржилова С.В., Костерева Н.В., Эрнст Л.К. Культивирование и трансплантация сперматогоний типа А хряков // *Онтогенез*. 2006. Т. 37. № 4. С. 292—300.
11. Новгородова И.П., Мормышев А.Н., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Генетическая трансформация сперматогониев кроликов *in vivo* // *Биотехнология*. 2008. № 1. С. 24—28.
12. Волкова Н.А., Зиновьева Н.А., Волкова Л.А., Лоцманова Н.С., Эрнст Л.К. Изучение факторов, влияющих на эффективность переноса генов в половые клетки самцов сельскохозяйственных животных // *Сельскохозяйственная биология*. 2010. Т. 45. № 6. С. 16—19.
13. Белоглазова Е.В., Котова Т.О., Волкова Н.А., Волкова Л.А., Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. Возрастная динамика сперматогенеза у петухов в связи с оптимизацией сроков биотехнологических манипуляций // *Сельскохозяйственная биология*. 2011. Т. 46. № 6. С. 60—64.

История статьи:

Поступила в редакцию: 12 марта 2019 г.

Принята к публикации: 15 апреля 2019 г.

Об авторах:

Волкова Наталья Александровна — доктор биологических наук, профессор РАН, руководитель лаборатории клеточной инженерии, ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К. Эрнста», Российская Федерация, 142132, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60; *e-mail*: natavolkova@inbox.ru

Ветох Анастасия Николаевна — научный сотрудник лаборатории функциональной и эволюционной геномики животных, ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К. Эрнста» Российская Федерация, 142132, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60; *e-mail*: anastezuya@mail.ru

Волкова Людмила Александровна — кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории клеточной инженерии, ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К. Эрнста», Российская Федерация, 142132, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60; *e-mail*: ludavolkova@inbox.ru

Зиновьева Наталия Анатольевна — доктор биологических наук, академик РАН, директор, ФГБНУ ФНЦ «Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л.К. Эрнста»; Российская Федерация, 142132, Московская область, г.о. Подольск, пос. Дубровицы, д. 60; *e-mail*: n_zinovieva@mail.ru

Для цитирования:

Волкова Н.А., Ветох А.Н., Волков Л.А., Зиновьева Н.А. Эффективность использования лентивирусных векторов для трансформации сперматогенных клеток семенника петухов *in vivo* // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Агрономия и животноводство. 2019. Т. 14. № 2. С. 162—169. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-2-162-169.

DOI: 10.22363/2312-797X-2019-14-2-162-169

Research article

The efficiency of use lentiviral vectors for the transformation of rooster spermatogenic cells *in vivo*

**Natalia A. Volkova, Anastasiya N. Vetokh,
Lyudmila A. Volkova, Natalia A. Zinovieva**

Federal Science Center for Animal Husbandry
named after Academy Member L.K. Ernst, Moscow region, Russian Federation

**Corresponding author: anastezuya@mail.ru*

Abstract. Male gonad cells are considered as promising target cells for the introduction of recombinant DNA within obtaining genetically modified individuals with given characteristics. The use of testicular spermatogonial stem cells is of the greatest interest. In the process of differentiation, this type of cell gives rise to a significant population of mature male germ cells. In the case of their genetic transformation, differentiated cells can be used to inseminate females in order to produce transgenic progeny. The aim of the research was to study the efficiency of using lentiviral vectors for the local transformation of roosters' testicular spermatogenic cells. We used a lentiviral vector containing the ZsGreen reporter gene under the control of the CMV promoter. *In vitro* transformation of rooster spermatogenic cells was carried out by infection with a viral preparation, *in vivo* through multiple injections of the viral preparation into the testicular parenchyma of roosters ($n = 5$). The efficiency of transformation was assessed by expression

of the reporter ZsGreen gene in transfected spermatogenic cells. The success of using lentiviral vectors for the genetic transformation of rooster spermatogenic cells was shown in experiments *in vitro* and *in vivo*. The transformation efficiency of this cells types in an *in vitro* culture varied from 45 to 57% and averaged $48 \pm 4\%$. The expression of the ZsGreen reporter gene in the cells of the spermatogenic epithelium of the testes was established in almost all experimental roosters in the *in vivo* experiments. The number of seminiferous tubules with transformed spermatogenic cells varied in the studied experimental roosters from 10 to 22%. The effectiveness of genetic transformation of the testes spermatogenic cells was $1.8 \pm 0.2\%$. The obtained results indicate to the success of using lentiviral vectors for the genetic transformation of spermatogenic cells of rooster testes *in vivo* in order to create individuals with genetically transformed germ cells for the further production of transgenic offspring with given characteristics.

Key words: roosters, testicular spermatogenic cells, genetic transformation, lentiviral vector, transgenesis

Funding and Acknowledgement of Sources. The study was conducted in the framework of the state task, the registration number of the topic is AAAA-A18-118021590132-9.

REFERENCES

1. Brinster RL. Germline stem cell transplantation and transgenesis. *Science*. 2002; 296(5576): 2174—2176. Available from: doi: 10.1126/science.1071607.
2. Zheng Y, Zhang Y, Qu R, He Y, Tian X, Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: Progress and prospects. *Reproduction*. 2014; 147(3):R65—R74. Available from: doi: 10.1530/REP-13-0466.
3. Spadafora C. Sperm cells and foreign DNA: a controversial relation. *Bioassays*. 1998; 20(11):955—964. Available from: doi: 10.1002/(SICI)1521-1878(199811)20:11<955::AID-BIES11>3.0.CO;2-8.
3. McLean DJ. Spermatogonial stem cell transplantation and testicular function. *Cell Tissue Research*. 2005; 322(1):21—31. Available from: doi: 10.1007/s00441-005-0009-z.
4. Brinster RL, Nagano M. Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 1998; 9(4):401—409. Available from: doi: 10.1006/scdb.1998.0205.
5. De Rooij DE, Griswold MD. Questions about spermatogonia posed and answered since 2000. *Journal of andrology*. 2012; 33(6):1085—1095. Available from: doi: 10.2164/jandrol.112.016832.
6. Bykova VL, Zhunkeira LK, Karneiro Zh. (eds). *Histology: atlas, study guide*. Moscow: GEOTAR Media Publ.; 2009. (In Russ).
7. Yu F, Ding LJ, Sun GB, Sun PX, He XH, Ni LG, Li BC. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Molecular Reproduction and Development: Incorporating Gamete Research*. 2010; 77(4):340—347. Available from: doi: 10.1002/mrd.21147.
8. Oatley JM. Spermatogonial stem cell biology in the bull: development of isolation, culture, and transplantation methodologies and their potential impacts on cattle production. *Reprod. Domest. Rumin.* 2010; 67(7):133—143.
9. Savchenkova IP, Korzhikova SV, Kostereva NV, Ernst LK. Cultivation and transplantation of boar type A spermatogonia. *Ontogenesis*. 2006; 37(4):292—300. (In Russ).
10. Novgorodova IP, Mormyshev AN, Volkova NA, Zinovieva NA, Ernst LK. Genetic transformation of rabbit spermatogonium *in vivo*. *Biotechnology*. 2008; (1):24—28. (In Russ).
11. Volkova N.A., Zinovieva N.A., Volkova L.A., Lotsmanova N.S., Ernst L.K. Study of factors affected the efficiency of gene transfer into the male germ cells of agricultural animals. *Agricultural Biology*. 2010; 45(6):16—19. (In Russ).
12. Beloglazova EV, Kotova TO, Volkova NA, Volkova LA, Zinovieva NA, Ernst LK. Age dynamics of spermatogenesis in cocks in connection with optimization of bioengineering manipulation time. *Agricultural Biology*. 2011; 46(6):60—64. (In Russ).

Article history:

Received: 12 March 2019

Accepted: 15 April 2019

About authors:

Volkova Natalya Alexandrovna — Doctor of Sciences in Biology, Professor of the Russian Academy of Sciences, Head of the Laboratory of Cell Engineering, Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst; 60, Dubrovitsy village, Podolsk district, Moscow Region, 142132, Russian Federation; e-mail: natavolkova@inbox.ru

Vetokh Anastasia Nikolaevna — Researcher of the Laboratory of Functional and Evolutionary Genomics of Animals, Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst, 60, Dubrovitsy village, Podolsk district, Moscow Region, 142132, Russian Federation; e-mail: anastezuya@mail.ru

Volkova Lyudmila Aleksandrovna — Candidate of Sciences in Biology, Senior Researcher of the Laboratory of Cell Engineering, Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst; e-mail: ludavolkova@inbox.ru

Nataliya Anatolievna Zinovyeva — Doctor of Sciences in Biology, Academician of the Russian Academy of Sciences, Federal Science Center for Animal Husbandry named after Academy Member L.K. Ernst; 60, Dubrovitsy village, Podolsk district, Moscow Region, 142132, Russian Federation; e-mail: n_zinovieva@mail.ru

For citation:

Volkova NA, Vetokh AN, Volkova LA, Zinovieva NA. The efficiency of use lentiviral vectors for the transformation of rooster spermatogenic cells in vivo. *RUDN Journal of Agronomy and Animal Industries*. 2019; 14(2):162—169. doi: 10.22363/2312-797X-2019-14-2-162-169.