

ПРИНЦИПЫ СОЗДАНИЯ ГЕННО-ИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ, НЕСУЩИХ ГЕН *HLA-C*07:02:01:01*, КАК ПРООБРАЗ ИННОВАЦИОННЫХ ТРАНСГЕННО-НОКАУТНЫХ БИОМОДЕЛЕЙ

Н.Н. Каркищенко¹, В.Н. Лазарев², В.А. Манувера², П.А. Бобровский²,
Н.В. Петрова^{1,*}, Е.М. Колоскова³, Е.С. Глотова¹

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

² ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины
имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России»
119435, Российская Федерация, Москва, Малая Пироговская ул., 1а

³ 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

Генетические отличия у представителей разных популяций оказывают влияние на механизм и эффективность лекарственных препаратов. Биомодели, учитывающие особенности генетического полиморфизма разных людей, позволяют полнее исследовать молекулярно-генетические механизмы действия фармакологических средств, включая иммунобиологические. Была создана рекомбинантная ДНК, кодирующая гибридный белок класса I МНС, содержащий В2-микроглобулин человека, слитый с антигенпрезентирующими доменами ($\alpha 1$ - и $\alpha 2$ -домены) молекулы *HLA-C*07:02:01:01*, и $\alpha 3$ -домен H2-комплекса мыши. Очищенный линейаризованный фрагмент ДНК, содержащий целевую конструкцию, фланкированный регуляторными фрагментами, обеспечивающими его стабильную транскрипцию, использован для получения новой линии гуманизированных трансгенных мышей. Принципы конструирования гуманизированных трансгенных мышей путем кодирования химерного белка МНС класса I, содержащего антигенпрезентирующие домены *HLA-C*07:02:01:01*, аналогичны таковым при получении мышей гуманизированных трансгенных линий *HLA-A*02:01:01:01* и *HLA-B*18:01:01:02*. Данные трансгенные линии лабораторных мышей являются самостоятельными биомоделями, а также используются в качестве базовых линий для получения на их основе соответствующих трансгенно-нокаутных линий.

Ключевые слова: генетическая конструкция, *HLA-C*07:02:01:01*, трансгеноз, гуманизированные трансгенные мыши

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУН НЦБМТ ФМБА России по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*pX* человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024»).

Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Лазарев В.Н., Манувера В.А., Бобровский П.А., Петрова Н.В., Колоскова Е.М., Глотова Е.С. Принципы создания генно-инженерной конструкции для получения гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-C*07:02:01:01*, как прообраз инновационных трансгенно-нокаутных биомоделей. *Биомедицина*. 2024;20(1):8–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-1-8-20>

Поступила 15.01.2024

Принята после доработки 12.02.2024

Опубликована 10.03.2024

PRINCIPLES OF CREATION OF A GENETIC ENGINEERING CONSTRUCTION FOR OBTAINING HUMANIZED TRANSGENIC MICE WITH *HLA-C*07:02:01:01*, AS A PROMOTE OF INNOVATIVE TRANSGENIC AND KNOCKOUT BIOMODELS

Nikolay N. Karkischenko¹, Vassili N. Lazarev², Valentin A. Manuvera², Pavel A. Bobrovsky², Natalia V. Petrova^{1,*}, Elena M. Koloskova³, Elena S. Glotova¹

¹ 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

² Lopukhin Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine of the Federal Medical and Biological Agency of Russia
119435, Russian Federation, Moscow, Malaya Pirogovskaya Str., 1a

³ 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 Village

Genetic differences in different populations influence the mechanism and efficacy of drugs. Biomodels that take into account the peculiarities of genetic polymorphism in different individuals allow to more fully investigate the molecular-genetic mechanisms of action of pharmacological agents, including immunobiological ones. Recombinant DNA encoding a hybrid MHC class I protein containing human $\beta 2$ -microglobulin fused with antigen-presenting domains ($\alpha 1$ and $\alpha 2$ domains) of the *HLA-C*07:02:01:01* molecule and $\alpha 3$ domain of the mouse H2-complex was created. The purified linearized DNA fragment containing the target construct flanked by regulatory fragments ensuring its stable transcription was used to obtain a new line of humanized transgenic mice. The principles of designing humanized transgenic mice by encoding a chimeric MHC class I protein containing antigen-presenting domains *HLA-C*07:02:01:01* are similar to those for obtaining mice of the *HLA-A*02:01:01* and *HLA-B*18:01:01:02* humanized transgenic lines. These transgenic lines of laboratory mice are independent biomodels, and also be used as baselines for obtaining corresponding transgenic and knockout lines.

Keywords: genetic design, *HLA-C*07:02:01:01*, transgenesis, humanized transgenic mice

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

Funding: the article was carried out within the framework of the state assignment of the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia on the topic “Obtaining a new line of humanized transgenic mice carrying the human *HLA-A*pX* gene and knockout of the mouse H-2K complex” (code: “Transknockout-2024”).

For citation: Karkischenko N.N., Lazarev V.N., Manuvera V.A., Bobrovsky P.A., Petrova N.V., Koloskova E.M., Glotova E.S. Principles of Creation of a Genetic Engineering Construction for Obtaining Humanized Transgenic Mice with *HLA-C*07:02:01:01*, as a Promote of Innovative Transgenic and Knockout Biomodels. *Journal Biomed.* 2024;20(1):8–20. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-1-8-20>

Submitted 15.01.2024

Revised 12.02.2024

Published 10.03.2024

Введение

Генетические отличия между этническими группами определяются полиморфизмом генов в человеческих популяциях по всему многообразию ферментативных и метаболических систем, в связи с чем

возникают проблемы в возможностях применения одних и тех же препаратов и стратегий для лечения разных групп населения. Возникает острая необходимость введения новых норм по разработке и тестированию лекарственных препаратов с учетом

генетических особенностей как отдельных индивидуумов (персонализированная медицина), так и этнических групп (этническая фармакология) [2, 11, 13, 17]. Целенаправленное создание соответствующих животных биомоделей, в первую очередь гуманизированных мышей, в геном которых искусственно встроены один или несколько генов человека, позволяет быстро и надежно провести фармакологическую оценку исследуемых препаратов [2, 4, 6, 20]. Определение спектра генов, наиболее типичных для представителей разных этнических групп, в частности, самых крупных этносов многонациональной Российской Федерации, создание трансгенных гуманизированных животных-моделей, несущих соответствующие гены, является важнейшим этапом для выяснения особенностей генетических и эпигенетических механизмов патологических процессов и эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов.

В НЦБМТ ФМБА России на протяжении 10 лет ведётся разработка гуманизированных биомоделей, а также поддерживаются уже созданные различные модели социально значимых заболеваний. В 2021 году мы создали полную гибридную ДНК-конструкцию с геном человека *HLA-A*02:01:01:01* [3]: выбор аллеля был обусловлен наибольшей частотой встречаемости у населения русской национальности *HLA-A*02:01:01:01*. Методом микроинъекций гибридной конструкции (ГК) в пронуклеус зигот были получены родоначальники новой гуманизированной трансгенной линии мышей-биомоделей, несущих ген *HLA-A*02:01:01:01* [10]. По результатам селекционно-генетической работы с полученными трансгенными животными были определены три наиболее перспективные сублинии [5].

В данной работе рассматривается процесс разработки ГК, несущей фрагмент гена *HLA-C*07:02:01:01*, кодирующий

антигенпрезентирующие домены белка, для получения новой линии биомодели гуманизированных мышей. Выбор гена обусловлен статистикой распределения аллелей генов иммунного ответа среди населения нашей страны.

Несмотря на то, что гены *HLA* являются самыми полиморфными в геноме человека, *HLA*-аллели стабильны для популяций и сохраняются в ряду поколений. Знание частот встречаемости *HLA*-гаплотипов в популяциях необходимо для обнаружения подходящих доноров в различных популяционных генетических исследованиях и для изучения предрасположенности к заболеваниям среди населения. Частота встречаемости аллеля *HLA-C*07:02* у населения разных регионов мира представлена на рис. 1.

Распределение аллелей гена *HLA-C* у доноров костного мозга из регистра ФГБУ ГНЦ Минздрава России, самоопределившихся как русские, соответствуют таковому в большинстве европейских популяций. Наиболее частотным в группе московских доноров является аллель *HLA-C*07:02* (выявлен у 13,2%) [8]. Типирование на уровне второго поля (например, *HLA-C*07:02*) выявляет группу аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность пептидсвязывающих доменов. Типирование на уровне третьего поля (*HLA-C*07:02:01*) определяет группу аллелей, кодирующих одинаковую нуклеотидную последовательность всех экзонов гена *HLA*, типирование же на уровне четвертого поля позволяет определить конкретный аллель *HLA*-гена с нуклеотидными заменами не только в кодирующих, но и некодирующих регионах гена *HLA*. Для русской популяции (657 доноров Нижегородской области) были получены результаты на уровне четвертого поля по *HLA*-генам класса I. Установлены наиболее высокочастотные *HLA*-аллели: для гена *HLA-A* — это *A*02:01:01:01* (26,9%), для *HLA-B* — *B*07:02:01:01* (12,5%), для *HLA-C* — *C*07:02:01:03* (12,6%) [15].

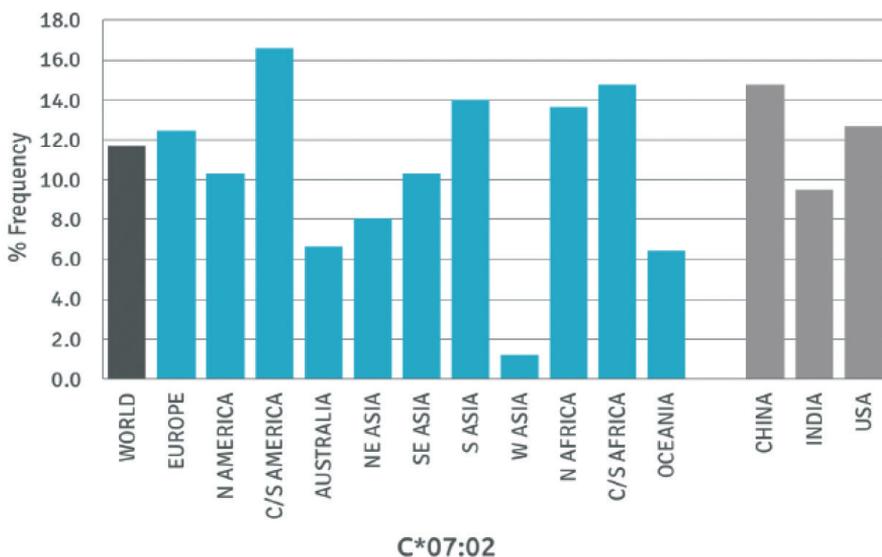


Рис. 1. Встречаемость аллеля *C*07:02* в разных регионах мира.
Fig. 1. Occurrence of the *C*07:02* allele in different regions of the world.

Полученные данные имеют значение:

- при оценке генетически детерминированной функциональной активности естественных клеток-киллеров (Natural Killer – *NK*) в исследовании их связи с разными заболеваниями и в вопросах взаимодействия между иммунной системой и репродукцией: в регуляции активности *NK*-клеток организма очень велика роль взаимодействия между иммуноглобулинподобными рецепторами (*KIR*) *NK*-клеток и их *HLA*-лигандами – некоторыми антигенами *HLA* I класса. Связывание *HLA*-лигандов с ингибирующими *KIR*-рецепторами (*iKIR*) приводит к подавлению функциональной активности *NK*-клеток, взаимодействие с активирующими *KIR*-рецепторами (*aKIR*) усиливает функциональную активность *NK*. *KIR* и *HLA* системы эволюционировали совместно, и репертуар *KIR* оказывает давление на баланс *HLA*-гаплотипов [19]. Полиморфизм *KIR*-генов и сочетания *KIR*-*HLA* являются важным иммуногенетическим фактором, играющим существенную роль в предрасположенности и/или резис-

- стентности к инфекционным, аутоиммунным и онкологическим заболеваниям;
- при трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток (алло-ТГСК) от неродственного или гаплоидентичного родственного донора;
- при изучении специфического иммунного ответа на инфекцию, вызванную COVID-19: некоторые генотипы *HLA* класса I могут быть связаны с критическим течением болезни [12, 22];
- в контроле течения ВИЧ-инфекции: в комплексе *HLA* обнаружены значимые полиморфизмы, связанные с уровнем вирусной нагрузки [14];
- при проведении антропологических исследований и при изучении ассоциаций *HLA*-генов с прочими социально значимыми заболеваниями.

Новая линия гуманизированных трансгенных мышей может быть использована 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. Данная модель позволит идентифицировать эпитопы, ограниченные супертипом *HLA-C*07:02*.

Материалы и методы

Получение первичного биоматериала

Для проведения *HLA*-типирования первичный материал (плазма крови донора с *HLA-C*07:02:01:01*) были любезно предоставлены сотрудниками лаборатории трансплантационной иммунологии ФГБУ «НИИЦ гематологии», которым авторы выражают глубокую благодарность. В процессе отбора доноров плазмы учитывались как фенотипические характеристики (отсутствие эпитантуса и пр.), так и генотипические маркеры, а также генеалогия человека.

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-. В работе использовали клеточную линии HEK-293FT («Thermo Fisher Scientific», США), C2C12 («ATCC», США).

Плазмидные векторы

В работе были использованы плазмидные векторы pCDNA3.4 («Thermo Fisher Scientific», США), pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 (Addgene #42230).

Список и последовательности использованных в работе праймеров приведены в табл. 1.

Результаты и их обсуждение

Дизайн гибридных ДНК-конструкций, включающих нуклеотидные последовательности β2-микροглобулина человека, α1- и α2-доменов МНС человека (*HLA*) и α3-домена МНС мыши

Для получения структурной части рекомбинантного гена было амплифицировано три ДНК-фрагмента:

1. Фрагмент гена β2-микροглобулина человека получали с ПЦР-амплификацией с парой праймеров b2mF/b2mR. В качестве матрицы использовали кДНК библиотеки, полученной из клеток линии HEK293 с применением гексамерных праймеров;

2. Фрагмент структурной части гена *HLA-C*, соответствующий антигенпрезентирующим доменам α1, α2, получали с использованием пары праймеров 07F/07R и синтетической конструкции гена *HLA-C*07:02:01:01* («Евроген», Россия);

3. Фрагмент гена МНС, соответствующий домену α3 мышинного комплекса гистосовместимости, получали с применением пары праймеров H2F-07/H2R и кДНК библиотеки, полученной из клеток коммерчески доступной линии мышинных миобластов C2C12 с использованием гексамерных праймеров.

Для сборки структурного гена 5 нг каждого из выделенных на этом этапе фраг-

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

Праймер	5'-3'- последовательность	Введенный сайт
b2mF	GTCTAGAGCCACCATGTCTCGTCCGTGGCCTTAG	XbaI
b2mR	ACCTCATGCTGTGAGAGCATCCACCACCAGAGCCTCCA	Линкер
07F	TGGAGGCTCTGGTGGTGGATGCTCTCACAGCATGAGGT	Линкер
07R	CACATGAGCCTTTGGGAATCGGCTCTCTGCAGTGTCTC	
H2F-07	GAGACACTGCAGAGAGCCGATTCCCCAAAGGCTCATGTG	
H2R	ACCAAGCTTCACGCTAGAGAATGAGGGT	HindIII
cbhF	TTGACTAGTCCGTACATAACTTACGGTAAATGG	SpeI
cbhR	GCTCTAGAACCTGAAAAAAGTGATTTACAGGCAGGTG	XbaI

ментов смешивали, добавляли ПЦР-смесь для полимеразы PhusionHigh-Fidelity DNA Polymerase (“Thermo Fisher Scientific”, США), за исключением праймеров.

Программа амплификации

Применяли двухступенчатую амплификацию:

1. Первичная денатурация 2 мин при 95°C, 10 циклов в режиме: 98°C – 10 с, 60°C – 10 с, 72°C – 60 с.

2. В реакционную смесь вносили концевые праймеры b2mF/H2R и проводили еще 20 циклов ПЦР в том же режиме.

Полученный ПЦР-ампликон (содержит ген β-микроглобулина человека, соединенный через глицин-сериновый линкер с кодирующими последовательностями α1-, α2-доменов *HLA-C*07:02:01:01* и α3-домена мышинового комплекса H-2K) клонировали в плазмиду pcDNA3.4 после предварительной обработки обоих компонентов эндонуклеазами рестрикции XbaI и HindIII: была получена промежуточная плаزمиды pcDNA3.4/b2m-C0702-h2k.

С использованием пары праймеров cbhF/cbhR и плазмиды pX330-U6-Chimeric_BB-CVh-hSpCas9, использованной в качестве матрицы, амплифицировали ДНК-фрагмент, соответствующий СВН-промотору (CMV-энхансер/промотор β-актина цыплят). ПЦР-ампликон и pcDNA3.4/b2m-C0702-h2k были обработаны рестриктазами SpeI и XbaI, при этом из плазмиды pcDNA3.4/b2m-C0702-h2k был удален исходный CMV-промотор. После лигирования была получена плаزمиды, содержащая генетическую последовательность, кодирующую гибридную молекулу комплекса гистосовместимости первого класса, фланкированную СВН-промотором и WPRE-TK-PolyA терминирующим фрагментом, изначально входящим в состав плазмиды pcDNA3.4. Полученную плазмиду назвали pСВН-b2m-C0702-h2k (рис. 2).

С целью получения линейного фрагмента ДНК генной конструкции, пред-

назначенной для микроинъекции, плазмиду pСВН-b2m-C0702-h2k расщепляли эндонуклеазами рестрикции BglIII и SalI. Продукты реакции разделяли с помощью электрофореза в 0,8% агарозном геле. Полосу, соответствующую по подвижности ДНК-фрагменту размером 3181 п.н., вырезали и выделяли из геля с помощью набора GeneJETGelExtractionKit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Концентрацию ДНК в конечном растворе определяли с помощью флуориметра Qubit (“Thermo Fisher Scientific”, США). Схема полученной линейаризированной генной конструкции приведена на рис. 3, размеры и описание ее фрагментов – в табл. 2.

Ранее нами были детально описаны и охарактеризованы структурные фрагменты подобной генной конструкции – СВН-b2m-A0201-h2k [3], кодирующие гибридный HLA-A*02:01:01-H2 белок, слитый с β2-микроглобулином человека. Данная работа дополнена обоснованием выбора промотора, общего для обеих генетических конструкций – первой (СВН-b2m-A0201-h2k) и второй (СВН-b2m-C0702-h2k).

Полученная тем или иным способом структурная часть гена (трансгена), ГК содержит информацию о структуре белка, но сама не может ее реализовать: нужны дополнительные механизмы для управления действием гена – структурные элементы – промоторы, терминаторы и энхансеры.

Промотор необходим для инициации и контроля транскрипции гена, определяет тканеспецифичность экспрессии белка. **Терминатор** отвечает за прекращение транскрипции, **энхансеры** (могут находиться в любой части генома) — последовательности ДНК, усиливающие транскрипцию при взаимодействии со специфическими белками.

Выбор промотора при создании трансгенных конструкций имеет особое значение: сильный промотор инициирует синтез мРНК часто, слабый — гораздо реже.

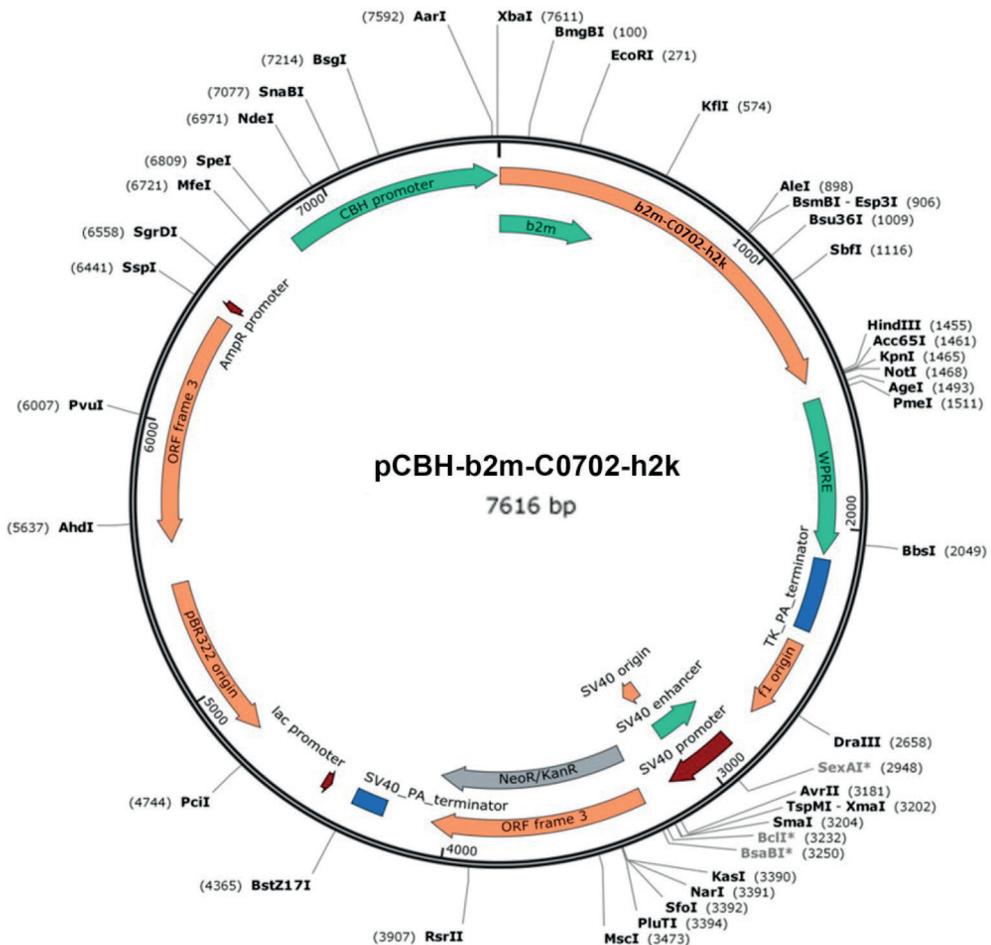


Рис. 2. Схема плазмиды *pCBH-b2m-c0702-h2k*, полученной на основе плазмиды-вектора *pcDNA3.4*.

Примечание: плазмида содержит СВН-промотор, ген $\beta 2$ -микроглобулина человека, соединенный последовательностью, кодирующей глицин-сериновый линкер, с последовательностью $\alpha 1$ $\alpha 2$ -доменов молекулы HLA-C*07:02 и $\alpha 3$ -домена молекулы H2K^k, посттрансляционный регуляторный элемент WPRE и сигнал полиаденилирования ТК ПА. ДНК-последовательность CMV-промотора плазмиды *pcDNA3.4* была заменена последовательностью СВН-промотора, амплифицированного с плазмиды *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9*. Красными стрелками указаны сайты рестрикции для вырезания линейного фрагмента *CBH-b2m-C0702-h2k*.

Fig. 2. Diagram of the *pcpg-b2m-c0702-h2k* plasmid obtained on the basis of the plasmid vector *pcDNA3.4*.

Note: the plasmid contains a CBH promoter; a human $\beta 2$ microglobulin gene connected by a sequence encoding a glycine-serine linker with a sequence of $\alpha 1$ - $\alpha 2$ domains of the HLA-C*07:02 molecule and $\alpha 3$ domains of the H2K^k molecule, a posttranslational regulatory element WPRE and a polyadenylation signal TK PA. The DNA sequence of the CMV-promoter of the plasmid *psDNA3.4* was replaced by the sequence of the CBH-promoter amplified from the plasmid *pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9*. The red arrows indicate the restriction sites for cutting out the linear fragment *CBH-b2m-C0702-h2k*.

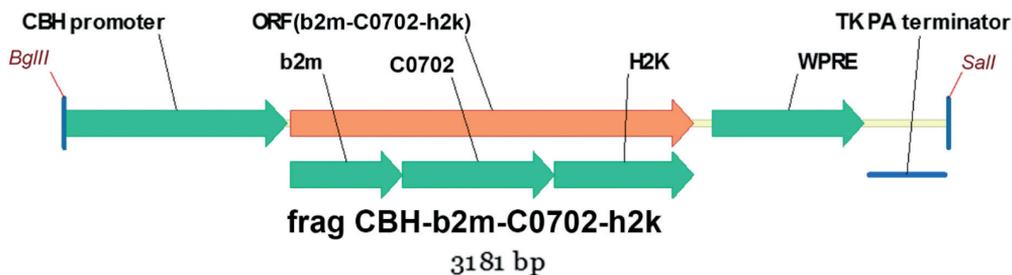


Рис. 3. Схема линейного фрагмента CBH-b2m-C0702-h2k ДНК, предназначенной для микроинъекций.

Примечание: линейный фрагмент содержит CBH-промотор, структурную часть гена $\beta 2m$ человека, соединенную глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ -доменом молекулы HLA-C*07:02:01:01, $\alpha 2$ -домен этой же молекулы HLA, $\alpha 3$ -домен молекулы H-2K, посттрансляционный регуляторный элемент WPRE и сигнал полиаденилирования TK PA.

Fig. 3. Scheme of a linear fragment of frag CBH-b2m-C0702-h2k DNA intended for microinjection.

Note: the linear fragment contains the CBH promoter, the structural part of the human $\beta 2m$ gene, linked by a glycine-serine linker with the $\alpha 1$ domain of the HLA-C*07:02:01:01 molecule, $\alpha 2$ domain of the same HLA molecule, the $\alpha 3$ domain of the H-2K molecule, post-translational regulatory WPRE element and TK PA polyadenylation signal.

Таблица 2. Структура генной конструкции CBH-b2m-C0702-h2k

Table 2. Structure of the gene construct CBH-b2m-C0702-h2k

Фрагмент	Размер, п.н.	Описание
CBH-b2m-C0702-h2k	3181	Генная конструкция
CBH	796	Промотор
$\beta 2m$ человека	357	$\beta 2$ -микроглобулин человека
Экзон 1	67	
Экзон 2	279	
Экзон 3 (до TAA)	11	
Линкер (Гли4Сер1) x3	45	Линкер
Фрагмент HLA C0702	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	Трансмембранный фрагмент белка
mEx6	33	
mEx7	39	
mEx8	32	Некодирующий экзон, нетранспируемая область
wPRE	676	Посттрансляционный регуляторный элемент
tK-PA-terminator	271	Сигнал полиаденилирования

Для экспрессии продукта в клетках эукариот может быть использован как промотор, характерный для собственных генов организмов, найденный в геноме, так и промотор вирусов, заражающих данный организм. Наиболее часто используемым промотором в составе генетических конструкций является промотор ранних генов цитомегаловируса CMV, обладающий вы-

сокой активностью в различных клетках и тканях. Существенным недостатком CMV и других универсальных вирусных промоторов является высокая подверженность метилированию в клетках млекопитающих и, вследствие этого, инактивация при интеграции трансгена в геном [23]. Вероятно, это один из механизмов противовирусной защиты человека. В некоторых случаях выявляется

интенсивный иммунологический ответ на трансгены с CMV-промотором, иногда трансген экспрессируется не во всех тканях. Так, при получении мышей с ГК, содержащей промотор CMV, трансген не экспрессировался в легких, печени, поджелудочной железе и мышечной ткани [7].

Для стимулирования экспрессии в большинстве тканей наряду с CMV широко используют и другие конститутивные промоторы, такие как промоторы 1 α -субъединицы фактора элонгации человека (EF1 α), β -глобуридазы (GUSB) или убиквитина C (UBC), β -актина курицы (CBA). Введение в промотор *CMV-энхансера* усиливает экспрессию трансгена [21]. У CAG (синтетический промотор, содержащий ранний энхансер CMV, промотор β -актина курицы и химерный интрон β -актина курицы и β -глобина кролика) в экспериментах транскрипционная активность была выше, чем у CMV [24]. Он был использован в одной из экспрессионных кассет (SEQ ID NO:2), предназначенных для вакцинации против вируса SARS-CoV-2 (Спутник V) [1]. Векторы с CAG обеспечивали долгосрочную экспрессию трансгенов во время дифференцировки стволовых клеток в мезодерму по сравнению с CMV и CBA промоторами [16]. Другая гибридная форма промотора CMV-CBA (CBh), включающая гибридный интрон (5'UTR CBA), и мышиного Minute virus (3'UTR MVM) давала устойчивую долговременную экспрессию во всех клетках [18, 21].

Для создания ГК с HLA нами был выбран *СВН-промотор*: широко используемая в CRISPR/Cas9 технологии плаزمида pX330-U6-ChimericBB-CBh-hSpCas9 содержит СВН-промотор, обеспечивающий высокоэффективную транскрипцию эндонуклеазы Cas9 в клетках эукариот. Промотор включает в себя ранний энхансер CMV (286 п.н., делеция 18 п.н. по сравнению с CMV-энхансером), CBA-промотор (257 п.н., делеция 19 п.н. по сравнению

со стандартным промотором) и гибридный интрон (228 п.н., гибрид CBA- и MVM-интронов) [18]. Использование СВН-промотора в составе ГК позволяет предположить эффективную экспрессию трансгена во всех органах и тканях полученных с его использованием трансгенных животных.

Заключение

Число потребителей генно-модифицированных животных (ГМЖ) (трансгенных, нокаутных, гуманизированных) – в первую очередь, мышей и крыс – неукоснительно растет. Развитие отечественных лабораторий по производству ГМЖ открывает широкие возможности для создания биомоделей, отвечающих задачам конкретного исследования, а отсутствие карантина позволяет получать мышей в существенно более короткий срок и значительно снижает их себестоимость по сравнению с животными, приобретаемыми за рубежом.

ФГБУН НЦБМТ ФМБА России уже на протяжении 10 лет создает гуманизированных мышей-биомоделей для оценки метаболизма и эффективности лекарственных препаратов, разработки оптимальных способов исследования и лечения социально-значимых болезней человека [2, 3, 6].

Проведенная работа иллюстрирует процесс создания генно-инженерной конструкции, кодирующей гибридный белок MHC I класса, состоящий из антигенпрезентирующих $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов *HLA-C*07:02:01:01*, $\alpha 3$ -домена H-2K^k мыши и стабилизированный $\beta 2$ -микроглобулином человека, соединенным гибким глицин-сериновым линкером с $\alpha 1$ -доменом. Генетическая конструкция использована для получения новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих *HLA-C*07:02:01:01*. Принципы конструирования данной трансгенной линии лабораторных мышей стали базовой основой и используются для получения новых линий гуманизированных трансгенно-нокаутных животных,

несущих гаплотипы доноров человека *HLA-A*02:01:01:01*, *HLA-B*07:02:01:01*, *HLA-B*18:01:01:02* и *HLA-C*07:02:01:01* из регистра ФГБУ «НМИЦ гематологии», самоопределившихся как русские [9].

Создание широкой серии линий гуманизированных мышей с наиболее широко представленными вариантами *HLA* класса I для населения РФ позволит вплотную подойти как к популяционной, так и персонализированной медицине, эффективно решать такие задачи, как разработка и тестирование вакцин, анализ безопасности

и иммуногенности, изучение инфекционных, онкологических и аутоиммунных заболеваний. 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 новых гуманизированных трансгенных и трансгенно-нокаутных линий, т.е. мы переходим от случайного выбора или поиска животных к созданию адекватных и оптимальных линий под конкретные эксперименты.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. Зубкова О.В., Ожаровская Т.А., Должикова И.В., Попова О., Щербляков Д.В., Гроусова Д.М., Джуруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Тухватулина Н.М., Щербинин Д.Н., Есмагамбетов И.Б., Токарская Е.А., Ботиков А.Г., Ерохова А.С., Ижаева Ф.М., Семихин А.С., Борисевич С.В., Народицкий Б.С., Логунов Д.Ю., Гинцбург А.Л. *Фармацевтическое средство и способ его использования для индукции специфического иммунитета против вируса тяжелого острого респираторного синдрома SARS-CoV-2 (варианты)*. Патент РФ № 2731342 C1, 2020. [Zubkova O.V., Ozharovskaya T.A., Dolzhikova I.V., Popova O., Shcherblyakov D.V., Grousova D.M., Dzharullayeva A.Sh., Tuxhvatulin A.I., Tuxhvatulina N.M., Shcherbinin D.N., Esmagambetov I.B., Tokarskaya E.A., Botikov A.G., Erokhova A.S., Izhaeva F.M., Semikhin A.S., Borisevich S.V., Naroditsky B.S., Logunov D.Yu., Ginzburg A.L. *Pharmaceutical product and a method of its use for the induction of specific immunity against the SARS-CoV-2 severe acute respiratory syndrome virus (variants)*]. Patent RU No. 2731342 C1, 2020. (In Russian)].
2. 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., Bolotских 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 zhi-*
3. 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. [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. *Sozdanie polnih gibritnih DNK-konstrukcij s genom cheloveka HLA-A*02:01:01:01* [Chimeric Construct Engineering with Human Variant *HLA-A*02:01:01:01*]. *Biomeditsina* [Journal Biomed]. 2021;17(1):10–23. (In Russian)].
4. 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-geneticheskie aspekty tekhnologii polucheniya transgennykh myshey s integrirovannymi genami N-atsetiltransferazy (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)].
5. Каркищенко Н.Н., Глотова Е.С., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Ларюшина Н.А., Петров Д.В.,

- Васильева И.А., Дерябин К.Е. Генетический скрининг новой трансгенной гуманизированной по *HLA-A*02:01:01:01* и $\beta 2m$ линии мышей. *Биомедицина*. 2023;19(3E):10–24. [Karkischenko N.N., Glotova E.S., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Laryushina N.A., Petrov D.V., Vasil'eva I.A. Deryabin K.E. Geneticheskij skрининг novoj transgennoj gumanizirovannoj po *HLA-A*02:01:01:01* i $\beta 2m$ linii myshey [Genetic screening of a new transgenic mouse line humanized for *HLA-A*02:01:01:01* and $\beta 2m$]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2023;19(3E):10–24. (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)].
 - Кондратьева Л.Г., Кашкин К.Н., Чернов И.П., Стукачева Е.А., Дыдыч Д.А., Копанцев Е.П., Сverdlov E.D. PCNA: конститутивный промотор человека для экспрессии генов в целях их функционального и генно-терапевтического использования. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017; 3:89–92. [Kondratyeva L.G., Kashkin K.N., Chernov I.P., Stukacheva E.A., Dydych D.A., Kopantzev E.P., Sverdlov E.D. PCNA: konstitutivnij promotor cheloveka dlya ekspressii genov v celyah ih funktsionalnogo i genno-terapevticheskogo ispolzovania. [PCNA: constitutive human promoter for expression of genes for their functional and therapeutic use]. *Molecular Genetics, Microbiology and Virology*. 2017;3:89–92. (In Russian)].
 - Кузьмина Е.П., Чапова Р.С., Хамганова Е.Г. Распределение частот аллелей гена HLA-C и HLA-C1, -C2 групп лигандов для KIR среди потенциальных доноров костного мозга. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2016;12(2): 291–294. [Kuzminova E.P., Chapova R.S., Khamaganova E.G. Rasprezhenie chastot allele gena HLA-C i HLA-C1, -C2 grupp ligandov dlya KIR sredi potencialnih donorov kostnogo mozga [Frequency distribution of alleles of the HLA-C and HLA-C1, -C2 ligand groups for KIR among potential bone marrow donors]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnyh i fundamental'nyh issledovaniy [International Journal of Applied and Fundamental Research]*. 2016;12(2): 291–294. (In Russian)].
 - Леонов Е.А. Аллельный и гаплотипический полиморфизм HLA-генов доноров гемопоэтических стволовых клеток регистра, самоопределившихся как русские: дисс. ... канд. биол. наук. М., 2022:117. [Leonov E.A. Allel'nyy i gaplotipicheskij polimorfizm *HLA-genov donorov gemopoeticheskikh stvolovykh kletoch registra, samoopredelivshisya kak russkie: diss. ... kand. biol. nauk. M., 2022:117.*
 - HLA-genov donorov gemopoeticheskikh stvolovykh kletoch registra, samoopredelivshisya kak russkie [Allelic and haplotype polymorphism of HLA genes of donors of hematopoietic stem cells of the registry, self-identified as Russian]: dissertation ... Cand. Biol. Sci. Moscow, 2022:117. (In Russian)].*
 - 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. [Savchenko E.S., Ogneva N.S., Karkischenko N.N. Embriologicheskie aspekty sozdaniya novoj gumanizirovannoj transgennoj linii myshey s integrirovannym genom cheloveka *HLA-A*02:01:01:01* [Embryological aspects of creation a new humanized transgenic mice with integrated human *HLA-A*02:01:01:01* gene]. *Biomeditsina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
 - Степанов В.А. Геномы, популяции, болезни: этническая геномика и персонализированная медицина. *Acta Naturae* (русскоязычная версия). 2010;2(4): 18–34. [Stepanov V.A. Genomi, populyacii, bolezni: etnicheskaya genomika i personificirovannaya medicina [Genomes, populations, diseases: ethnic genomics and personalized medicine]. *Acta Naturae* (Russian version). 2010;2(4):18–34. (In Russian)].
 - Суслова Т.А., Крохин А.А., Вавилов М.Н., Беляева С.В., Евдокимов А.В., Родионова Е.С., Султанова А.А., Чуманова Е.А., Миронова Е.А., Кофиади И.А. Генетические факторы, предрасполагающие к развитию COVID-19 (HLA, AB0, RH-HR). *Вестник гематологии*. 2021;17(3): 64–65. [Suslova T.A., Krokhin A.A., Vavilov M.N., Belyaeva S.V., Evdokimov A.V., Rodionova E.S., Sultanova A.A., Chumanova E.A., Mironova E.A., Kofiadi I.A. Geneticheskie factori, predpolagayuzhie k razvitiyu COVID-19 (HLA, AB0, RH-HR) [Genetic factors predisposing to the development of COVID-19 (HLA, AB0, RH-HR)]. *Bulletin of Hematology*. 2021;17(3):64–65. (In Russian)].
 - Сычев Д.А., Шувев Г.Н., Торбенков Е.С., Адриянова М.А. Персонализированная медицина: взгляд клинического фармаколога. *Consilium Medicum*. 2017;19(1):61–68. [Sychev D.A., Shuev G.N., Torbenkov E.S., Adrijanova M.A. Personalizirovannaya medicina: vzglyad klinicheskogo farmakologa [Personalized medicine: clinical pharmacologist's opinion]. *Consilium Medicum*. 2017;19(1):61–68. (In Russian)].
 - Хайтов Р.М., Алексеев Л.П., Гудима Г.О., Кофиади И.А. Аллельные варианты генов человека, затрагивающие внутриклеточный жизненный цикл ВИЧ и регулирующие иммунный ответ на ВИЧ-инфекцию. *Бюллетень сибирской медицины*. 2019;18(1):119–130. [Khaitov R.M., Alexeev L.P., Gudima G.O., Kofiadi I.A. Allel'nie variant genov cheloveka, zatragivayushie vnutrikletochniy zhiznennyi cikl VICH i reguliruyuzhie immunnyi otvet na VICH-infekciyu [Allelic variants of human HIV in-

- tracellular life cycle and regulating immune response of HIV infection]. *Bulletin of Siberian Medicine*. 2019;18(1):119–130. (In Russian)].
- Хамаганова Е.Г., Абдрахимова А.Р., Леонов Е.А., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. Секвенирование следующего поколения в HLA-типировании больных с показаниями к трансплантации аллогенных гемопоэтических стволовых клеток и их доноров. *Гематология и трансфузиология*. 2021;66(2):206–217. [Khamaganova E.G., Abdrakhimova A.R., Leonov E.A., Khizhinskiy S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. Sekvenirovanie sleduyushogo pokoleniya v HLA-tipirovanii bolnih s pokazaniami k transplantatsii allogennih gemopoiticheskikh stvolovih kletok i ih donorov [Next generation sequencing HLA-typing of recipients and donors of allogeneic haematopoietic stem cells]. *Russian Journal of Hematology and Transfusiology*. 2021;66(2): 206–217. (In Russian)].
 - Alexopoulou A.N., Couchman J.R., Whiteford J.R. The CMV early enhancer/chicken β actin (CAG) promoter can be used to drive transgene expression during the differentiation of murine embryonic stem cells into vascular progenitors. *BMC Cell Biol*. 2008;9(2). DOI: 10.1186/1471-2121-9-2.
 - Brittain H.K., Scott R., Thomas E. The rise of the genome and personalised medicine. *Clin. Med. (Lond.)*. 2017;17(6):545–551. DOI: 10.7861/clinmedicine.17-6-545.
 - Gray S.J., Foti S.B., Schwartz J.W., Bachaboina L., Taylor-Blake B., Coleman J., Ehlers M.D., Zylka M.J., McCown T.J., Samulski R.J. 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.
 - Kitpoka P., Tammakorn C., Chaisri S., Leelayuwat C., et al. Genetic profiles of killer-cell immunoglobulin-like receptors and HLA ligands in Thai blood donors. *Human Immunology*. 2016;77:470–475. doi: 10.1016/j.humimm.2016.04.019.
 - Marshall S., Madabushi R., Manolis E., Krudys K., Staab A., Dykstra K., Visser S.A.G. 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.
 - Powell S.K., Rivera-Soto R., Gray S.J. Viral expression cassette elements to enhance transgene target specificity and expression in gene therapy. *Discov. Med.* 2015;19(102):49–57.
 - Shkurnikov M., Nersisyan S., Jankevicius T., Galatenko A., Gordeev I., Vechorko V., Tonevitsky A. Association of HLA Class I Genotypes With Severity of Coronavirus Disease-19. *Front. Immunol.* 2021;12:641900. DOI: 10.3389/fimmu.2021.641900.
 - Wang W., Jia Y.L., Li Y.C., Jing C.Q., Guo X., Shang X.F., Zhao C.P., Wang T.Y. Impact of different promoters, promoter mutation, and an enhancer on recombinant protein expression in CHO cells. *Scientific Reports*. 2017;8:10416.
 - Yang C.Q., Li X.Y., Li Q., Fu S.L., Li H., Guo Z.K., Lin J.T., Zhao S.T. Evaluation of three different promoters driving gene expression in developing chicken embryo by using in vivo electroporation. *Genet. Mol. Res.* 2014;13:1270–1277.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

Каркищенко Николай Николаевич, д.м.н., проф., акад. РАН, чл.-корр. РАН, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

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

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

Nikolay N. Karkischenko, Dr. Sci. (Med.), Prof., Academician of the Russian Academy of Rocket and Artillery Sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: niknik2808@yandex.ru

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

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

Бобровский Павел Александрович, к.б.н., ФГБУ «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина ФМБА России»;
e-mail: pbobrovskiy@gmail.com

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

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

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

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

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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author