

<https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-10-23>



СОЗДАНИЕ ПОЛНЫХ ГИБРИДНЫХ ДНК-КОНСТРУКЦИЙ С ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА HLA-A*02:01:01:01

В.Н. Каркищенко¹, Н.В. Петрова^{1, *}, Е.С. Савченко¹, Н.С. Огнева¹, Е.М. Колоскова²,
С.В. Максименко¹, В.А. Манувера³, П.А. Бобровский³, В.Н. Лазарев³

¹ ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»
143442, Российская Федерация, Московская обл., Красногорский р-н, п. Светлые горы, влд. 1

² Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии
и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства —
ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»
249013, Российская Федерация, Калужская обл., Боровск, п. Институт

³ ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»
119435, Российская Федерация, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

Борьба с фатальными острыми поражениями легких, острым респираторным дистресс-синдромом (ОРДС), «цитокиновым штормом», возникающими при тяжелой интерстициальной патологии, в т. ч. COVID-19, требует быстрого получения и внедрения новых препаратов, биомедицинских технологий лечения. Это, в свою очередь, ставит исследователей перед задачей разработки адекватных биомоделей для доклинических исследований. Существующие генетические отличия у представителей разных этнических групп населения оказывают влияние на механизм и эффективность лекарственных препаратов. Биомодели, учитывающие особенности генетического полиморфизма конкретных популяций, позволяют полнее исследовать молекулярно-генетические механизмы действия фармакологических средств, включая иммунобиологические. Созданная генно-инженерная конструкция кодирует гибридную молекулу класса I МНС и содержит β_2 -микроглобулин человека, фрагменты ($\alpha 1$ -и $\alpha 2$ -домены) гена HLA-A*02:01:01:01, который характерен для русского человека, и $\alpha 3$ домен H2-K комплекса мыши. Линейный фрагмент из ДНК-конструкции будет в дальнейшем использован для получения линии гуманизированных трансгенных мышей.

Ключевые слова: генно-инженерная конструкция, HLA-A*02:01:01:01 русского человека, трансгенноз, гуманизированные трансгенные мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности: авторы выражают искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» и её заведующему Ефимову Григорию Александровичу за помощь в отборе доноров и предоставлении образцов плазмы крови.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Петрова Н.В., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Манувера В.А., Бобровский П.А., Лазарев В.Н. Создание полных гибридных ДНК-конструкций с геном человека HLA-A*02:01:01:01. *Биомедицина*. 2021;17(1):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-10-23>

Поступила 02.11.2020

Принята после доработки 22.01.2021

Опубликована 10.03.2021

CHIMERIC CONSTRUCT ENGINEERING WITH HUMAN VARIANT HLA-A*02:01:01

Vladislav N. Karkischenko¹, Nataliya V. Petrova^{1,*}, Elena S. Savchenko¹,
Nastasya S. Ogneva¹, Elena M. Koloskova², Sergey V. Maksimenko¹,
Valentin A. Manuvera³, Pavel A. Bobrovsky³, Vassili N. Lazarev³

¹ Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
143442, Russian Federation, Moscow Region, Krasnogorskiy District, Svetlye Gory Village, building 1

² All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition —
branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry
named after acad. L.K. Ernst
249013, Russian Federation, Kaluga Region, Borovsk, Institut Settlement

³ Federal Research and Clinical Centre of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical
and Biological Agency of Russia
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya Street, 1a

The containment of lethal acute lung injuries, acute respiratory distress syndrome (ARDS) and cytokine storm arising from severe interstitial pathology, including COVID-19, requires an efficient design and therapeutic implementation of new drugs and biomedical technologies. This demand calls for adequate biomodels in preclinical research and trial. Genetic variations between ethnic groups condition the specific mechanisms of drug efficiency. Modelling this population-specific genetic polymorphism allows a comprehensive research into the molecular bases of pharmacological action, also in immune biology. The engineered chimeric molecule encodes a MHC class I product that combines human β_2 -microglobulin, the α_1 and α_2 domains of Russian ethnic allelic variant HLA-A*02:01:01:01 and murine H2-K complex α_3 domain. The linear chimeric gene fragment will be used to obtain humanised lineages of transgenic mice.

Keywords: genetically engineered construct, Russian ethnic variant HLA-A*02:01:01:01, transgenesis, humanised transgenic mice

Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: the authors are sincerely grateful to staff of the Laboratory of Transplant Immunology at the National Medical Research Centre of Haematology and head of laboratory Efimov Grigory Alexandrovich for assistance in donor selection and provision of blood plasma samples.

For citation: Karkischenko V.N., Petrova N.V., Savchenko E.S., Ogneva N.S., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Lazarev V.N. Chimeric Construct Engineering with Human Variant HLA-A*02:01:01:01. *Journal Biomed.* 2021;17(1):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-17-1-10-23>

Submitted 02.11.2020

Revised 22.01.2021

Published 10.03.2021

Введение

Современные биомедицинские тенденции требуют оценки не только химико- и фармакодинамики, а также соответствующих кинетических параметров и констант, но и фармакогенетических и геномных показателей. Несмотря на общность происхождения, существуют генетические отличия между разными этническими группами

людей, сформировавшиеся в результате длительной эволюции при взаимодействии генотипа с условиями окружающей среды и являющиеся результатом адаптации организма к образу жизни, рациону питания, климатическим особенностям территории и другим факторам внешней среды. Это предопределено исключительным полиморфизмом генов в человеческих популя-

циях по всему многообразию ферментативных и метаболических систем, что создаёт существенные проблемы в возможностях применения одних и тех же препаратов и стратегий для лечения разных групп населения. В США и других странах мира начато создание этнических лекарств, а в большинстве государств принимаются законодательные ограничения изготовления и реализации препаратов по их побочному действию на основные этнические группы населения [6]. Отличия в воздействии лекарственных препаратов свидетельствуют о наличии внутренних механизмов, определяющих этот феномен. Накопление научных данных о предрасположенности разных этнических групп к развитию определённых заболеваний и стремительное развитие этнической фармакологии показывают необходимость введения новых норм по разработке и тестированию лекарственных препаратов, учитывающих генетические особенности потребителей, что, в свою очередь, предполагает целенаправленное создание биомоделей [1–9, 13, 19] для фармакологической оценки этих препаратов. Огромным прорывом в биомоделировании стала возможность создания гуманизированных мышей, в геном которых искусственно встроены один или несколько генов человека. Использование в исследованиях подобных мышей позволяет получить наиболее полные результаты, т.к. данная модель максимально точно воспроизводит генетические особенности и позволяет более достоверно экстраполировать полученные результаты на человека. В России этим вопросам пока уделяется минимальное внимание, хотя русские являются самым многочисленным народом не только нашей страны, но и всей Европы, с крупными диаспорами в ближнем и дальнем зарубежье. Русские достаточно однородны в антропологическом отношении, с крайне редко встречаемым эпикантусом, близким по аутосомным маркерам с европейскими

народами, особенно северными. По результатам исследования маркёров митохондриальной ДНК они имеют значительные, если не кардинальные, отличия от соседних, тюркских, монголоидных, северо-кавказских и финно-угорских, популяций [22, 24]. Создание трансгенных гуманизированных животных-моделей, несущих ген русского человека, является важнейшим этапом для выяснения особенностей генетических и эпигенетических механизмов патологических процессов и эффектов лекарств.

Сильнейшие вспышки инфекционных заболеваний преследовали человечество на протяжении всей истории. Примерно каждые 100 лет масштабная эпидемия инфекционных заболеваний (чума, «испанка» и пр.) уносила жизни миллионов людей. Не стал исключением и XXI век. Пандемия COVID-19, вируса, преодолевшего кросс-видовой барьер и молниеносно охватившего весь земной шар [10, 23], нанесла серьёзный урон мировой экономике, здравоохранению и социально-экономическим устоям общества. Различия в степени тяжести, симптомах и их выраженности [16], а также накопление данных об этнических особенностях протекания болезни у разных групп населения (появление «британского штамма» и пр.) позволяют предположить наличие внутренних механизмов, оказывающих влияние как на чувствительность организма к вирусу, так и на эффективность применения той или иной терапии.

В конце декабря 2020 г. главный врач Англии Крис Уитти заявил об обнаружении новой разновидности коронавируса SARS-CoV-2, мутация которого привела к большей вирулентности, скорости распространения с чертами популяционного полиморфизма. Клинические наблюдения за течением процессов при поражении коронавирусом презентировали (по данным отчетов московских госпиталей и собственным наблюдениям) документально подтвержденные этнические и популяционные различия у от-

дельных пациентов, что определяло выбор терапевтической и, в целом, врачебной тактики в отношении как русских, так и представителей других этнических групп.

Опыт показывает, что не все препараты, разрешенные к медицинскому применению и хорошо себя зарекомендовавшие в странах Американского континента, Юго-Восточной Азии и Ближнего Востока, были столь же оптимальны в отношении русской популяции. Это особенно относится к медицинским иммуно-биологическим средствам, белковым, пептидным, антибиотическим средствам и противовирусным препаратам.

Группа учёных из США обобщила данные Института биомедицинских исследований и Массачусетского технологического института (США) и отметила позитивность ПЦР-тестов у переболевших COVID-19 даже после выздоровления, о чём сообщили в журнале «Science» [12, 26]. Фрагменты SARS-CoV-2 в принципе способны интегрироваться в геном человека, и это иллюстрируется механизмом обратной транскрипции. Тому подтверждение, что человеческий геном содержит около 98-ми тыс. эндогенных ретровирусных элементов последовательностей ДНК архивированных, внедрившихся туда более 150-ти тыс. лет назад. Дэвид Балтимор, профессор Массачусетского технологического института, Нобелевский лауреат по физиологии и медицине, «отец геной инженерии», в комментариях к статье отметил, что подтверждена лишь сама возможность интеграции, соответственно, возникают вопросы: остается ли инфицированный SARS-CoV-2 геном человека таковым навсегда? Как тогда это скажется на стратегии лечения? Каковы пути поиска таргетных препаратов? Возможны ли реальные биомодели на основе гуманизированных трансгенных животных, несущих ген человека? Эти и другие вопросы важны для всего научного сообщества. На данном этапе перед мировым сообществом стоит задача разработки оптимальных и адекват-

ных стратегий лечения и профилактики, которые в свою очередь требуют создания надёжных биомоделей.

В НЦБМТ ФМБА России ведётся разработка новой биомодели, а также поддерживаются уже созданные различные модели социально значимых заболеваний. В настоящее время нами описана токсическая модель острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), которая воспроизводит повреждение организма, аналогичные вирусной пневмонии при COVID-19 [3, 9].

Данная работа посвящена лишь небольшому, но важному фрагменту процесса создания новой биомодели: разработке генно-инженерной конструкции (ГИК) для получения гуманизированных мышей, несущих ген HLA-A*02:01:01:01. Выбор мишени для трансгенеза обусловлен динамикой распределения аллелей генов иммунного ответа среди населения нашей страны. Анализ литературных данных показал, что аллелью, имеющей наибольшую частоту встречаемости у русских людей, является HLA-A*02:01:01:01. На основе этой ГИК в дальнейшем будет создана линия гуманизированных трансгенных мышей, которая может быть использована для решения широкого круга задач, включая исследование инфекционных заболеваний, разработку и тестирование вакцин, тестирование безопасности и иммуногенности, а также для исследований, направленных на изучение онкологических и аутоиммунных заболеваний.

Материалы и методы

Получение первичного биоматериала

Первичный материал (плазма крови) был любезно предоставлен лабораторией трансплантационной иммунологии ФГБУ «НМИЦ гематологии» (зав. лаб. Ефимов Григорий Александрович). В процессе отбора доноров плазмы учитывались как фенотипические характеристики (отсутствие экипантуса и пр.), так и генотипические маркёры, а также генеалогия человека.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные в работе
Table 1. Oligonucleotides used in research

Праймер	5'-3'-последовательность	Введенный сайт
b2mF	GTTCTAGAGCCACCATGTCTCGCTCCGTGGCCTTAG	XbaI
b2mR	ACCTCATGCTGTGAGAGCATCCACCACCAGAGCCTCCA	
07F	TGGAGGCTCTGGTGGTGGATGCTCTCACAGCATGAGGT	
07R	CACATGAGCCTTTGGGGAATCGGCTCTCTGCAGTGTCTC	
H2F	GAGACACTGCAGAGAGCCGATCCCCAAAGGCTCATGTG	HindIII
H2R	ACCAAGCTTCACGCTAGAGAATGAGGGT	
cbhF	TTGACTAGTCCGTTACATAACTTACGGTAAATGG	SpeI
cbhR	GCTCTAGAACCTGAAAAAAGTGATTTTCAGGCAGGTG	XbaI

Бактериальные штаммы и клеточные линии

В работе использовали:

- штамм *E. coli* TOP10 («Invitrogen», США), генотип F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL (Str^R) endA1 λ-;
- клеточные линии НЕК-293FT («Thermo Fisher Scientific», США), C2C12 («ATCC», США).

Плазмидные векторы

В разработке ГИК применяли плазмидные векторы pсDNA3.4 («ThermoFisher Scientific», США). pX330-U6-Chimeric_BB-CVh-hSpCas9 (Addgene #42230). Список и последовательности праймеров, использованных в работе, приведены в табл. 1.

Результаты и их обсуждение

Дизайн химерных ДНК-конструкций, включающих нуклеотидные последовательности β₂-микроглобулина человека, α1- и α2-доменов МНС человека (HLA) и α3-домена МНС мыши для интеграции в геном мыши с целью получения новой гуманизированной трансгенной линии

Для получения структурной части химерного гена было амплифицировано три ДНК-фрагмента: фрагмент гена β₂-микроглобулина человека с использованием пары праймеров b2mF/b2mR-02

и κДНК библиотеки в качестве матрицы, полученной из клеток линии НЕК293 с использованием гексамерных праймеров; фрагмент структурной части гена HLA A, соответствующий доменам α1 и α2, с использованием пары праймеров 02F/02R и синтетической конструкцией гена HLA-A*02:01:01:01 («Евроген», Россия); фрагмент гена МНС, соответствующий домену α3 мышинового комплекса гистосовместимости, с использованием пары праймеров H2F-02/H2R и κДНК библиотеки, полученной из клеток линии C2 C12, с использованием гексамерных праймеров.

Для сборки фрагмента из трех частей 5 нг каждого из выделенных фрагментов с первого этапа смешивали, добавляли ПЦР-смесь для полимеразы Phusion High-Fidelity DNA Polymerase («Thermo-Fisher Scientific», США) за исключением праймеров.

Программа амплификации

Программа амплификации была следующей: первичная денатурация 2 мин при 95°C, 10 циклов в режиме: 98°C — 10 с, 60°C — 10 с, 72°C — 60 с. Далее были добавлены праймеры b2mF/H2R, после чего было проведено еще 20 циклов в режиме: 98°C — 10 с, 60°C — 10 с, 72°C — 60 с. В результате был получен ПЦР-фрагмент, соответствующий структурной части гена β-микроглобулина человека, соединенной через глицин-сериновый линкер с α1-, α2-доменами

HLA A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом мышинового комплекса H-2K. Полученный ДНК-фрагмент клонировали в плазмиду pCDNA3.4 после предварительной обработки эндонуклеазами рестрикции XbaI и HindIII. Далее был амплифицирован ДНК-фрагмент с использованием пары праймеров cbhF/cbhR и плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 в качестве матрицы. ДНК-фрагмент и плазмиды, полученная на предыдущем этапе, были обработаны эндонуклеазами рестрикции SpeI и XbaI. После лигирования был получен вектор, содержащий промотор β -актина цыплят СВН и кодирующий химерный комплекс гистосовместимости первого класса, содержащий кодирующую часть гена β -микроглобулина человека, соединенную через глицин-сериновый линкер с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами HLA A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом мышинового комплекса H-2K. Полученную плазмиду назвали pCBH-b2m-A0201-h2k (рис. 1).

С целью получения линейного фрагмента ДНК (генной конструкции), предназначенной для микроинъекций, плазмиду pCBH-b2m-A0201-h2k расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglII и SalI (имеют более одного сайта рестрикции в исходной плазмиде-векторе). Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3181 п.н., вырезали и выделяли из геля с помощью набора GeneJET Gel Extraction Kit («Thermo-Fisher Scientific», США). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли с помощью флуориметра Qubit («Thermo-Fisher Scientific», США). Схема полученной генной конструкции приведена на рис. 2, размеры и описание ее фрагментов — в табл. 2.

Для изучения реакций молекул HLA класса I (HLA CI) с цитотоксическими Т-лимфоцитами (Т-киллеры, CTL) во многих лабораториях мира были созданы

животные-модели — гуманизированные трансгенные мыши, экспрессирующие немодифицированные молекулы HLA CI [11]. Однако при заражении этих мышей вирусами, презентуемыми молекулами других аллелей HLA CI, преимущественно развивались CD8 CTL-ответы на H-2-рестрикты [14]. Замена HLA $\alpha 3$ -домена гомологичным доменом H-2 значительно улучшает распознавание и использование молекул HLA CI: в таких условиях мобилизуется разнообразный Т-клеточный репертуар $V\beta$ - и $V\alpha$ -рецепторов у мышей, что позволяет более эффективно использовать молекулы HLA CI [18].

Наиболее удачным для получения HLA-гуманизированных мышей оказалось создание моноцепочечной химерной конструкции, содержащей последовательности β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -доменов HLA и H-2 мыши, кодирующей $\alpha 3$ -домен, трансмембранную и цитоплазматическую части: $\beta 2$ m-HLA-H-2 (HND). Такие мыши, созданные на основе животных с двойным нокаутом (H-2Db/- $\beta 2$ m/-), почти лишены молекул H-2 класса I (рис. 3). Фенотипический и функциональный анализ их периферического репертуара CD8 Т-клеток показал, что химерный белок, продукт HND для аллеля HLA-A2.1, поддерживают тимусную положительную селекцию CD8 CTL и активировать CTL HLA-A2.1 вирус-специфических рестриктов на периферии [20]. Общий размер линейной генной конструкции HND составлял 4 тыс. п. н. Ее человеческая часть содержала в себе промотор и первый экзон (кодирующий лидерную последовательность) HLA-A2.1, кДНК β_2 -микроглобулина человека и линкерную последовательность, 2-й экзон ($\alpha 1$) и интрон, 3-й экзон ($\alpha 2$ -домен) и часть 3-го интрона HLA-A2.1. Мышиная часть содержала часть 3-го интрона, 4-й экзон ($\alpha 3$ -домен) и 5–8-й экзоны с интронами и 3'нетранслируемым регионом H-2D. Следует отметить,

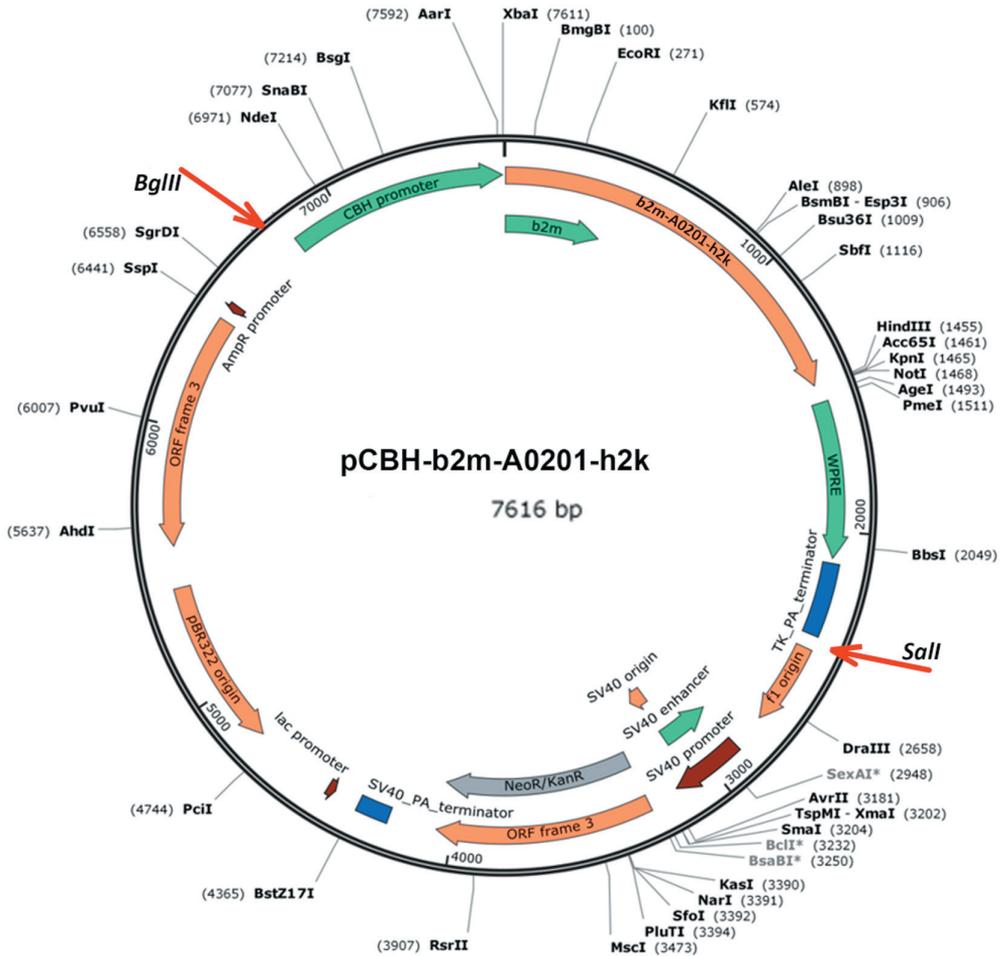


Рис. 1. Схема плазмиды pCBH-b2m-A0201-h2k, полученной на основе плазмиды-вектора pcDNA3.4.

Примечание: ДНК-последовательность CMV-промотора плазмиды pcDNA3.4 была заменена последовательностью CBH-промотора, амплифицированного с плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CBH-hSpCas9. Красными стрелками указаны сайты рестрикции для вырезания линейного фрагмента CBH-b2m_A0201-h2k.

Fig. 1. Map of pCBH-b2m-A0201-h2k plasmid derived from plasmid vector pcDNA3.4.

Note: CMV promoter in plasmid pcDNA3.4 is replaced with promoter pCBH from plasmid pX330-U6-Chimeric_BB-CBH-hSpCas9. Red arrows denote restriction sites flanking linear fragment CBH-b2m_A0201-h2k.

что в трансфицированной клеточной культуре RMA-лимфомы мыши уровень экспрессии химерного белка был выше, если в генной конструкции использовали $\beta 2m$ человека, а не мыши [20]. Этот эффект объясняется более эффективной ассоциацией цепи HLA с $\beta 2m$ человека, чем с мышиным, что позволяет более быстро переносить молекулы HLA из эндоплазматическо-

го ретикулума в аппарат Гольджи в клетках мышей, ко-трансфицированных ДНК HLA C1 и $\beta 2m$ человека или мыши [21].

$\beta 2m$ -микроглобулин в комплексе с антигенами МНС C1 находится на мембранах всех ядросодержащих клеток организма, присутствует во всех его биологических жидкостях. В большом количестве белок представлен на лимфоцитах. Присутствие

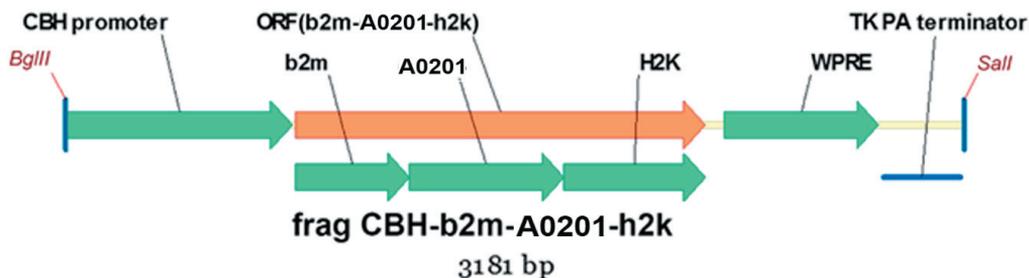


Рис. 2. Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m_A0201-h2k ДНК, предназначенной для микроинъекции.

Примечание: линейный фрагмент содержит CBH-промотор, структурную часть гена b2m человека, соединенные глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами молекулы HLA- A*02:01:01:01 и $\alpha 3$ -доменом молекулы H-2K, посттрансляционный регуляторный элемент WPRE и сигнал полиаденилирования TK PA.

Fig. 2. Map of linear fragment CBH-b2m_A0201-h2k used in microinjection.

Note: linear fragment contains CBH promoter; human b2m coding region tied by glycine-serine linker with HLA-A*02:01:01:01 α_1 and α_2 domains and H-2K α_3 domain, posttranslational regulatory element WPRE and Poly (A) signal TK PA.

Таблица 2. Структура генной конструкции frag_CBH-b2m-A-0201-h2k (3181 п. н.)

Table 2. Structure of frag_CBH-b2m-A-0201-h2k construct (3181 bp)

Фрагмент	Размер, п. н.	Описание
CBH-b2m-A0201-h2k	3181	генная конструкция
CBH	796	промотор
β_2 m человека	402	β_2 -микроглобулин человека
Экзон 1	67	
Экзон 2	279	
Экзон 3 (до TAA)	11	
Линкер (Гли4 Сер1) x3	45	линкер
Фрагмент HLA — A0201	540	фрагмент МНС I класса человека (домены $\alpha 1$, $\alpha 2$)
Фрагмент h2k	501	фрагмент МНС I класса мыши
mEx4	276	домен $\alpha 3$ H-2K
mEx5	120	цитозольный фрагмент белка
mEx6	33	
mEx7	39	
mEx8	32	
WPRE	676	посттрансляционный регуляторный элемент
TK-PA-terminator	271	сигнал полиаденилирования

$\beta 2$ m в сыворотке крови обусловлено процессами деградации и репарации клеток. Он необходим для экспрессии на клеточной поверхности белков МНС класса I и стабильности канавки связывания пептидов. В отсутствие $\beta 2$ -микроглобулина на поверхности клеток могут быть обнаружены очень ограниченные количества молекул МНС CI. В их отсутствие CD8-T-клетки, участвующие в форми-

ровании приобретенного иммунитета, не развиваются.

Полученная линия ННД-мышей в дальнейшем успешно использовалась в различных целях. Например, гибридную конструкцию ННД использовали для оценки возможности молекул HLA-A2.1 опосредовать участие автореактивного ответа CD8+ T-клеток в развитии диабета типа 1 (T1D): носители ряда генов МНС CI, вклю-

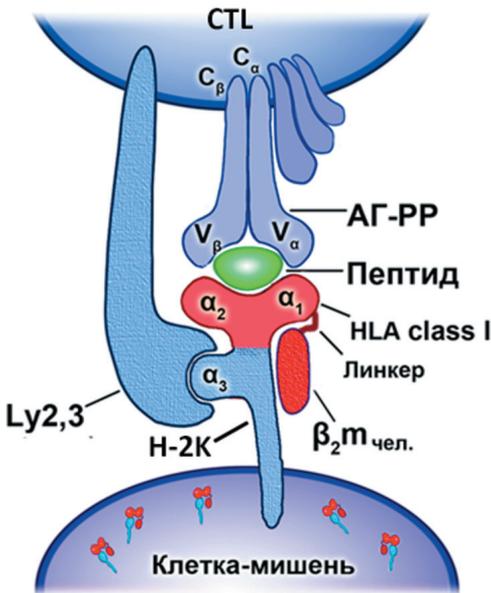


Рис. 3. Взаимодействие HLA CI (продукт гибридного типа) с распознающими рецепторами цитотоксического Т-лимфоцита (CTL). При трансгеннозе α_1 - и α_2 -домены мышинового гена замещены соответствующими фрагментами гена HLA человека, α_3 — замещен соответствующими фрагментами гена H-2K мыши, β_2m замещен соответствующим фрагментом микроглобулина человека, соединенным через линкер с HLA человека.

Примечание: АГ-PP — антиген, распознающий рецептор; β_2m — β_2 -микроглобулин; клетка-мишень — антиген-презентирующая клетка; Ly2,3 — мышинный эквивалент рецептора CD8 человека.

Fig. 3. Interaction of HLA CI (chimeric) with cytotoxic T lymphocyte (CTL) specific receptors. In transgenesis, murine α_1 and α_2 domains are substituted by corresponding fragments of human HLA gene, α_3 — by corresponding fragments of murine H-2K and β_2m — by corresponding human microglobulin sequence linker-tied with human HLA.

Note: АГ-PP — receptor-specific antigen; β_2m — β_2 -microglobulin; клетка-мишень — antigen-presenting cell; Ly2,3, — murine homologue of human CD8 receptor.

чая HLA-A*0201 (HLA-A2.1), в сочетании с некоторыми молекулами MHC C2, имеют склонность к его развитию. T1D ускоряется у NOD-трансгенных мышей, экспрессирующих тяжелую цепь HLA-A2.1. Линия NOD. m β_2m null h β_2m .HLA-A2.1hyb оказалась востребована для изучения T1D [25]. Введение точечной мутации в одноцепо-

точный тример HLA класса I индуцирует усиление прайминга CTL и противоопухолевого иммунитета.

Результатом использования созданной генной конструкции должны стать трансгенные мыши, экспрессирующие такой же химерный белок MHC CI β_2m -HLA-H-2 на поверхности клеток. Однако генные конструкции, созданные нами, имеют принципиальные отличия от зарубежных разработок [25]. Во-первых, мы использовали СВН-промотор, который обеспечивает устойчивую долгосрочную экспрессию во всех клетках, наблюдаемых при использовании традиционных сильных промоторов, — CMV (цитомегаловирусный) или СВА (β -актина цыпленка), включая проводящие нейроны [15]. Кроме того, была использована сигнальная последовательность полиаденилирования тимидинкиназы HSV. Во-вторых, в состав ГИК нами был внесен WPRE фрагмент (посттрансляционный регуляторный элемент вируса гепатита сурка) — последовательность ДНК, которая при транскрибировании создает третичную структуру, усиливающую экспрессию гена [17]. «Белковая» часть, в отличие от прототипа, построена только из кДНК фрагментов MHC CI человека и мыши. При этом мы не включали в состав конструкции первый экзон, кодирующий последовательность лидерного пептида HLA, оставив последовательность сигнального пептида β_2 -микроглобулина человека.

И созданная нами, и ННД генные конструкции предназначены для классического трансгенеза, т.е. все полученные трансгенные мыши будут отличаться как по сайту интеграции трансгена, по количеству его копий, так и по эффективности экспрессии химерного MHC CI. Есть основания предполагать, что структурные элементы, внесенные нами в генетическую конструкцию, позволят получить мышью с устойчивой высокой экспрессией хи-

мерного HLA-A*02:01. А использование технологии CRISPR/Cas9 для нокаута гена $\beta 2m$ мыши приведет к полной элиминации молекул H-2 у гуманизированной по HLA CI линии мышей.

Заключение

Развитие технологий гомологической рекомбинации, дизайна химерных ДНК-конструкций и новых подходов к редактированию генома, включая CRISPR/Cas9 и его модификаций, сделало возможным получение гуманизированных животных с точечными генетическими модификациями для решения конкретных биомедицинских проблем. Наряду с бурными успехами зарубежных генетиков и биотехнологов в этом направлении, в России крупнейшими центрами, где проводятся подобные исследования, являются НЦБМТ ФМБА России, Институт биологии гена РАН и Федеральный исследовательский центр Сибирского отделения РАН. Тем не менее число потребителей трансгенных и нокаутных мышей и крыс, закупаемых за рубежом для лабораторий нашей страны, неукоснительно растет. Их использование сдерживается продолжительностью транспортировки и карантинных процедур, зачастую невозможностью их последующего воспроизводства и предельно высокой стоимостью от 350 до 3750 долларов США за особь. Так, основным производителем и коммерческим поставщиком трансгенных и нокаутных мышей является американская фирма «Taconic», которая имеет несколько производственных площадок как на территории США, так и в Европе. Однако, несмотря на лидерство в производстве трансгенных мышей, применение биомodelей «Taconic» существенно ограничено по ряду причин, основными из которых являются:

- а) цена и неопределенные сроки поставки (карантин и пр.);
- б) в большинстве случаев отсутствует возможность заказа на мышей по возрасту

и весу, т.е. полученная когорта мышей будет неоднородной, что может исказить результаты исследований;

- в) отличия в гаплотипе мышей.

Проведенные нами исследования показали несоответствие заявленного в литературе гаплотипа базовых мышей действительности: наша линия CBA/C57Bl/6Y имеет гаплотип H2-K^{k/k}. Развитие отечественных лабораторий по производству трансгенных и нокаутных мышей открывает широкие возможности для создания биомodelей, отвечающих задачам конкретного исследования, а отсутствие карантина позволяет получать мышей в существенно более короткий срок и значительно снижает их себестоимость.

На сегодняшний день питомники и виварии предлагают широкий спектр модельных животных. Однако далеко не всегда эти животные удовлетворяют запросам экспериментаторов, которым либо приходится подстраиваться под имеющиеся линии, либо тратить деньги, время на поиск и доставку более подходящих моделей. Основной нашей концепцией является направленный дизайн генетических конструкций на основе химерных ДНК генов человека и мыши для последующей интеграции в геном мыши с целью получения новой гуманизированной трансгенной линии, т.е. мы переходим от случайного выбора или поиска животных к созданию адекватных и оптимальных линий под конкретные эксперименты.

Одним из наиболее востребованных и активно развивающихся направлений исследований являются изыскания в области иммунологии. С каждым годом количество известных болезней увеличивается, что влечёт за собой необходимость дизайна и апробации новых лекарственных препаратов и вакцин, разработку эффективных схем терапии. Создание адекватных моделей, отвечающих задачам конкретного исследования, является ключевым

этапом на пути создания нового препарата или вакцины.

В этой статье рассмотрен процесс создания генно-инженерной конструкции, кодирующей гибридную молекулу МНС I класса, состоящую из β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов HLA человека и $\alpha 3$ -домена мышиного комплекса H-2K. В данной работе впервые представлен дизайн молекулы, в составе которой находится человеческий β_2 -микроглобулин. Полученный вектор включает в себя β_2 -микроглобулин человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -домены HLA человека и $\alpha 3$ -домен мышиного комплекса H-2K (рис. 3). Для получения линейных фрагментов, пригодных для микроинъекций в пронуклеусы зигот, вектор был подвергнут рестрикции эндонуклеазами с последующим разделением полученных фрагментов методом гель-электрофореза. Выделенный из геля готовый линейный фрагмент будет в дальнейшем использован для получения линии гуманизированных трансгенных мышей.

НЦБМТ ФМБА России систематически занимается созданием моделей для оценки социально-значимых болезней человека [1, 7, 9]. Особую значимость данная работа приобретает в связи с пандемией COVID-19, когда необходимость в адекватных и современных биомоделях для фармакологической оценки новых лекарств очень велика. Получаемая модель несёт специфический вариант HLA, что позволит подробно изучить молекулярно-генетические механизмы воздействия лекарственных препаратов на русского человека. Использование модели предполагается для решения широкого круга задач, включая исследования

инфекционных заболеваний, разработку и тестирование вакцин, тестирование безопасности и иммуногенности, а также для исследований, направленных на изучение онкологических и аутоиммунных заболеваний. Модель позволяет идентифицировать эпитопы, ограниченные супертипом HLA-A*02:01:01:01.

Возможность редактирования генома открывает перед нами огромные возможности по созданию и изучению модельных животных, отвечающих задачам исследования. Использование гуманизированных трансгенных мышей позволяет моделировать с высокой степенью достоверности различные заболевания и иммунодефицитные состояния человека, что является очень ценным при апробации новых подходов в лечении тех или иных заболеваний и экстраполяции результатов исследований на человека. Созданная генно-инженерная конструкция является первым шагом на пути создания первой в своём роде линии гуманизированных трансгенных мышей, отражающей специфические особенности генотипа, характерные для русского населения. Авторы дают себе отчёт, что определение русского человека достаточно условно и выбранная аллель присутствует во многих популяциях. Однако собственные изыскания в области HLA-типирования позволяют утверждать, что аллель HLA*A02:01:01:01 в наибольшей степени соответствует русскому человеку, что определяет актуальность и целесообразность создания линии трансгенных гуманизированных мышей, несущих данную аллель гена человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Дуля М.С., Каркищенко В.Н., Хвостов Д.В., Агельдинов Р.А., Каркищенко Н.Н. Цитокиновый профиль лабораторных инбредных и трансгенных мышей в оценке иммунологического статуса и поиске новых фармакологических регуляторов. *Биомедицина*. 2019;15(2):54–62. [Dulya M.S., Karkischenko V.N., Khvostov D.V., Ageldinov R.A., Karkischenko N.N. Tsitokinovyy profil' laboratornykh inbrednykh i transgennykh myshey v otsenke immunologicheskogo statusa i poiske novykh farmakologicheskikh regulyatorov [Cytokine Profile of Laboratory Inbred and Transgenic Mice in the

- Evaluation of the Immunological Status and Search for New Pharmacological Regulators]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2019;15(2):54–62. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-15-2-54-62.
- Каркищенко В.Н., Болотских Л.А., Капанадзе Г.Д., Каркищенко Н.Н., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Матвеев Е.Л., Петрова Н.В., Рябых В.П., Ревякин А.О., Станкова Н.В., Семенов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabykh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov Kh.Kh. Sozdaniye liniy transgennykh zhivotnykh-modeley s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human genes NAT1 and NAT2]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
 - Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Скворцова В.И. Опиоидергическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма». *Биомедицина*. 2020;16(4):14–23. [Karkischenko V.N., Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. Opioidergicheskaya sistema immunnykh kletok: novaya farmakologicheskaya mishen' v terapii «tsitokinovogo shtorma» [The Opioidergic System of Immune Cells: A New Pharmacological Target in the Therapy of “Cytokine Storm”]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):14–23. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-14-23.
 - Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жуклова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Bolotskikh L.A., Semenov Kh.Kh., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Fiziologo-embriologicheskiye aspekty sozdaniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creating transgenic mice with integrated human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:52–65. (In Russian)].
 - Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Каркищенко Н.Н., Дуля М.С., Езерский В.А., Колоскова Е.М., Лазарев В.Н., Максименко С.В., Петрова Н.В., Столярова В.Н., Трубицына Т.П. Молекулярно-генетические аспекты технологии получения трансгенных мышей с интегрированными генами N-ацетилтрансферазы (NAT1 и NAT2) человека. *Биомедицина*. 2016;1:4–17. [Karkischenko V.N., Ryabykh V.P., Karkischenko N.N., Dulya M.S., Ezerskiy V.A., Koloskova E.M., Lazarev V.N., Maksimenko S.V., Petrova N.V., Stolyarova V.N., Trubitsyna T.P. Molekulyarno-geneticheskiye aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-acetyltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular and genetic aspects of the technology for producing transgenic mice with integrated genes of human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
 - Каркищенко Н.Н. *Альтернативы биомедицины. Т. 2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии*. М.: Изд-во ВПК, 2007:448. [Karkischenko N.N. *Alternativy biomeditsiny. T. 2. Klassika i alternativy farmakotoksikologii [Biomedicine alternatives. Vol. 2. Classics and alternatives of pharmacotoxicology]*. Moscow: Izdatel'stvo VPK, 2007:448. (In Russian)].
 - Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В. Высокоспецифичные видовые праймеры к генам Nat1 и Nat2 для сравнительных исследований у человека и лабораторных животных. *Биомедицина*. 2014;1(2):4–24. [Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V. Vysokospetsifichnyye vidovyye prajmery k genam Nat1 i Nat2 dlya sravnitel'nykh issledovaniy u cheloveka i laboratornykh zhivotnykh [Highly specific species primers for the Nat1 and Nat2 genes for comparative studies in humans and laboratory animals]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(2):4–24. (In Russian)].
 - Каркищенко Н.Н., Рябых В.П., Каркищенко В.Н., Колоскова Е.М. Создание гуманизированных мышей для фармакотоксикологических исследований (успехи, неудачи и перспективы). *Биомедицина*. 2014;1(3):4–22. [Karkischenko N.N., Ryabykh V.P., Karkischenko V.N., Koloskova E.M. Sozdanie gumanizirovannykh myshey dlya farmakotoksikologicheskikh issledovaniy (uspekhi, neudachi i perspektivy) [Creation of humanized mice for pharmacotoxicological research (successes, failures and prospects)]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2014;1(3):4–22. (In Russian)].
 - Помыткин И.А., Каркищенко В.Н., Фокин Ю.В., Нестеров М.С., Петрова Н.В. Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома. *Биомедицина*. 2020;16(4):24–33. [Pomytkin I.A., Karkischenko V.N., Fokin Yu.V., Nesterov M.S., Petrova N.V. Model' fatal'nogo ostrogo porazheniya legkikh i ostrogo respiratornogo distress-sindroma [A Model of Fatal Acute Lung Injury and Acute Respiratory Distress Syndrome]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2020;16(4):24–33. (In Russian). DOI: 10.33647/2074-5982-16-4-24-33.
 - Ali M.K., Shah D.J., del Rio C. Preparing Primary Care for COVID-20. *J. Gen Intern. Med.* 2020. DOI: 10.1007/s11606-020-05945-5.
 - Arnold B., Hämmerling G.J. MHC class-I transgenic mice. *Annu. Rev. Immunol.* 1991;9:297–322. DOI: 10.1146/annurev.iy.09.040191.001501.

12. Cohen J. The coronavirus may sometimes slip its genetic material into human chromosomes — but what does that mean? *Science*. 2020. DOI:10.1126/science.abg2000.
13. de Abreu M.S., Giacomini A.C.V., Genario R., Dos Santos B.E., da Rosa L.G., Demin K.A., et al. Neuropharmacology, pharmacogenetics and pharmacogenomics of aggression: The zebrafish model. *Pharmacol. Res.* 2019;141:602–608. DOI: 10.1016/j.phrs.2019.01.044.
14. Engelhard V.H., Lacy E., Ridge J.P. Influenza A-specific, HLA-A2.1 restricted cytotoxic T lymphocytes from HLA-A2.1 transgenic mice recognize fragments of the M1 protein. *J. Immunol.* 1991;146:1226–1232.
15. Gray S.J., Foti S.B., Schwartz J.W., Bachaboina L., Taylor-Blake B., Coleman J., et al. Optimizing promoters for recombinant adeno-associated virus-mediated gene expression in the peripheral and central nervous system using self-complementary vectors. *Hum. Gene Ther.* 2011;22(9):1143–1153. DOI: 10.1089/hum.2010.245.
16. Kuri-Cervantes L., Pampena M.B., Meng W., Rosenfeld A.M., Ittner C.A.G., Weisman A.R., et al. Comprehensive mapping of immune perturbations associated with severe COVID-19. *Sci. Immunol.* 2020;5(49):eabd7114. DOI: 10.1126/sciimmunol.abd7114.
17. Lee Y.B., Glover C.P., Cosgrave A.S., Bienemann A., Uney J.B. Optimizing regulatable gene expression using adenoviral vectors. *Exp. Physiol.* 2005;90(1):33–37. DOI: 10.1113/expphysiol.2004.028209.
18. Man S., Ridge J.P., Engelhard V.H. Diversity and dominance among TCR recognizing HLA-A2.1+ influenza matrix peptide in human MHC class I transgenic mice. *J. Immunol.* 1994;153(10):4458–4467.
19. Marshall S., Madabushi R., Manolis E., Krudys K., Staab A., Dykstra K., et al. Model-Informed Drug Discovery and Development: Current Industry Good Practice and Regulatory Expectations and Future Perspectives. *CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol.* 2019;8(2):87–96. DOI: 10.1002/psp4.12372.
20. Pascolo S., Bervas N., Ure J.M., Smith A.G., Lemonnier F.A., Pérarnau B. HLA-A2.1-restricted education and cytolytic activity of CD8(+) T lymphocytes from beta2 microglobulin (beta2m) HLA-A2.1 monochain transgenic H-2Db beta2m double knockout mice. *J. Exp. Med.* 1997;185(12):2043–2051. DOI: 10.1084/jem.185.12.2043.
21. Pérarnau B., Gillet A., Hakem R., Barad M., Lemonnier F.A. Human α_2 -microglobulin specifically enhances cell surface expression of HLA class I molecules in transfected murine cells. *J. Immunol.* 1988;141:1383–1389.
22. Phan V.H., Moore M.M., McLachlan A.J., Piquette-Miller M., Xu H., Clarke S.J. Ethnic differences in drug metabolism and toxicity from chemotherapy. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 2009;5(3):243–257. DOI: 10.1517/17425250902800153.
23. Pooladanda V., Thatikonda S., Godugu C. The current understanding and potential therapeutic options to combat COVID-19. *Life Sci.* 2020;254:117765.
24. Sontoredjo T.A., de Boer A., Maitland-van der Zee A.H. Etnische farmacogenetica [Ethnicity in pharmacogenetics]. *Ned Tijdschr Geneeskd.* 2013;157(17):A6118.
25. Takaki T., Marron M.P., Mathews C.E., Guttmann S.T., Bottino R., Trucco M., et al. HLA-A*0201-Restricted T Cells from Humanized NOD Mice Recognize Autoantigens of Potential Clinical Relevance to Type 1 Diabetes. *J. Immunol.* 2006;176:3257–3265.
26. Zhang L., Richards A., Khalil A., Wogram E., Ma H., Young R.A., et al. SARS-CoV-2 RNA reverse-transcribed and integrated into the human genome. *bioRxiv. The preprint server for biology.* 2020. DOI: 10.1101/2020.12.12.422516.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Владислав Николаевич, д.м.н., проф., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Петрова Наталья Владимировна*, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Савченко Елена Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: savelaine@gmail.com

Vladislav N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: scbmt@yandex.ru

Nataliya V. Petrova*, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: m-sklad@yandex.ru

Elena S. Savchenko, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: savelaine@gmail.com

Огнева Настасья Сергеевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., Всероссийский научно-исследовательский институт физиологии, биохимии и питания животных — филиал ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста»;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: vx136@rambler.ru

Манувера Валентин Александрович, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»;
e-mail: ymanuvera@yandex.ru

Бобровский Павел Александрович, ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»;
e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Лазарев Василий Николаевич, д.б.н., доц., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России»;
e-mail: lazar0@mail.ru

Nastasya S. Ogneva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ognevanastya@mail.ru

Elena M. Koloskova, Cand. Sci. (Biol.), All-Russian Research Institute of Physiology, Biochemistry and Animal Nutrition — branch of the Federal Scientific Centre of Animal Husbandry — All-Russian Institute of Animal Husbandry named after acad. L.K. Ernst;
e-mail: heleko3@yandex.ru

Sergey V. Maksimenko, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: vx136@rambler.ru

Valentin A. Manuvera, Cand. Sci. (Biol.), Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ymanuvera@yandex.ru

Pavel A. Bobrovsky, Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

Vassili N. Lazarev, Dr. Sci. (Biol.), Assoc. Prof., Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lazar0@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author