

## ПРИМЕНЕНИЕ ЛЕНТИВИРУСОВ ДЛЯ ТКАНЕСПЕЦИФИЧНЫХ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАНИПУЛЯЦИЙ

© А. Б. Малашичева,<sup>1,2</sup> Б. Канцлер,<sup>2</sup> Е. Н. Толкунова,<sup>1,2</sup> Д. Трно,<sup>3</sup> А. Н. Томили<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,

<sup>2</sup> Институт иммунологии сообщества Макса Планка, Фрайбург, Германия, и

<sup>3</sup> Федеральная политехническая школа Лозанны, Швейцария;

<sup>1</sup> электронный адрес: antom@mail.cytspb.rssi.ru

Трофэктодерма (ТЭ) бластоцисты является первой эпителиальной тканью, возникающей при развитии млекопитающих, и выполняет сигнальную и питательную функции в период доимплантационного развития млекопитающих. Кроме того, ТЭ обеспечивает имплантацию эмбриона в стенку матки и дает начало экстраэмбриональным тканям, необходимым для закладки осей и роста эмбриона после имплантации. В данной работе мы показали, что ТЭ мыши хотя сама по себе и является перmissive для лентивирусной инфекции, представляет собой не проницаемый для вирусных частиц физический барьер, предохраняющий клетки внутренней клеточной массы (ВКМ) от заражения. Данное свойство лентивирусов может быть использовано для тканеспецифичной генетической модификации и иметь важное применение в функциональной генетике мыши.

**Ключевые слова:** лентивирусный вектор, трофэктодерма, плацента, бластоциста, трансгенез.

Принятые сокращения: ВКМ — внутренняя клеточная масса, дпо — дней после оплодотворения, ПЦР — полимеразная цепная реакция, ПЭК — первичная эктодерма, ПЭн — первичная эндодерма, пТЭ — полярная трофэктодерма, псТЭ — пристеночная трофэктодерма, ТЭ — трофэктодерма, GFP — green fluorescent protein, hCG — human chorionic gonadotropin, Hprt — hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase, PMS — pregnant mare serum.

Эпителий и эндотелий многоклеточного организма играют важную роль в компартиментализации тела, транспорте жидкости и защите от повреждающих факторов окружающей среды и патогенных организмов. Во многих случаях потеря целостности эпителиальной и эндотелиальной тканей может быть причиной серьезных заболеваний у человека (Tucker, Compans, 1993; Mullin et al., 2005).

В раннем эмбриогенезе мыши оплодотворенный ооцит последовательно дробится, и через 2.5 дня после оплодотворения (дпо) формируется 8-клеточный эмбрион, который подвергается компактизации — процессу усиления межклеточных взаимодействий, зависящему от трансмембранного белка E-кадгерина (De Vries et al., 2004). Далее формируется 32-клеточная морула, и клетки внешнего слоя морулы приобретают эпителиальные характеристики, в частности плотные межклеточные контакты. Приблизительно к 3.5 дпо эти клетки формируют трофэктодерму (ТЭ), которая представляет собой одноклеточный эпителиальный слой, окружающий заполненную жидкостью полость (бластоцель), и внутреннюю клеточную массу (ВКМ), прилегающую к ТЭ со стороны бластоцеля. Через 4.5 дпо клетки ВКМ дифференцируются в первичную эктодерму (ПЭК) и первичную эндодерму (ПЭн), которая покрывает ПЭК и отделяет его от продолжающегося увеличиваться бластоцеля (Hogan, 1994).

Поскольку ТЭ представляет собой эпителий, мы предположили, что она может быть непроницаемой для

вирусных частиц. В настоящей работе на примере модифицированного лентивируса мы доказали обоснованность такого предположения и обрисовали возможные сферы приложения этого наблюдения.

### Материал и методика

Упаковка лентивирусных частиц. Клетки линии 293Т трансфицировали LVTHM (20 мкг), рMD2G (5 мкг) и упаковочной рCMV-dR8.74psPAX2 (5 мкг) плазмидами при помощи кальций-фосфатного метода. LVTHM представляет собой репликационно неактивный лентивирус, сконструированный на основе вируса иммунодефицита человека и экспрессирующий маркерный белок GFP (Wiznerowicz, Trono, 2003). Лентивирус из супернатанта клеток концентрировали ультрацентрифугированием, замораживали в аликвотах при  $-80^{\circ}\text{C}$ , а затем титровали с использованием клеток 293Т по описанной методике (Wiznerowicz, Trono, 2003).

Инфицирование и микроскопия. У 4—6-недельных самок мышей линии C57Bl6 или FVB индуцировали суперовуляцию с использованием PMS и hCG (Hogan, 1994) и спаривали с самцами тех же линий. За 0 дпо принимали полночь суток начала спаривания. Об успешном спаривании судили по наличию вагинальных пробок (0.5 дпо). 4-клеточные эмбрионы (1.5 дпо) вымывали из

яйцевода в среде M2 (Sigma, Europe), а бластоцисты (3.5 дпо) — из матки, следуя известной процедуре (Hogan, 1994). Zona pellucida удаляли, помещая эмбрионы в кислый раствор Тирода на 2—3 мин. Эмбрионы промывали в среде M2 и инкубировали под минеральным маслом (Fluka, Europe) в течение ночи (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) в каплях среды KSOM (Specialty Media, США), содержащих упакованный вирус LVTHM в конечной концентрации (0.1—1.0) · 10<sup>7</sup> трансформирующих ед./мл. После инфекции эмбрионы переносили в свежую среду KSOM, помещенную в виде капель под минеральным маслом, культивировали (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) до 4.5 дпо, а затем фиксировали 5—10 мин в 4%-ном параформальдегиде при комнатной температуре и анализировали на конфокальном микроскопе Leica PS2. Для анализа экспрессии LVTHM-кодируемого GFP после имплантации 4—8-клеточные эмбрионы инкубировали с LVTHM в течение ночи, а по достижении 3.5 дпо подсаживали в матки псевдобеременных самок линии NMRI, находящихся на стадии 2.5 дпо после спаривания со стерильными самцами той же линии. В то же время бластоцисты на стадии 3.5 дпо инкубировали с LVTHM только 3—4 ч и подсаживали в тот же день псевдобеременным самкам. Как было установлено при анализе производных ТЭ на стадии 10.5 дпо, такой короткой инкубации было достаточно для эффективной трансдукции. Эмбрионы, внезародышевые мембраны и плаценту вырезали на стадии 10.5 или 18.5 дпо, фиксировали в 4%-ном параформальдегиде в течение 20 мин при комнатной температуре и анализировали на флуоресцентном стереомикроскопе Leica MZ 16 FA, используя набор оптических фильтров для GFP.

**ПЦР-генотипирование.** Ткань эмбриона плаценты помещали в ДНК-экстрагирующий буфер (20 mM Tris, pH 7.5, 100 mM NaCl, 100 mM EDTA, pH 8.0, 0.5% SDS и 0.2 мг/мл протеиназы К) и инкубировали при 60 °C в течение ночи при интенсивном встряхивании. Протеиназу К инактивировали путем прогрева проб при 96 °C в течение 15 мин. 1 мкл этой смеси брали для проведения стандартной ПЦР с выбранными параметрами амплификации (1 цикл: 95 °C, 5 мин; 35 циклов: 95 °C, 30 с/58 °C, 30 с/72 °C, 1 мин; 1 цикл: 72 °C, 10 мин). В амплификации использовали праймеры для GFP (5'-GCAAGCTGACCC-TGAAGTTCATC-3' и 5'-TCACCTTGATGCCGTTCTTC-TG-3') и для нормализации, на один из экзонов гена *Hprt* (5'-GCAAATACGAGGAGTCCTGTTGATG3' и 5'-CCAC-TGAGCAAAACCTCTTAGATGC-3'). Продукты ПЦР разделяли в 1.2%-ном агарозном геле.

## Результаты

Поскольку ТЭ представляет собой эпителий, мы предположили, что она может быть не проницаемой для вирусных частиц. Для проверки этого предположения мы использовали лентивирус LVTHM, экспрессирующий маркерный белок GFP (Wiznerowicz, Trono, 2003), что позволило напрямую отслеживать зараженные клетки (см. раздел «Материал и методика»). Вирус инкубировали либо с 4—8-клеточными эмбрионами (1.5—2.5 дпо), в которых еще не произошло компактизации, либо с эмбрионами на стадии ранней бластоцисты (3.5 дпо), которые прошли компактизацию и имели четко различимый бластоцель. Необходимым условием для успешной вирусной инфекции являлось предварительное удаление zona pellu-

cida, что согласуется с опубликованными ранее данными других авторов (Pfeifer et al., 2002).

Эмбрионы, инфицированные LVTHM, анализировали на стадии 4.5 дпо на предмет экспрессии в них GFP с использованием конфокальной микроскопии. В эмбрионах, инфицированных на стадии ранней бластоцисты, экспрессию GFP обнаруживали исключительно в полярной части ТЭ (пТЭ), контактирующей с ВКМ, и в пристеночной ТЭ (пСтЭ). Свечения GFP в ПЭк или ПЭн никогда не наблюдали при данном способе заражения (рис. 1, а). Мы проанализировали таким способом около 150 эмбрионов и ни в одном случае не наблюдали экспрессии GFP вне слоя ТЭ. Напротив, в эмбрионах, инфицированных на стадии 4—8 леток, экспрессию GFP наблюдали во всех клетках эмбриона (рис. 1, б). Приведенные данные убеждают в отсутствии спонтанной инактивации интегрированного в эмбриональный геном лентивируса в клетках ПЭк или ПЭн. Отсутствие направленной тканеспецифичной инактивации (сайленсинга) генов, привнесенных в геном лентивирусом, в частности в эмбриональных и внеэмбриональных тканях, включая ПЭк или ПЭн, было описано ранее другими авторами (Pfeifer et al., 2002).

После имплантации пТЭ продолжает пролиферировать и формирует внеэмбриональную эктодерму и эктоплацентарный конус. В ходе дальнейшего развития эти клетки дают начало губчатому и лабиринтному отделам плаценты. Клетки пСтЭ прекращают пролиферировать и превращаются в полиплоидные гигантские клетки трофобласта, локализованные на внешней стороне Райхертовой мембраны. Для того чтобы проследить судьбу зараженных LVTHM клеток после имплантации, эмбрионы, инфицированные на разных стадиях доимплантационного развития, были подсажены псевдобеременным самкам. Эмбриональные и плацентарные ткани были проанализированы на стадии 10.5 дпо. Как и ожидалось по результатам, полученным *in vitro*, экспрессию GFP в эмбрионах, зараженных на стадии бластоцисты, обнаруживали исключительно в производных ТЭ, а именно в гигантских клетках трофобласта на поверхности Райхертовой мембраны (данные не показаны), а также в лабиринтном и губчатом отделах плаценты (рис. 1, в). Всего было проанализировано 40 эмбрионов, инфицированных на стадии бластоцисты. В 25 из них (62 %) наблюдали экспрессию GFP, причем исключительно в тканях плаценты и(или) на Райхертовой мембране. Плацента на данной стадии развития (10.5 дпо) состоит из клеток, происходящих как из трофобласта (потомков ТЭ), так и из мезодермы аллантоиса, ведущей свое начало от ПЭк. Однако отсутствие экспрессии GFP непосредственно в тканях самого эмбриона и аллантоиса убеждает в том, что GFP-позитивные клетки в плаценте исключительно трофобластного происхождения. С приведенными данными согласуются и данные анализа подсаженных псевдобеременным самкам эмбрионов, зараженных лентивирусом на стадии 4—8 клеток. В этих эмбрионах экспрессия GFP обнаруживалась как в плаценте, так и в клетках самих эмбрионов (рис. 1, г). Таким образом, наши данные свидетельствуют об отсутствии тканеспецифичной инактивации вирусных генов в эмбриональных тканях, происходящих из ВКМ.

Далее мы провели анализ зараженных эмбрионов на поздних сроках беременности. Ранние бластоцисты (3.5 дпо) инкубировали в течение ночи с LVTHM и подсаживали в матки реципиентных самок по вышеприведенной схеме. Во-первых, было обнаружено, что экспрессия

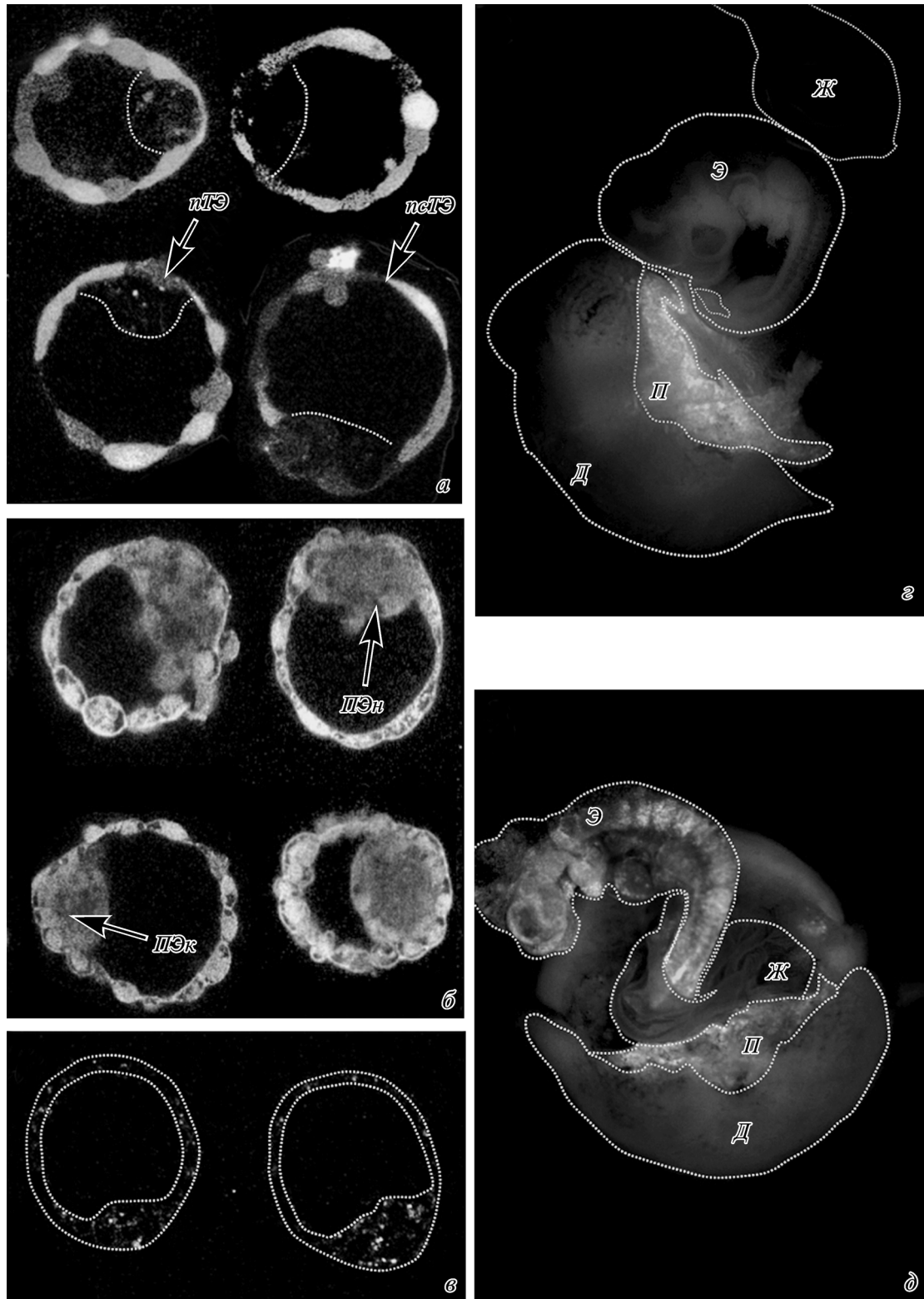


Рис. 1. Селективное заражение мышинной трофэктодермы (ТЭ) и ее производных лентивирусом.

Конфокальный анализ экспрессии GFP в поздних бластоцистах (4.5 дпо), зараженных LVTHM на разных стадиях развития. *а* — заражение на стадии ранней бластоцисты (3.5 дпо); *б* — заражение на стадии 4—8 бластомеров (1.5—2.5 дпо); *в* — незараженные эмбрионы, показанные в качестве негативного контроля; для постимплантационного анализа эмбрионы, зараженные лентивирусом на разных стадиях, подсаживали реципиентным самкам и анализировали через 10.5 дпо с использованием флуоресцентного стереомикроскопа; *г* — заражение на стадии 4—8 бластомеров. Штриховая белая линия показывает границы различных тканей; *nTЭ* — полярная ТЭ, *ncTЭ* — пристеночная ТЭ, *ПЭн* — первичная эндодерма, *ПЭК* — первичная эктодерма, *Д* — десидуальный отдел эндометрия матки, *Э* — эмбрион, *П* — плацента, *Ж* — желточный мешок.

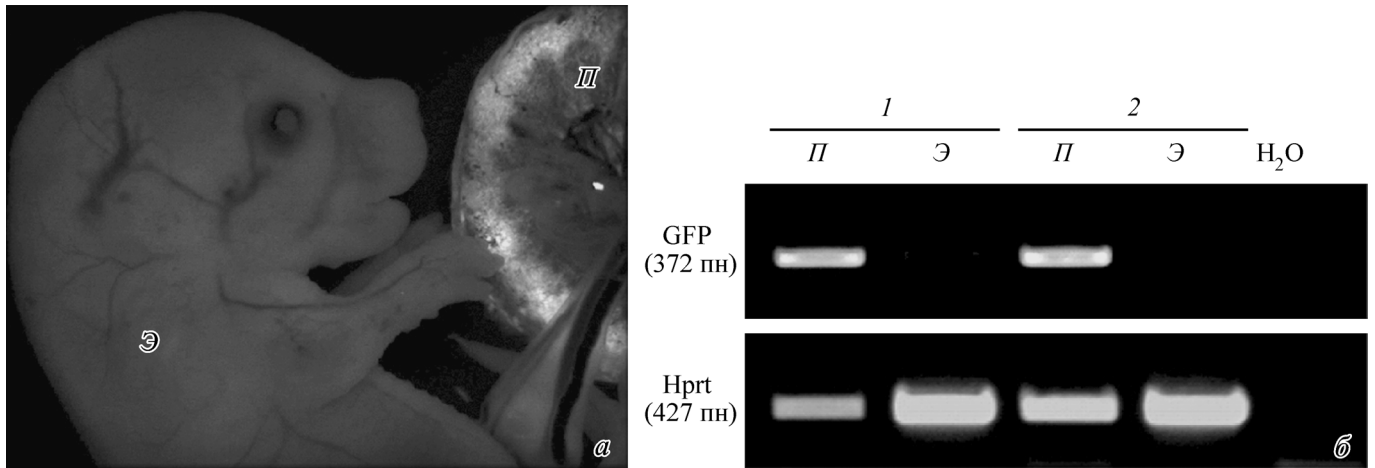


Рис. 2. Анализ зараженных эмбрионов мыши на поздней стадии беременности.

Ранние бластоцисты мыши (3.5 дпо) инфицировали LVTHM, подсаживали реципиентным самкам и анализировали через 18.5 дпо. *a* — анализ экспрессии GFP с помощью флуоресцентного стереомикроскопа; *б* — ПЦР-анализ (генотипирование) плаценты и двух эмбрионов (1, 2) с использованием праймеров на GFP и Hprt. Э — эмбрион, П — плацента.

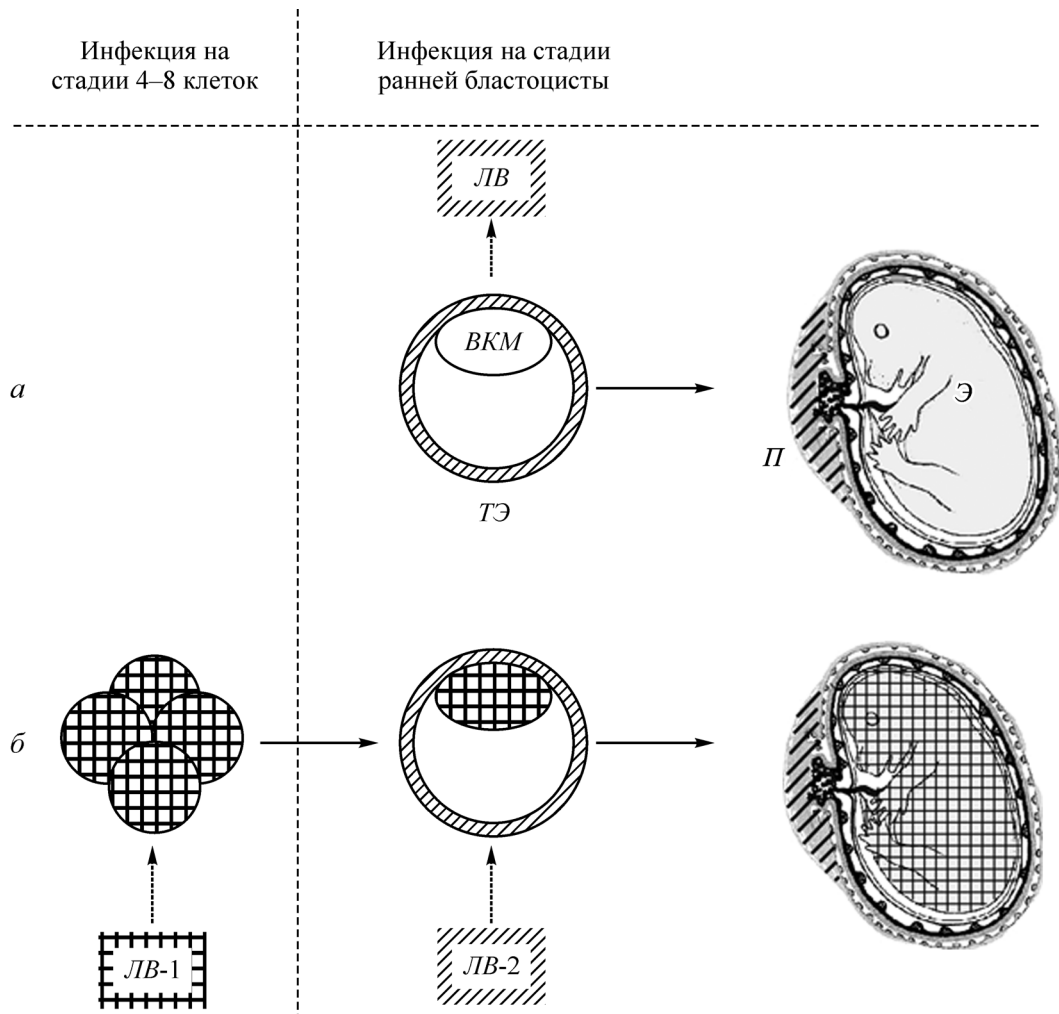


Рис. 3. Иллюстрация возможного применения неспособности вирусов преодолеть ТЭ ранней бластоцисты.

*a* — способ доставки модуляторов генной экспрессии (кДНК или shRNA) в трофобласт плаценты через селективное заражение ТЭ (ТЭ) репликационно неактивным лентивирусом (ЛВ) на стадии ранней бластоцисты; *б* — модуляция генной экспрессии в самом эмбрионе, осуществляемая через поэтапное инфицирование двумя лентивирусами (ЛВ-1, ЛВ-2). Э — эмбрион, П — плацента. Более подробно см. в тексте.



GFP стабильно поддерживается в плаценте по крайней мере до 18.5 дпо, тогда как сам эмбрион и внеэмбриональные мембраны (амнион и желточный мешок), происходящие из ВКМ бластоцисты, GFP не экспрессируют (рис. 2, а). Этот результат находится в согласии с данными анализа 10.5-дневных эмбрионов (см. выше). Однако наиболее важным наблюдением явилось то, что интегрированный LVTNM присутствует только в геноме плаценты, но не самого эмбриона (рис. 2, б). Это наблюдение окончательно убеждает в том, что отсутствие экспрессии GFP в эмбрионах, зараженных на стадии бластоцисты, не является следствием эпигенетического сайленсинга интегрированного лентивируса, а является следствием неспособности лентивирусных частиц преодолеть ТЭ бластоцисты в момент заражения.

### Обсуждение

В настоящей работе мы показали возможность стабильной трансдукции доимплантационных эмбрионов мыши при помощи лентивирусов. Подобные данные уже были опубликованы ранее (Pfeifer et al., 2002), однако показанное нами существенное отличие от них заключается в том, что ТЭ может служить жестким барьером для вирусных частиц вследствие эпителиальной природы этой ткани. Таким образом, ТЭ способна защищать ВКМ от вирусной инфекции. Дальнейшее распространение LVTNM из ТЭ невозможно, так как используемый вирус репликационно неактивен.

Наблюдаемая нами неспособность лентивирусов преодолевать ТЭ скорее всего не является уникальной для этой группы вирусов, и, вероятно, другие вирусы могут вести себя подобным образом. Например, мы провели сходные описанным выше эксперименты с использованием аденовируса 5 и получили такие же результаты, как и при использовании лентивируса LVTNM (данные не представлены).

Вопрос о том, какие именно молекулярные и клеточные компоненты ТЭ формируют не проницаемый для вирусных частиц барьер, остается задачей будущих исследований. Однако, вероятно, опосредованные E-кадерином межклеточные контакты или плотные контакты (или те и другие) вносят свой вклад в создание этого барьера (De Vries et al., 2004). В пользу данного предположения свидетельствует тот факт, что E-кадгерин необходим для поддержания целостности эпителия дыхательных путей и их защиты от аденовирусной инфекции (Man et al., 2000).

Наши данные о непроницаемости ТЭ для ряда вирусов являются многообещающими в свете возможной тканеспецифичной генетической манипуляции на модели лабораторной мыши, а возможно, в перспективе и на человеке при генной терапии плацентарной недостаточности. Например, основанный на вирусной инфекции подход может являться значительно менее трудоемкой альтернативой тетраплоидной агрегации — методу, широко используемому для генетического разделения функций генов в эмбрионе и плаценте (Nagy et al., 1990; Tanaka et al., 2001). Как показано в настоящей работе и проиллюстрировано на рис. 3, а, путем заражения эмбрионов на стадии бластоцисты вирусом, экспрессирующим интересующую кДНК или интерферирующую РНК (как, например, small hairpin RNA — shRNA), можно добиваться селективной экспрессии (кДНК) или, наоборот, подавления экспрессии РНК-мишени (shRNA) в трофобластных тканях пла-

центы. С другой стороны, метод может быть адаптирован для избирательного манипулирования экспрессией генов в ВКМ и ее производных с применением двухшагового инфицирования (рис. 3, б). Например, при получении трансгенных мышей эмбрионы могут быть сначала инфицированы на стадии 4—8 клеток для доставки интересующей кДНК во все клетки зародыша. Затем, когда эмбрионы достигнут стадии бластоцисты, они заражаются уже shRNA-экспрессирующим вирусом, подавляющим экспрессию этой кДНК исключительно в плаценте. Соответственно для РНК-интерференции в производных ВКМ в первом раунде проводится заражение shRNA-кодирующим вирусом, а во втором — кДНК-кодирующим вирусом, который будет удалять эффект первого вируса в ТЭ. Естественно, что при обоих сценариях shRNA будет интерферировать не только с РНК-продуктом трансгена, но и с мРНК, кодируемой хозяйским геномом. Этого эффекта при желании можно избежать за счет сайтнаправленного мутагенеза по 3-м позициям в триплетных кодонах в участке кДНК, комплементарном shRNA, т. е. путем введения нонсенс-мутаций. Таким образом, можно добиться того, что shRNA будет узнавать только экзогенную мРНК.

Дальнейшую гибкость рассматриваемой системы тканеспецифичной модуляции генной экспрессии может обеспечивать дополнительное использование Tet-индуцибельной системы. Для лентивирусных векторов такая возможность была ранее описана (Wiznerowicz, Trono, 2003).

Работа выполнена при финансовой поддержке Института цитологии сообщества Макса Планка и программы президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».

### Список литературы

- De Vries W. N., Evsikov A. V., Haac B. E., Fancher K. S., Holbrook A. E., Kemler R., Solter D., Knowles B. B. 2004. Maternal beta-catenin and E-cadherin in mouse development. *Development*. 131 : 4435—4445.
- Hogan B., Bddington R., Costantini F., Lacy E. 1994. Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 497 p.
- Man Y., Hart V. J., Ring C. J., Sanjar S., West M. R. 2000. Loss of epithelial integrity resulting from E-cadherin dysfunction predisposes airway epithelial cells to adenoviral infection. *Amer. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 23 : 610—617.
- Mullin J. M., Agostino N., Rendon-Huerta E., Thornton J. J. 2005. Keynote review: epithelial and endothelial barriers in human disease. *Drug Discov. Today*. 10 : 395—408.
- Nagy A., Gocza E., Diaz E. M., Prideaux V. R., Ivanyi E., Markkula M., Rossant J. 1990. Embryonic stem cells alone are able to support fetal development in the mouse. *Development*. 110 : 815—821.
- Pfeifer A., Ikawa M., Dayn Y., Verma I. M. 2002. Transgenesis by lentiviral vectors: lack of gene silencing in mammalian embryonic stem cells and preimplantation embryos. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 99 : 2140—2145.
- Tanaka M., Hadjantonakis A. K., Nagy A. 2001. Aggregation chimeras. Combining ES cells, diploid and tetraploid embryos. *Methods Mol. Biol.* 158 : 135—154.
- Tucker S. P., Compans R. W. 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv. Virus Res.* 42 : 187—247.
- Wiznerowicz M., Trono D. 2003. Conditional suppression of cellular genes: lentivirus vector-mediated drug-inducible RNA interference. *J. Virol.* 77 : 8957—8961.

THE APPLICATION OF LENTIVIRAL VECTORS FOR TISSUE-SPECIFIC GENE MANIPULATIONS

*A. B. Malashicheva,<sup>1,2</sup> B. Kanzler,<sup>2</sup> E. N. Tolkunova,<sup>1,2</sup> D. Trono,<sup>3</sup> A. N. Tomilin<sup>1,2</sup>*

<sup>1</sup> Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, Russia, <sup>2</sup> Max Planck Institute for Immunobiology, Freiburg, Germany, and <sup>3</sup> Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Switzerland;

<sup>1</sup> e-mail: antom@mail.cytspb.rssi.ru

The trophectoderm (TE) of blastocysts, the first epithelium established in mammalian development, 1) plays signaling, supportive, and patterning functions during pre-implantation development, 2) ensures embryo implantation into the uterine wall, and 3) gives rise to extra-embryonic tissues essential for embryo patterning and growth after implantation. We show that mouse TE, itself permissive to lentiviral (LV) infection, represents a robust non-permeable physical barrier to the virus particles, thereby shielding the cells of the inner cell mass (ICM) from viral infection. This LV feature will allow modulations of gene expression in a lineage-specific manner, thus having significant applications in mouse functional genetics.

Key words: lentiviral vector, trophectoderm, placenta, blastocyst, transgenesis.