



ЭМБРИОЛОГИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ СОЗДАНИЯ НОВОЙ ГУМАНИЗИРОВАННОЙ ТРАНСГЕННОЙ ЛИНИИ МЫШЕЙ С ИНТЕГРИРОВАННЫМ ГЕНОМ ЧЕЛОВЕКА *HLA-A*02:01:01:01*

Е.С. Савченко*, Н.С. Огнева, Н.Н. Каркищенко

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

Накопление научных данных в области фармакогенетики требует создания адекватных релевантных биомоделей, отражающих иммуногенетические особенности отдельных групп населения. Нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* человека, характерный для населения России. Для создания новой биомодели был использован метод инъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот с последующим культивированием в CO₂-инкубаторе в течение ночи и переносом потенциально модифицированных эмбрионов на стадии двух бластомеров псевдобеременным самкам-реципиентам. Всего был получен и проанализирован 91 живой потомок, из которых 18 несли целевую модификацию генома. Полученные трансгенные животные были использованы для выведения новой линии животных-биомоделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* человека.

Ключевые слова: трансгеноз, трансплантация эмбрионов, липофекция, вирусная трансфекция, нуклеофекция, микроинъекции в пронуклеусы зигот

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках Государственного задания «Создание трансгенных гуманизированных биомоделей с интегрированными генами *HLA A*02:101* *βt* русского человека» (шифр: «Трансгеноз-2021»).

Для цитирования: Савченко Е.С., Огнева Н.С., Каркищенко Н.Н. Эмбриологические аспекты создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей с интегрированным геном человека *HLA-A*02:01:01:01*. *Биомедицина*. 2022;18(4):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-10-23>

Поступила 06.09.2022

Принята после доработки 07.11.2022

Опубликована 10.12.2022

EMBRYOLOGICAL ASPECTS OF CREATING A NEW HUMANIZED TRANSGENIC MOUSE LINE WITH AN INTEGRATED HUMAN GENE *HLA-A*02:01:01:01*

Elena S. Savchenko*, Nastasya S. Ogneva, Nikolay N. Karkischenko

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

The accumulation of scientific data in the field of pharmacogenetics requires the creation of adequate bio-models to reflect the immunogenetic characteristics of different population groups. We have obtained the ancestors of a new humanized transgenic mouse line carrying the human *HLA-A*02:01:01:01* gene, which is characteristic of the Russian population. The new biomodels was created using the pronuclei microinjection method of a linearized fragment of genetically engineered DNA construct into zygotes, followed by overnight cultivation in CO₂ incubator and transfer of potentially modified embryos at the stage of two

blastomere to pseudopregnant foster females. A total of 91 living offspring were obtained and analyzed, with 18 pups carrying the target genome modification. The resulting transgenic animals were used to create a new line of mouse biomodels carrying the human *HLA-A*02:01:01:01* gene.

Keywords: transgenesis, embryo transfer, lipofection, viral transfection, nucleofection, pronuclear microinjection

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

Funding: the work was carried out within the framework of the State assignment “Creation of transgenic humanized biomodels with integrated *HLA A*02:101 βt* genes of the Russian human” (code: “Transgenesis-2021”).

For citation: Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embryological aspects of creating a new humanized transgenic mouse line with an integrated human gene *HLA-A*02:01:01:01*. *Journal Biomed.* 2022;18(4):10–23. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-18-4-10-23>

Submitted 06.09.2022

Revised 07.11.2022

Published 10.12.2022

Введение

Современные биомедицинские исследования сложно представить вне контекста трансгенных животных. Организмы, генотип которых был искусственно отредактирован человеком, привнесшим в него новые гены и/или модификации уже существующих, позволяют исследователям создавать уникальные биомодели, демонстрирующие физиологические, биохимические, генетические или поведенческие особенности, характерные для конкретных патологических состояний [10, 29, 42, 57]. Создание биомоделей, максимально приближенных к реально наблюдаемой картине, способствует всестороннему детальному изучению патологии, что позволяет наметить пути и мишени для лечения или оптимизировать уже имеющиеся стратегии [14]. В ряде случаев, ввиду этических или прочих причин — например, в случае болезней человека — исследования на носителях заболевания невозможны, что тормозит прогресс создания эффективной терапии. Использование модифицированных клеточных линий [21] и гуманизированных трансгенных моделей, несущих гены человека, значительно упрощает и ускоряет процесс, позволяя получить интересные исследователей данные, что даёт

шансы на выживание людям, чьи болезни считались неизлечимыми [14].

Особую роль в патогенезе заболеваний играют гены главного комплекса гистосовместимости. Полиморфизм этих генов определяет возможности врождённого и адаптивного иммунитета человека. Многочисленные исследования, проведённые зарубежными и отечественными учёными, показали, что различные аллельные варианты генов главного комплекса гистосовместимости могут быть маркерами предрасположенности человека к определённым заболеваниям, либо, наоборот, оказывать протективный эффект. Сравнение частот встречаемости аллелей в популяциях и распространения заболеваний позволяет выявить возможные генетические кандидаты и лежащие в основе молекулярно-генетические механизмы заболеваний. Так, Л.П. Алексеевым с соавт. были проведены масштабные исследования в области иммуногенетики различных этнических групп населения России и близлежащих территорий, которые позволили по-новому взглянуть на прогнозирование развития и диагностику таких социально значимых заболеваний, как сахарный диабет 1-го типа и ВИЧ. Сравнительный анализ накопленных знаний по иммуногенетике и современные подходы к биомоделированию

дают исследователям мощный инструмент в создании терапии нового поколения: более избирательной, эффективной, персонализированной и безопасной.

Целью нашей работы стало создание адекватной биомодели, отражающей ключевые генетические особенности населения России. Анализ литературных данных показал, что наибольшая частота встречаемости характерна для аллели *HLA-A*02:01*. Более того, данная аллель широко представлена во многих популяциях (рис. 1), что увеличивает возможности её применения и позволяет экстраполировать полученные результаты на многие мировые сообщества. В России частота встречаемости может меняться в зависимости от региона, но, несмотря на значительные социальные, культурные и генетические отличия, характерные для регионов, данная аллель занимает лидирующие позиции при фенотипировании образцов крови. Наши собственные исследования совместно с НМИЦ гематологии подтвердили литературные данные, что доказывает необходимость создания трансгенных гуманизированных животных-моделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01*, и является важнейшим

этапом для выяснения особенностей иммуногенетических механизмов патологических процессов и эффектов лекарств.

На первом этапе нами была создана гено-инженерная конструкция (ГИК), линейаризованный фрагмент (рис. 2) которой предназначен для интеграции в геном мыши. ГИК кодирует гибридную молекулу МНС I класса, а также содержит ряд регуляторных элементов, обеспечивающих сильную и стабильную экспрессию трансгена во всех клетках организма-биомодели. В состав химерной молекулы входит несколько ключевых компонентов: домен $\alpha 3$ комплекса H2 мыши, основная функция которого — взаимодействие с антиген-распознающим рецептором цитотоксических лимфоцитов; $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -домены *HLA-A*02:01:01:01* человека, которые образуют антиген-связывающую область молекулы. В отличие от аналогичных конструкций, которые были ранее использованы в других лабораториях, комплекс стабилизируется молекулой β_2 -микроглобулина человека, который через глицин-сериновый линкер соединён с $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменами. Линкер необходим для того, чтобы комплекс стабилизировался именно человеческим β_2 -микроглобулином. Линейный фрагмент ГИК имеет липкие

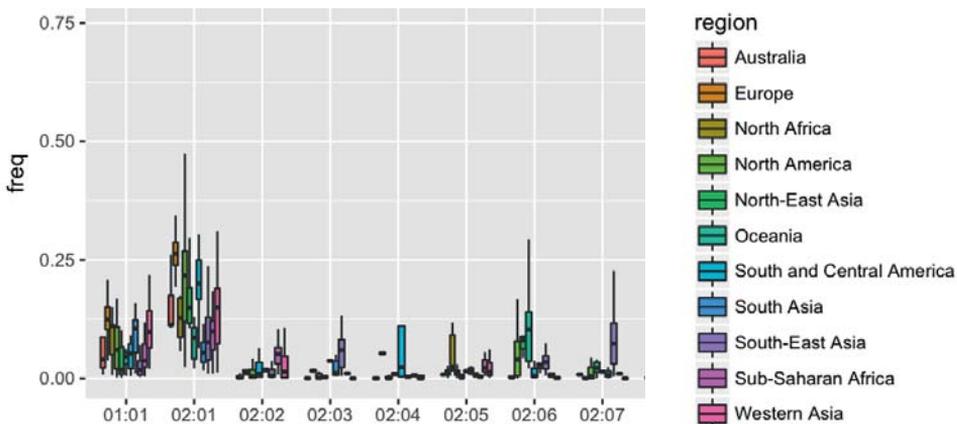


Рис. 1. Частоты распределения аллелей *HLA-A** в различных регионах мира [7].
 Fig. 1. *HLA-A** allele distribution frequencies in different world regions [7].

концы и может интегрироваться в геном по механизму негомологичного сшивания концов (NHEJ/illegitimate recombination) в ходе процесса репарации ДНК. При таком механизме интеграции встраивание трансгена происходит случайным образом в неопределённый участок генома.

Следующим этапом в процессе создания новой биомодели был выбор оптимального способа доставки редактирующего инструментария. На сегодняшний день наибольшее распространение получили четыре основных способа доставки: липофекция, вирусная трансфекция, нуклеофекция и микроинъекции в пронуклеусы зигот.

Липофекция — наиболее безопасный способ доставки, когда редактирующий инструментарий сам по себе или на специальном носителе (частицы и пр.) заключаются в липидную оболочку, которая затем сливается с цитоплазматической мембраной клетки. Возможность модифицировать липидную мембрану различными рецепторами позволяет адресно доставлять внутреннее содержимое конкретным клеткам-мишеням. Наиболее перспективным этот метод считается для адресной доставки лекарственных препаратов и генотерапии [16–18, 23], тогда как для создания трансгенных организмов применяется редко ввиду низкой эффективности. В области трансгенеза липофекция наибольшее применение получила для модификации генома сперматозоидов [9, 32].

Использование вирусов в качестве переносчиков позволяет более эффективно доставлять инструментарий в клетки, что нашло применение также в генотерапии [11, 34, 39, 40, 50, 60], доставке лекарственных агентов [51], создании вакцин нового поколения [24, 39, 45, 56, 60] и модификации различных клеточных культур [11]. За счёт сродства некоторых вирусов к определённым типам клеток возможна адресная доставка агентов к клеткам-мишеням и редактирование отдельных субпопуляций клеток в организме. В данном методе используется такая особенность вирусов, как возможность заражать клетку-хозяина, однако, в отличие от природных вирусов, искусственно собранные вирусы-переносчики не могут реплицироваться, поэтому их использование не влечёт за собой риски заражения для пациентов. Способность переносить редактирующий материал в клетку лентевирусами используется и для получения трансгенных организмов [43, 53].

Для *in vitro* редактирования клеточных культур часто применяются методы нуклеофекции, когда редактирующий агент доставляется в клетку через поры, образованные электрическим импульсом (электропорация). Метод позволяет получить большое количество модифицированных клеток, пригодных для дальнейших манипуляций, например, для редактирования конкретных клеточных линий [48] или вне-

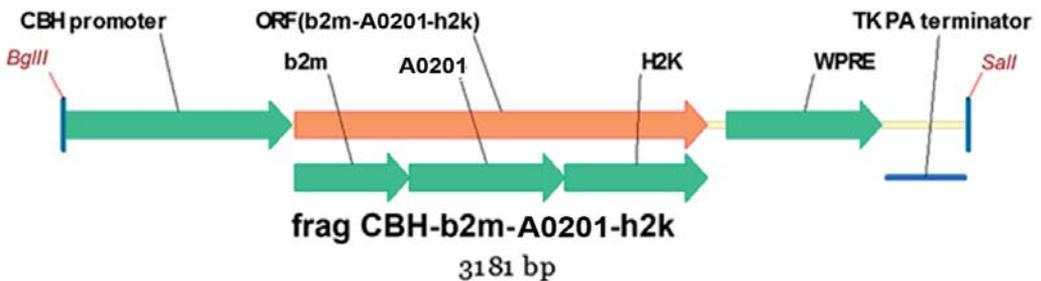


Рис. 2. Схема линейного фрагмента frag CBH-b2m_A0201-h2k ДНК, предназначенного для микроинъекций.
Fig. 2. Scheme of a linear DNA fragment frag CBH-b2m_A0201-h2k for microinjection.

сения изменений в геном стволовых клеток [12, 25], которые затем могут быть использованы при создании трансгенных организмов методом химер [15, 20, 28]. Химерные эмбрионы, содержащие два типа клеток — собственные и модифицированные, подсаживают реципиентам и затем анализируют полученное потомство. Метод позволяет с высокой эффективностью получать химер, однако для выведения линии, все клетки организма которой будут нести нужную модификацию, необходима длительная селекционная работа.

Наиболее широкое применение в области создания трансгенных организмов в настоящее время получил метод микроинъекций генетических конструкций в пронуклеус зиготы. Неоспоримыми достоинствами данного метода являются высокая эффективность редактирования и возможность получения трансгенного животного в одну стадию, что существенно упрощает процедуру и сокращает время на получение новой трансгенной линии. В совокупности с современными системами редактирования генома, метод получил широкое распространение для модификации генома разных видов животных и создания множества биомоделей [19, 31, 33, 36, 37, 41, 44, 52, 58, 59, 61]. Данный метод включает в себя четыре основных этапа: получение эмбрионов, проведение микроинъекций, трансплантация выживших потенциально модифицированных эмбрионов самкам-реципиентам и анализ полученного потомства и выявление особей, несущих искомую модификацию генома.

Учитывая особенности каждого из методов, для достижения нашей цели — получения новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущей ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, мы решили использовать последний — микроинъекции в пронуклеусы зигот. Несмотря на трудоёмкость метода, он обладает рядом существенных преимуществ, таких как возможность

непосредственного контроля концентрации и объёма вносимого инструментария, однозначное визуальное подтверждение его доставки в клетку, а также возможность изменять и адаптировать параметры проведения микроинъекций в ходе выполнения процедуры.

В данной статье мы подробно остановимся на втором этапе создания новой гуманизированной трансгенной линии мышей, а именно — на процессе получения родоначальников новой линии методом инъекции генно-инженерной конструкции в пронуклеусы зигот. Полученная мышьяная модель станет прекрасным решением для широкого спектра исследовательских задач, в т. ч. исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В эксперименте использовались самки гибридных мышей линии СВА/Лас × С57Bl/6 (F1) в возрасте 4-х недель (самки-доноры эмбрионов) и 1,5 мес. (самки-реципиенты), полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в системе ИВК при световом режиме 12/12, со свободным доступом к еде и воде.

Получение эмбрионов

Для вызывания суперовуляции самкам в возрасте 4 недели внутривбрюшинно вводили 5 МЕ гонадотропина сыворотки жеребой кобылы (Сергон, Чехия), а через 47–50 ч — 5 МЕ хорионического гонадотропина человека («Московский эндокринный завод», Россия) и подсаживали к плодовитым самцам на ночь. Утром отбирали самок с копулятивными пробками. Забой животных производили дислокацией шейных позвонков. Извлечение эмбрионов и проведение микроинъекций проводили в среде M2 («Sigma-Aldrich», США).

Микроинъекции генно-инженерной конструкции

Микроинъекции проводили на установке, включающей инвертированный микроскоп, оснащённый оптикой для контрастирования живых неокрашенных объектов (Nikon, объективы NAMC и DIC) и комплектом манипуляторов и автоматическим микроинжектором (Eppendorf). В эксперименте использованы самодельные стеклянные инструменты (пипетки для удерживания эмбрионов и иглы для микроинъекций). Линеаризованный фрагмент ДНК-конструкции, кодирующий гибридную молекулу МНС I класса (рис. 2), вводили в мужской пронуклеус зигот через микроиглу с внешним диаметром 1,5–2 мкм. Генно-инженерная конструкция содержалась в буфере TE для инъекций (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA, pH 7,4). Рабочая концентрация составляла 5–6 нг/мкл.

Культивирование эмбрионов

Зиготы, не разрушившиеся после микроинъекции, были поставлены на культивирование в среде M16 («Sigma Aldrich», США) в инкубатор с 5% CO₂ при постоянной температуре 37 °C на ночь. Для переноса реципиентам использовали только эмбрионы, которые успешно достигли стадии двух бластомеров.

Трансплантация эмбрионов

Для синхронизации цикла и получения достаточного количества особей, находящихся в подходящей фазе полового цикла (эструс), к моменту подсадки их к вазэктомизированным самцам самки-реципиенты также получали гормональные препараты по схеме, описанной выше, но, в отличие от доноров, получали сниженную дозировку препаратов (2,5 МЕ), чтобы избежать синдрома гиперстимуляции яичников и нарушений в функциональном слое эндометрия матки, которые значительно снижают возможность успешной имплантации и дальнейшего развития эмбрионов

[1]. Для трансплантации отбирали самок с копулятивными пробками, свидетельствующими об успешном покрытии вазэктомизированным самцом. Перенос эмбрионов осуществлялся на стадии двух бластомеров хирургическим методом в правый яйцевод наркотизированной самки-реципиента с помощью стеклянной пипетки. Трансплантация осуществлялась непосредственно в ампулу через прокол (стерильной иглой 29 G/30 G, между яичником и ампулой, в направлении ампулярной части яйцевода) или небольшой разрез стенки яйцевода (ножницы GILLS-VANNAS для капсулотомии, между яичником и ампулой, на небольшом удалении от ампулы). В одну самку переносилось 12–16 эмбрионов в минимальном количестве среды M2. Для анестезии использована комбинация препаратов Zoletyl 100 («Virbak», Франция) и Рометар («Bioveta», Чехия) из расчёта 25 мг/кг и 5 мг/кг соответственно. Для ускорения выхода животных из наркоза реципиентам сразу после трансплантации вводили Антиседан («Otion Pharma», Финляндия) из расчёта 0,5 мг/кг.

Верификация наличия целевой вставки

Анализ полученного потомства проводили через 21 день после рождения. Забор образцов тканей хвоста производили стерильными хирургическими инструментами. Верификацию наличия трансгена производили методом ПЦР в реальном времени с последующим подтверждением методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение

Получение эмбрионов

Выбранный нами метод получения родоначальников новой гуманизированной трансгенной линии мышей требует использования большого количества оплодотворённых яйцеклеток — зигот. Естественный эстральный цикл у мышей длится 4–5 дней, а в ходе одного цикла од-

новременно овулируют 5–10 яйцеклеток. Грамотное использование стимулирующих гормональных препаратов позволяет не только синхронизировать эстральные циклы самок, но и значительно увеличить число овулирующих за цикл фолликулов и сократить количество животных, вовлечённых в эксперимент. Нами была использована классическая схема с применением гонадотропина сыворотки жеребой кобылы и хорионического гонадотропина человека. В табл. 1 представлены результаты гормональной стимуляции самок-доноров по вышеописанной схеме.

Как видно из табл. 1, в среднем с одной гормонально подготовленной самки можно получить 25 морфологически нормальных зигот, пригодных для дальнейших манипуляций. Применение минимально эффективных доз препаратов позволяет нам избежать пагубного влияния гормонов на репродуктивный тракт животного [2], что может негативно отразиться на качестве получаемых эмбрионов и их потенциям к дальнейшему развитию.

Микроинъекции генно-инженерной конструкции

Полученные зиготы до процедуры микроинъекции культивировали в CO₂-инкубаторе в среде M16 («Sigma-Aldrich», США). Непосредственно перед процедурой эмбрионы отмывали в среде M2 («Sigma-Aldrich», США) и переносили в чашку Петри для ICSI. Количество вносимой

ДНК контролировали визуально по увеличению объёма мужского пронуклеуса. Зиготы, не разрушившиеся после микроинъекции, ставили на культивирование в CO₂-инкубатор на ночь. В табл. 2 представлены результаты микроинъекций, полученных от самок-доноров зигот.

Процедура микроинъекции достаточно травматична для развивающегося эмбриона, что требует от исследователя значительных навыков и аккуратности. Однако физико-химические факторы окружения, такие как температура, освещённость, влажность, pH среды и смеси для инъекций, качество минерального масла и пр., также способны повлиять на результат.

Одним из критических факторов, влияющим на жизнеспособность эмбрионов, является температура. Поддержание постоянной физиологической температуры среды для манипуляций обеспечивает нормальное функционирование клеточных систем развивающегося эмбриона вне репродуктивного тракта матери, поэтому процедуру необходимо проводить при постоянном внешнем подогреве. Значительные колебания этого параметра могут привести к серьёзным нарушениям внутриклеточного гомеостаза вплоть до остановки в развитии и гибели эмбриона.

Ещё одним фактором, определяющим успешность процедуры, является время проведения микроинъекции. На разных стадиях клеточного цикла активность фер-

Таблица 1. Результаты гормональной стимуляции самок-доноров зигот
Table 1. Results of hormonal stimulation of female zygote donors

Доноров использовано	Получено яйцеклеток			Среднее кол-во оплодотворённых яйцеклеток на самку
	Оплодотворённых	Неоплодотворённых	Брак	
48	1231	126	102	25,6

Таблица 2. Выживаемость эмбрионов после микроинъекции ГИК
Table 2. Embryo survival after DNA microinjection

Количество инъецированных зигот	Количество зигот, поставленных на культивирование	Выживаемость эмбрионов после микроинъекций, %
1231	825	67,02

ментов, отвечающих за репарацию повреждений, может существенно отличаться. Так, чем ближе фаза клеточного деления, тем ниже активность метаболических процессов в клетке, а, соответственно, эмбрион более уязвим для действия внешних факторов. Время играет ключевую роль не только в выживаемости эмбрионов после инъекции, но и в возникновении такого явления, как мозаицизм, когда полученный организм будет нести лишь часть клеток с отредактированным геномом. Мозаицизм широко распространён в живой природе, однако в случае получения трансгенных организмов методом инъекции ГИК в пронуклеус зиготы он является негативным побочным эффектом. Одной из причин возникновения этого явления принято считать позднее проведение микроинъекций, когда редактирующий инструментарий не успевает внести изменения в геном реципиента до первого деления клетки и сохраняется на более поздних стадиях развития, неравномерно распределяясь между бластомерами и выборочно редактируя геном некоторых из них.

Культивирование эмбрионов

В нашем исследовании мы использовали метод асинхронного переноса эмбрионов на стадии двух бластомеров (1-й день беременности) в яйцевод самок-реципиентов 0-го дня беременности. *In vitro* культивирование эмбрионов проводили в среде M16 («Sigma-Aldrich», США) под минеральным маслом в CO₂-инкубаторе в течение ночи (табл. 3). На утро для переноса отбирали только эмбрионы, успешно достигшие стадии двух бластомеров.

Использование метода асинхронного переноса позволило нам решить две важней-

шие задачи. Во-первых, культивирование в течение ночи позволяет отсеять эмбрионы, нежизнеспособные или со сниженным потенциалом к развитию, тем самым повысить качество переносимых эмбрионов. Во-вторых, асинхронный перенос даёт развивающемуся эмбриону дополнительные сутки на удвоение клеточного состава blastocysts, что, с одной стороны, повышает её шансы на успешную интеграцию в эндометрий матки, а с другой стороны, позволяет не пропустить окно имплантации, когда матка рецептивна и готова принять эмбрион [2].

Трансплантация эмбрионов

В табл. 4 представлены результаты переноса потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременных самок-реципиентов.

В данной работе мы использовали модифицированный метод переноса эмбрионов через прокол/разрез стенки яйцевода непосредственно в ампулу. Ретроспективный анализ данных, полученных в нашей лаборатории по трансплантации эмбрионов разными методами, показал, что модификация способа переноса эмбрионов может оказывать непосредственное влияние на результаты эмбриотрансфера [6]. Выбранный нами метод, в отличие от классического переноса в воронку яйцевода, связан с меньшим хирургическим вмешательством, и, соответственно, со снижением дискомфорта реципиентов и вероятности развития негативных побочных эффектов (кровотечение, воспалительный процесс, нарушения поведения и пр. [22, 26, 27, 30, 35, 38, 47]) как во время, так и после операции, что соответствует современным стандартам GLP (Good Laboratory Practice) и концепции 3R

Таблица 3. Культивирование эмбрионов после микроинъекций ГИК
Table 3. Embryos cultivation after DNA microinjection

Количество зигот, поставленных на культивирование	Количество зигот, успешно достигших стадии двух бластомеров	Уровень дробления, %
825	714	86,6

Таблица 4. Результаты трансплантации эмбрионов псевдобеременным самкам-реципиентам
Table 4. Results of embryo transfer to pseudopregnant foster females

Уровень беременности (количество родивших реципиентов/количество реципиентов, взятых на трансплантацию)	Выживаемость потомства (количество выживших мышат/количество рождённых мышат)	Среднее количество потомков на самку (количество рождённых мышат/количество родивших реципиентов)	Среднее количество живых потомков на самку (количество рождённых живых мышат/количество родивших реципиентов)	Общий уровень рождаемости (количество живых мышат/всего трансплантировано всем реципиентам эмбрионов)	Уровень рождаемости среди беременных реципиентов (количество живых мышат/всего трансплантировано эмбрионов беременным самкам)
63,04% (29/46)	88,3% (91/103)	3,55 (103/29)	3,12 (91/29)	12,8% (91/714)	20,45% (91/445)

[46]. Высокие показатели [6, 49] уровней беременности и рождаемости подтверждают целесообразность применения данного метода.

Анализ полученного потомства

Нами было получено 103 потомка, 91 из которых успешно достигли половозрелого состояния. Смертность потомства, как правило, наблюдалась в небольших помётах (1, редко — 2 мышонка) в первые дни постнатального развития вследствие каннибализма. В среднем, размер помёта составил 3–4 мышонка. После достижения возраста 3-х недель пробы тканей хвоста полученного потомства анализировали методом ПЦР в реальном времени с последующим подтверждением методом секвенирования по Сэнгеру. Из 91-й пробы 18 были подтверждены как положительные на присутствие целевой вставки — трансгена *HLA-A*02:01:01:01*, эффективность трансгенеза составила 19,7%. Соотношение полов среди трансгенных особей составило 1:1 (9 самцов и 9 самок). Полученные родоначальники (F0) новой гуманизированной трансгенной линии мышей, несущие ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, были переданы сотрудникам вивария для проведения селекционной работы и выведения чистой линии.

Заключение

Таким образом, нами были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущие ген *HLA-A*02:01:01:01* чело-

века, методом микроинъекции генетической конструкции в пронуклеусы зигот. Полученные животные экспрессируют на поверхности клеток гибридную молекулу МНС I класса, состоящую из β_2 -микроглобулина человека, $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов HLA человека и $\alpha 3$ -домена комплекса H-2K мыши.

На сегодняшний день в НЦБМТ ФМБА России накоплен огромный опыт по созданию и поддержанию различных гуманизированных трансгенных биомоделей [3–5], несущих в т.ч. гены N-ацетилтрансферазы (*NAT1/NAT2*), ангиотензин-превращающего фермента 2 (*ACE2*) и человеческого лейкоцитарного антигена (*HLA*). Центр является одним из немногих в России, где возможна реализация полного цикла создания новой трансгенной биомодели — от разработки генно-инженерной конструкции до получения чистой линии и тестирования релевантности биомодели. Собственные исследования и ретроспективный анализ полученных данных позволяют нам совершенствовать операционные протоколы, что положительно сказывается не только на эффективности выполнения поставленных задач, но также соответствует современным тенденциям в области взаимодействия исследователей и лабораторных животных.

Созданная нами гуманизированная трансгенная биомодель, несущая ген человека *HLA-A*02:01:01:01*, является одной из базовых линий, которые наиболее ча-

сто используются для решения широкого круга задач, в частности, фармакогенетических исследований лекарственных препаратов и эффектов противоопухолевой терапии, а также изучения иммуногенетических механизмов защиты организма [8, 54, 55]. Также было показано, что антигенные эпитопы, имеющие высокое сродство для данной аллели, способны инициировать иммунный Т-клеточный ответ, схожий с реакцией на проникновение SARS-CoV-2, что может служить отправной точкой при разработке эффективной терапии новой коронавирусной инфекции и создании вакцин нового поколения [13]. Доминирующая роль аллели HLA-A*02:01 во многих мировых сообществах [7, 55], в т.ч. и в России, делает данную биомодель притягательным инструментом, позволяющим всесторонне изучить особенности иммунного ответа и возможные побочные эффекты, а также

составить достоверный прогноз возможности применения одной и той же терапии у различных групп населения.

Однако ключевой особенностью созданной нами биомодели является то, что экспрессирующаяся на поверхности клеток химерная молекула МНС I класса, в отличие от аналогичных моделей, стабилизируется β_2 -микроглобулином человека. Такой новаторский подход к дизайну конструкции позволил нам получить уникальную модель, которая ещё более приближена к человеку, а, значит, точнее воспроизводит особенности генетических механизмов иммунного ответа.

Полученные нами родоначальники (F0) новой гуманизированной трансгенной линии переданы сотрудникам вивария для выведения чистой линии животных-биомоделей, несущих ген HLA-A*02:01:01:01 человека.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Айзятуллова Э.М., Носенко Е.Н., Волина В.В., Смолянинова Е.И., Айзятуллова Д.Р., Овсяник М.А. Динамика изменений в эндометрии и миометрии маток мышей при экспериментальном моделировании синдрома гиперстимуляции яичников и влияние на них терлипессина. *Архив клинической и экспериментальной медицины*. 2014;23(2):144–148. [Ayzyatulova E.M., Nosenko E.N., Volina V.V., Smolyaninova E.I., Ayzyatulova D.R., Ovsyanik M.A. Dinamika izmeneniy v endometrii i miometrii matok myshey pri eksperimental'nom modelirovanii sindroma giperstimulyatsii yaichnikov i vliyaniye na nikh terlipressina [Dynamics of changes in the endometrium and myometrium of the uterus of mice in experimental modeling of ovarian hyperstimulation syndrome and the effect of terlipressin on them]. *Arkhiv klinicheskoy i eksperimental'noy meditsiny* [Archive of Clinical and Experimental Medicine]. 2014;23(2):144–148. (In Russian)].
2. Вагина И.Н., Евсиков С.В., Соломко А.П. Факторы, определяющие готовность бластоцист мышей к имплантации. *Биополимеры и клетка*. 1997;13(2):161–167. [Vagina I.N., Evsikov S.V., Solomko A.P. Faktory, opredelyayushchie gotovnost' blastotsist myshey k implantatsii [Factors determining the readiness of mouse blastocysts for implantation]. *Biopolimery i kletka* [Biopolymers and the cell]. 1997;13(2):161–167. (In Russian)].
3. 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., Семёнов Х.Х. Создание линий трансгенных животных-моделей с генами человека NAT1 и NAT2. *Биомедицина*. 2016;1:74–84. [Karkischenko V.N., Bolotskih L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabyh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdaniye liniy transgennykh zhivotnykh-modeley s genami cheloveka NAT1 i NAT2 [Creation of lines of transgenic animal models with human NAT1 and NAT2 genes]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2016;1:74–84. (In Russian)].
4. Каркищенко В.Н., Рябых В.П., Болотских Л.А., Семенов Х.Х., Капанадзе Г.Д., Петрова Н.В., Езерский В.А., Жукова О.Б., Колоскова Е.М., Максименко С.В., Столярова В.Н., Трубицина Т.П. Физиолого-эмбриологические аспекты создания трансгенных мышей с интегрированными генами NAT1 и NAT2 человека. *Биомедицина*. 2016;1:52–65. [Karkischenko V.N., Ryabyh V.P., Bolotskih L.A., Semenov H.H., Kapanadze G.D., Petrova N.V., Ezerskiy V.A., Zhukova O.B., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Stolyarova V.N., Trubicina T.P. Fiziologo-embriologicheskie aspekty sozdaniya trans-

- gennykh myshey s integrirovannymi genami NAT1 i NAT2 cheloveka [Physiological and embryological aspects of creation of 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., Трубицина 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., Trubicina T.P. Molekulyarno-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (NAT1 i NAT2) cheloveka [Molecular genetic aspects of the technology for obtaining transgenic mice with integrated human N-acetyltransferase (NAT1 and NAT2) genes]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2016;1:4–17. (In Russian)].
 - Савченко Е.С., Огнева Н.С., Максименко С.В., Жукова О.Б. Сравнение способов хирургической трансплантации эмбрионов мыши псевдобеременным самкам-реципиентам. *Биомедицина*. 2021;3E:80–88. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Maksimenko S.V., Zhukova O.B. Sravnenie sposobov khirurgicheskoy transplantatsii embrionov myshi psevdoberemennym samkam-retsipientam [Comparison of surgical transfer of mouse embryos to pseudo-pregnant female recipients]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2021;3E:80–88. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-80-88.
 - <http://www.allelefrequencies.net/hla.asp>
 - Bai J., Wang J., Yang Y., Wang F., He A., Zhang W. Identification of HLA-A*0201-restricted CTL epitopes for MLAA-34-specific immunotherapy for acute monocytic leukemia. *J. Immunother.* 2021;44(4):141–150. DOI: 10.1097/CJI.0000000000000350.
 - Ball B.A., Sabeur K., Allen W.R. Liposome-mediated uptake of exogenous DNA by equine spermatozoa and applications in sperm-mediated gene transfer. *Equine Vet. J.* 2008;40(1):76–82. DOI: 10.2746/042516407X235786.
 - Beckford-Vera D.R., Gonzalez-Junca A., Janneck J.S., Huynh T.L., Blecha J.E., Seo Y., Li X., VanBrocklin H.F., Franc B.L. PET/CT imaging of human TNF α using [⁸⁹Zr]certolizumab pegol in a transgenic preclinical model of rheumatoid arthritis. *Mol. Imaging Biol.* 2020;22(1):105–114. DOI: 10.1007/s11307-019-01363-0.
 - Chahal P.S., Schulze E., Tran R., Montes J., Kamen A.A. Production of adeno-associated virus (AAV) serotypes by transient transfection of HEK293 cell suspension cultures for gene delivery. *J. Virol. Methods.* 2014;196:163–173. DOI: 10.1016/j.jviromet.2013.10.038.
 - Chatterjee P., Cheung Y., Liew C. Transfecting and nucleofecting human induced pluripotent stem cells. *J. Vis. Exp.* 2011;(56):3110. DOI: 10.3791/3110.
 - Chen Z., Ruan P., Wang L., Nie X., Ma X., Tan Y. T and B cell epitope analysis of SARS-CoV-2 S protein based on immunoinformatics and experimental research. *J. Cell Mol. Med.* 2021;25(2):1274–1289. DOI: 10.1111/jcmm.16200.
 - Chu M.L., Moran E. The limb-girdle muscular dystrophies: Is treatment on the horizon? *Neurotherapeutics.* 2018;15(4):849–862. DOI: 10.1007/s13311-018-0648-x.
 - Coward K., Kubota H., Parrington J. In vivo gene transfer into testis and sperm: Developments and future application. *Arch. Androl.* 2007;53(4):187–197. DOI: 10.1080/01485010701426455.
 - Dass C.R. Biochemical and biophysical characteristics of lipoplexes pertinent to solid tumour gene therapy. *Int. J. Pharm.* 2002;241(1):1–25. DOI: 10.1016/S0378-5173(02)00194-1.
 - Dass C.R., Burton M.A. Lipoplexes and tumours. A review. *J. Pharmacol.* 1999;51(7):755–770. DOI: 10.1211/0022357991773113.
 - Dass C.R., Su T. Delivery of lipoplexes for gene therapy of solid tumours: Role of vascular endothelial cells. *J. Pharmacol.* 2000;52(11):1301–1317. DOI: 10.1211/0022357001777450.
 - Dong Zh., Dong X., Jia W., Cao Sh., Zhao Q. Improving the efficiency for generation of genome-edited zebrafish by labeling primordial germ cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014; 55:329–334. DOI: 10.1016/j.biocel.2014.08.020.
 - Du Y., Xie W., Zhang F., Liu C. Chimeric mouse generation by ES cell blastocyst microinjection and uterine transfer. *Methods Mol. Biol.* 2019;1874:99–114. DOI: 10.1007/978-1-4939-8831-0_6.
 - Fan D., Liu T., Li C., Jiao B., Li S., Hou Y., Luo K. Efficient CRISPR/Cas9-mediated targeted mutagenesis in populus in the first generation. *Sci. Rep.* 2015;5:12217. DOI: 10.1038/srep12217.
 - Gaertner D., Hallman T., Hankenson F., Batchelder M. Anesthesia and analgesia in rodents. In: Fish R., Brown M., Danneman P., Karas A., ed. *Anesthesia and analgesia in laboratory animals*. 2nd ed. London, UK: Academic, 2011:239–282.
 - Gao X., Huang L. Cationic liposome-mediated gene transfer. *Gene Ther.* 1995;2(10):710–722.
 - Hensel J.A., Khattar V., Ashton R., Ponnazhagan S. Recombinant AAV-CEA tumor vaccine in combination with an immune adjuvant breaks tolerance and provides protective immunity. *Mol. Ther. Oncolytics.* 2018;12:41–48. DOI: 10.1016/j.omto.2018.12.004.
 - Hohenstein K.A., Pyle A.D., Chern J.Y., Lock L.F., Donovan P.J. Nucleofection mediates high-efficiency stable gene knockdown and transgene ex-

- pression in human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2008;26(6):1436–1443. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0857.
26. Koblischke P., Kindahl H., Budik S., Aurich J., Palm F., Walter I., Kolodziejek J., Nowotny N., Hoppen H.O., Aurich C. Embryo transfer induces a subclinical endometritis in recipient mares which can be prevented by treatment with non-steroid anti-inflammatory drugs. *Theriogenology*. 2008;70(7):1147–1158. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.06.037.
27. Lamas S., Franquinho F., Morgado M., Mesquita J.R., Gärtner F., Amorim I. C57BL/6J and B6129F1 embryo transfer: Unilateral and bilateral transfer, embryo number and recipient female background control for the optimization of embryo survival and litter size. *Animals (Basel)*. 2020;10(8):1424. DOI: 10.3390/ani10081424.
28. Larson M.A. Blastocyst microinjection with embryonic stem cells. *Methods Mol. Biol.* 2020;2066:83–88. DOI: 10.1007/978-1-4939-9837-1_6.
29. Levedakou E.N., Popko B. Rewiring enervated: Thinking LARGER than myodystrophy. *J. Neurosci. Res.* 2006;84(2):237–243. DOI: 10.1002/jnr.20896.
30. Lerch S., Tolksdorf G., Schütz P., Brandwein C., Dormann C., Gass P., Chourbaji S. Effects of embryo transfer on emotional behaviors in C57BL/6 mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2016;55(5):510–519.
31. Lin C.Y., Su Y.H. Genome editing in sea urchin embryos by using a CRISPR/Cas9 system. *Dev. Biol.* 2016;409(2):420–428. DOI: 10.1016/j.ydbio.2015.11.018.
32. Lotti S.N., Polkoff K.M., Rubessa M., Wheeler M.B. Modification of the genome of domestic animals. *Anim. Biotechnol.* 2017;28(3):198–210. DOI: 10.1080/10495398.2016.1261874.
33. Ma X., Zhang Q., Zhu Q., Liu W., Chen Y., Qiu R., Wang B., Yang Zh., Li H., Lin Y., Xie Y., Shen R., Chen Sh., Wang Z., Chen Y., Guo J., Chen L., Zhao X., Dong Zh., Liu Y.-G. A robust CRISPR/Cas9 system for convenient, high-efficiency multiplex genome editing in monocot and dicot plants. *Mol. Plant*. 2015; 8(8): 1274–1284. DOI: 10.1016/j.molp.2015.04.007.
34. Madrigal J.L., Shams S., Stilhano R.S., Silva E.A. Characterizing the encapsulation and release of lentivectors and adeno-associated vectors from degradable alginate hydrogels. *Biomater. Sci.* 2019;7(2):645–656. DOI: 10.1039/c8bm01218k.
35. Mahabir E., Volland R., Landsberger A., Manz S., Na E., Urban I., Michel G. Reproductive performance after unilateral or bilateral oviduct transfer of 2-cell embryos in mice. *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 2018;57(2):110–114.
36. Mianné J., Codner G.F., Caulder A., Fell R., Hutchison M., King R., Stewart M.E., Wells S., Teboul L. Analysing the outcome of CRISPR-aided genome editing in embryos: Screening, genotyping and quality control. *Methods*. 2017;121–122:68–76. DOI: 10.1016/j.jymeth.2017.03.016.
37. Mizuno S., Dinh T.T.H., Kato K., Mizuno-Iijima S., Tanimoto Y., Daitoku Y., Hoshino Y., Ikawa M., Takahashi S., Sugiyama F., Yagami K. Simple generation of albino C57BL/6J mice with G291T mutation in the tyrosinase gene by the CRISPR/Cas9 system. *Mamm. Genome*. 2014;25(7–8):327–334. DOI: 10.1007/s00335-014-9524-0.
38. Munné S., Alikani M., Tomkin G., Grifo J., Cohen J. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil. Steril.* 1995;64(2):382–391.
39. Nidetz N.F., McGee M.C., Tse L.V., Li C., Cong L., Li Y., Huang W. Adeno-associated viral vector-mediated immune responses: Understanding barriers to gene delivery. *Pharmacol. Ther.* 2020;207:107453. DOI: 10.1016/j.pharmthera.2019.107453.
40. Ochakovski G.A., Bartz-Schmidt K.U., Fischer M.D. Retinal gene therapy: Surgical vector delivery in the translation to clinical trials. *Front Neurosci.* 2017;11:174. DOI: 10.3389/fnins.2017.00174.
41. Oliver D., Yuan S., McSwiggan H., Yan W. Pervasive genotypic mosaicism in founder mice derived from genome editing through pronuclear injection. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0129457. DOI: 10.1371/journal.pone.0129457.
42. Paquet D., Kwart D., Chen A., Sproul A., Jacob S., Teo S., Olsen K.M., Gregg A., Noggle S., Tessier-Lavigne M. Efficient introduction of specific homozygous and heterozygous mutations using CRISPR/Cas9. *Nature*. 2016;533(7601):125–129. DOI: 10.1038/nature17664.
43. Park F. Lentiviral vectors: Are they the future of animal transgenesis? *Physiol. Genomics*. 2007;31(2):159–173. DOI: 10.1152/physiolgenomics.00069.2007.
44. Qin W., Dion S.L., Kutny P.M., Zhang Y., Cheng A.W., Jillette N.L., Malhotra A., Geurts A.M., Chen Y.G., Wang H. Efficient CRISPR/Cas9-mediated genome editing in mice by zygote electroporation of nuclease. *Genetics*. 2015;200(2):423–430. DOI: 10.1534/genetics.115.176594.
45. Rghei A.D., van Lieshout L.P., Santry L.A., Guilleman M.M., Thomas S.P., Susta L., Karimi K., Bridle B.W., Wootton S.K. AAV vectored immunoprophylaxis for filovirus infections. *Trop. Med. Infect. Dis.* 2020;5(4):169. DOI: 10.3390/tropicalmed5040169.
46. Russell W.M.S., Burch R.L. *The principles of humane experimental technique*. London: Methuen & Co Ltd., 1959: 238.
47. Sarvari A., Naderi M.M., Sadeghi M.R., Akhondi M.M. A technique for facile and precise transfer of mouse embryos. *Avicenna J. Med. Biotechnol.* 2013;5(1):62–65.
48. Scherer O., Maeß M.B., Lindner S., Garscha U., Weinigel C., Rummeler S., Werz O., Lorkowski S. A procedure for efficient non-viral siRNA transfection of primary human monocytes using nucleofec-

- tion. *J. Immunol. Methods*. 2015;422:118–124. DOI: 10.1016/j.jim.2015.04.007.
49. Schlapp G., Goyeneche L., Fernández G., Menchaca A., Crispo M. Administration of the nonsteroidal anti-inflammatory drug tolfenamic acid at embryo transfer improves maintenance of pregnancy and embryo survival in recipient mice. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2015;32(2):271–275. DOI: 10.1007/s10815-014-0378-x.
50. Schnabolk G., Parsons N., Obert E., Annamalai B., Nasarre C., Tomlinson S., Lewin A.S., Rohrer B. Delivery of CR2-fH using AAV vector therapy as treatment strategy in the mouse model of choroidal neovascularization. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2017;9:1–11. DOI: 10.1016/j.omtm.2017.11.003.
51. Shih C.S., Laurie N., Holzmacher J., Spence Y., Nathwani A.C., Davidoff A.M., Dyer M.A. AAV-mediated local delivery of interferon-beta for the treatment of retinoblastoma in preclinical models. *Neuromolecular Med.* 2009;11(1):43–52. DOI: 10.1007/s12017-009-8059-0.
52. Singh P., Schimenti J.C., Bolcun-Filas E. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications. *Genetics*. 2015;199(1):1–15. DOI: 10.1534/genetics.114.169771.
53. Tesson L., Cozzi J., Ménoret S., Rémy S., Usal C., Fraichard A., Anegon I. Transgenic modifications of the rat genome. *Transgenic Res.* 2005;14(5):531–546. DOI: 10.1007/s11248-005-5077-z.
54. Thomas R., Shaath H., Naik A., Toor S.M., Elford E., Decock J. Identification of two HLA-A*0201 immunogenic epitopes of lactate dehydrogenase C (LDHC): Potential novel targets for cancer immunotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 2020;69(3):449–463. DOI: 10.1007/s00262-020-02480-4.
55. Valkenburg S.A., Josephs T.M., Clemens E.B., Grant E.J., Nguyen T.H., Wang G.C., Price D.A., Miller A., Tong S.Y., Thomas P.G., Doherty P.C., Rossjohn J., Gras S., Kedzińska K. Molecular basis for universal HLA-A*0201-restricted CD8+ T-cell immunity against influenza viruses. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2016;113(16):4440–4445. DOI: 10.1073/pnas.1603106113.
56. van den Berg F.T., Makoah N.A., Ali S.A., Scott T.A., Mapengo R.E., Mutsunguma L.Z., Mkhize N.N., Lambson B.E., Kgagudi P.D., Crowther C., Abdool Karim S.S., Balazs A.B., Weinberg M.S., Ely A., Arbuthnot P.B., Morris L. AAV-mediated expression of broadly neutralizing and vaccine-like antibodies targeting the HIV-1 envelope V2 region. *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019;14:100–112. DOI: 10.1016/j.omtm.2019.06.002.
57. van Vuuren A.J., van Roon J.A., Walraven V., Stuij I., Harmsen M.C., McLaughlin P.M., van de Winkel J.G., Thepen T. CD64-directed immunotoxin inhibits arthritis in a novel CD64 transgenic rat model. *J. Immunol.* 2006;176(10):5833–5838. DOI: 10.4049/jimmunol.176.10.5833.
58. Varshney G.K., Pei W., LaFave M.C., Idol J., Xu L., Gallardo V., Carrington B., Bishop K., Jones M., Li M., Harper U., Huang S.C., Prakash A., Chen W., Sood R., Ledin J., Burgess S.M. High-throughput gene targeting and phenotyping in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Genome Res.* 2015;25(7):1030–1042. DOI: 10.1101/gr.186379.114.
59. Wang X., Yu H., Lei A., Zhou J., Zeng W., Zhu H., Dong Z., Niu Y., Shi B., Cai B., Liu J., Huang S., Yan H., Zhao X., Zhou G., He X., Chen X., Yang Y., Jiang Y., Shi L., Tian X., Wang Y., Ma B., Huang X., Qu L., Chen Y. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 2015;5:13878. DOI: 10.1038/srep13878.
60. Zabaleta N., Dai W., Bhatt U., Chichester J.A., Sanmiguel J., Estelien R., Michalson K.T., Diop C., Maciorowski D., Qi W., Hudspeth E., Cucalon A., Dyer C.D., Pampena M.B., Knox J.J., LaRocque R.C., Charles R.C., Li D., Kim M., Sheridan A., Storm N., Johnson R.I., Feldman J., Hauser B.M., Zinn E., Ryan A., Kobayashi D.T., Chauhan R., McGlynn M., Ryan E.T., Schmidt A.G., Price B., Honko A., Griffiths A., Yaghmour S., Hodge R., Betts M.R., Freeman M.W., Wilson J.M., Vandenbergh L.H. Immunogenicity of an AAV-based, room-temperature stable, single dose COVID-19 vaccine in mice and non-human primates. *bioRxiv [Preprint]*. 2021; 2021.01.05.422952. DOI: 10.1101/2021.01.05.422952.
61. Zhang W.W., Matlashewski G. CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania donovani*. *MBio*. 2015;6(4):e00861. DOI: 10.1128/mBio.00861-15.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

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

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

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н.,
проф., чл.-корр. РАН, акад. РАН, ФГБУН «Науч-
ный центр биомедицинских технологий ФМБА
России»;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof.,
Corr. Member of the Russian Academy of Sciences,
Acad. of the Russian Academy of Rocket and
Artillery Sciences, Scientific Center of Biomedical
Technologies of the Federal Medical and Biological
Agency of Russia;

e-mail: niknik2808@yandex.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author