https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-8-20

CC BY 4.0

ДОКАЗАТЕЛЬСТВА ТРАНСГЕННОСТИ И ГУМАНИЗИРОВАННОСТИ У МЫШЕЙ, ПОЛУЧЕННЫХ В НЦБМТ ФМБА РОССИИ, МЕТОДОМ СЕКВЕНИРОВАНИЯ ПО СЭНГЕРУ

Н.Н. Каркищенко[1], Н.В. Петрова[1,*], В.В. Слободенюк[1], Е.М. Колоскова[2], Н.А. Ларюшина[1], И.А. Васильева[1], Д.В. Петров[1], Л.А. Болотских[1], М.А. Савина[1]

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

В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России были созданы несколько гуманизированных трансгенных линий мышей-биомоделей, содержащих интегрированный вариабельный человеческий ген главного комплекса гистосовместимости (МНС): линия *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*. Животные получены методом микроинъекций линейного фрагмента генно-инженерной конструкции (ГИК) в мужской пронуклеус зигот с последующим переносом потенциально модифицированных эмбрионов в репродуктивный тракт псевдобеременным самкам-реципиентам. Созданная ГИК кодирует химерную молекулу МНС класса I на поверхности клеток, состоящую из α1-, α2-доменов *HLA* человека и α3-домена комплекса H-2K мыши, стабилизированную β2-микроглобулином человека, соединённым глицин-сериновым линкером с α1-доменом *HLA* [1–5]. Данные биомодели могут успешно применяться для решения широкого спектра задач, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, а также разработки и тестирования вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности.
В данной статье представлены теоретические данные о генетическом полиморфизме исследуемого гена в человеческом геноме, а также практические данные о созданных нами трансгенных линиях мышей-биомоделей и результаты сравнения аллель-специфичного участка у полученных линий животных. Анализ проводился методом секвенирования по Сэнгеру на матрице кДНК.

Ключевые слова: ПЦР в реальном времени, трансгеноз, *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, гуманизированные трансгенные мыши, кДНК, РНК, обратная транскрипция, секвенирование
Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.
Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген HLA-A*pX человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транснокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.
Для цитирования: Каркищенко Н.Н., Петрова Н.В., Слободенюк В.В., Колоскова Е.М., Ларюшина Н.А., Васильева И.А., Петров Д.В., Болотских Л.А., Савина М.А. Доказательства трансгенности и гуманизированности у мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, методом секвенирования по Сэнгеру. *Биомедицина*. 2024;20(2):8–20. https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-8-20

Поступила 19.02.2024
Принята после доработки 15.05.2024
Опубликована 10.06.2024

EVIDENCE OF TRANGENCY AND HUMANIZATION IN MICE OBTAINED AT THE SCBMT OF FMBA OF RUSSIA BY SANGER SEQUENCING METHOD

Nikolay N. Karkischenko[1], Nataliya V. Petrova[1,*], Vladimir V. Slobodenyuk[1], Elena M. Koloskova[2], Nadezhda A. Laryushina[1], Irina A. Vasil'eva[1], Dmitriy V. Petrov[1], Lyubov' A. Bolotskih[1], Maria A. Savina[1]

[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]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

Several humanized transgenic lines of biomodel mice containing an integrated variable human gene of the main histocompatibility complex (MHC) have been created at the Federal State Budgetary Scientific and Scientific Research Institute of the FMBA of Russia. These include *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* and *HLA-C*07:02*. The lines were created by microinjection of a linear fragment of a genetically engineered structure (GES) into the male pronucleus of zygotes, followed by the transfer of potentially modified embryos into the reproductive tract to pseudo-pregnant female recipients. The created GES encodes a chimeric molecule of the MHC of class I on the cell surface, consisting of the α1-, α2-domains of human *HLA*, and the α3-domain of the mouse H-2K complex, stabilized by human β2-microglobulin connected by a glycine serine linker with the α1-domain of *HLA* [1–5]. The created biomodels can be successfully used to solve a wide range of research tasks, including studies of immune reactions, infectious, autoimmune and oncological diseases, as well as the development and testing of vaccines in the field of pharmacosafety and immunogenicity. This article presents theoretical information on the genetic polymorphism of the studied gene in the human genome, as well as experimental data on the transgenic lines of biomodels created by the authors and the results of comparing the allele-specific site in the obtained animal lines. The analysis was performed by Sanger sequencing on a cDNA matrix.

Keywords: real-time PCR, transgenosis, *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, humanized transgenic mice, cDNA, RNA, reverse transcription, sequencing
Conflict of interest: the authors declare no conflict of interest.
Funding: the research topic "Generation of 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") of state assignment of Scientific Center of Biomedical Technologies of FMBA of Russia.
For citation: Karkischenko N.N., Petrova N.V., Slobodenyuk V.V., Koloskova E.M., Laryushina N.A., Vasil'eva I.A., Petrov D.V., Bolotskih L.A., Savina M.A. Evidence of Trangency and Humanization in Mice Obtained at the SCBMT of FMBA of Russia by Sanger Sequencing Method. *Journal Biomed.* 2024;20(2):8–20. https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-8-20

Submitted 19.02.2024
Revised 15.05.2024
Published 10.06.2024

Введение

Структура, вариабельность и встречаемость полиморфного гена HLA

Главный комплекс гистосовместимости (MHC) в генотипе кодируется большой группой структурно и функционально отличных генов, подразделяющихся на три класса, два из которых, класс I и класс II, относятся к генам *HLA*, экспрессирующим белки клеточной мембраны, играющие основную роль в инициации гуморального иммунного ответа, особенно в «распознавании» антигена лимфоцитами, которые, в свою очередь, не реагируют на антиген, если он не образует комплекс с молекулой *HLA* на поверхности, содержащей антиген клетки. Гены *HLA* классов I и II — наиболее полиморфные в геноме человека, наибольшим полиморфизмом обладают *HLA* классов I (*HLA-A* — более 450 аллельных вариантов, *HLA-B* — более 780 и *HLA-C* — более 230). Гены класса I (*HLA-A*, *-B* и *-C*) кодируют поверхностные белки цитоплазматической мембраны всех ядерных клеток.

Белки HLA класса I состоят из двух полипептидных субъединиц (рис. 1): вариабельной тяжелой цепи, кодируемой в пределах локусов MHC (хромосома 6 у человека, хромосома 17 у мыши), и неполиморфного полипептида, β2-микроглобулина, кодируемого геном, расположенным на хромосоме 15 человека (на хромосоме 2 у мыши).

Производные от внутриклеточных белков — пептиды образуются путем протеолитического расщепления большими многофункциональными протеолитическими ферментами; затем пептиды перемещаются на поверхность клетки и прикрепляются к молекулам класса I, формируя пептидный антиген для цитотоксических Т-клеток. Молекулы класса II представляют пептиды, производные от внеклеточных белков, которые захватываются лизосомами и перерабатываются в пептиды, узнаваемые Т-клетками. Классические антигены «трансплантации» 1 класса (*H-2K*, *H-2D*, и *H-2L* у мышей; *HLA-A*, *-B*, и *-C* — у человека) экспрессируются на поверхности

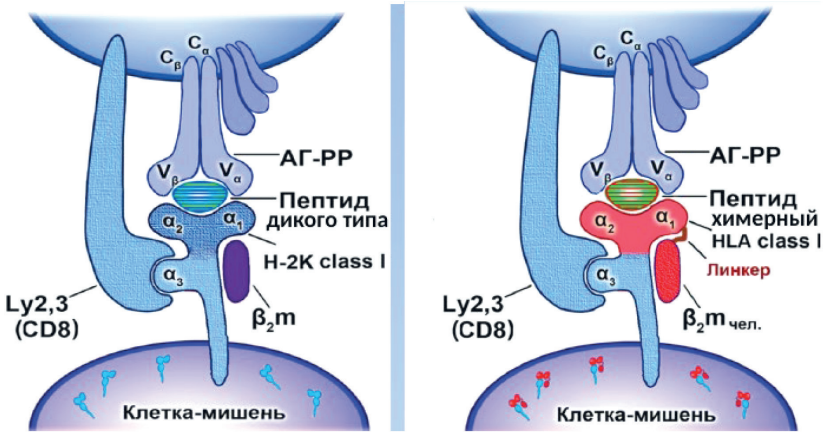

Рис. 1. *Общая схема рецепторики HLA-комплексов полученных нами трансгенных мышей. Распознавание антигенных пептидов рецепторами CTL у мышей дикого типа (1) и у трансгенных мышей (2). Отличительной особенностью является создание химерного белка (2), содержащего гибридную тяжелую цепь MHC класса I, соединенную глицин-сериновым линкером (GS) с β2-микроглобулином человека.*

Fig. 1. *General scheme of the receptors of HLA complexes obtained by the authors in transgenic mice. Recognition of antigenic peptides by CTL receptors in wild-type (1) and transgenic mice (2). A distinctive feature is the creation of a chimeric protein (2) containing a hybrid heavy chain of MHC class I connected by a glycine-serine linker (GS) with human β2-microglobulin.*

всех ядерных клеток как гетеродимеры — полиморфный гликопротеин, нековалентно связанный с β2-микроглобулином, кодируемым геном, находящимся на другой хромосоме. Молекулы МНС презентируют экзогенные антигенные пептиды (включая вирусные пептиды при их наличии) CD^{8+} цитотоксичным Т-лимфоцитам (CTL) и являются их главной целью для клеточного лизиса при отторжении аллогенных или ксеногенных трансплантатов тканей.

Существует три основных типа *HLA* класса I: *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*. Каждый тип присутствует в двух аллельных вариантах, унаследованных от родителей. Существуют десятки вариантов каждого аллеля *HLA*-I; каждый аллель обладает индивидуальной способностью распознавать определенные чужеродные белки. Распределение аллелей зависит от популяции/страны. Индивидуальные комбинации *HLA* класса I существенно влияют на тяжесть множества инфекционных заболеваний, включая малярию [10], туберкулез [12], ВИЧ [9], вирусный гепатит и иммунотерапию рака [14].

Несмотря на высокий полиморфизм генов *HLA*, ряд *HLA*-аллелей стабилен для целых популяций и сохраняется в ряду поколений. Оценка частот встречаемости *HLA* гаплотипов необходима для изучения предрасположенности к заболеваниям среди населения, оценки вероятности обнаружения подходящего донора, может использоваться для различных популяционных исследований.

В настоящее время AFND (открытая сетевая база данных частот встречаемости аллелей (Allele Frequency Net Database — AFND, www.allelefrequencies.net)) содержит данные более 1600 популяций, полученных от более чем 10 млн человек [8]. Первая система классификации, которая ввела понятия common (C) — распространенные аллели и well-documented (WD) — хорошо документированные аллели, объединяемые в CWD-аллели (распространенные и хорошо документированные), была представлена Американским обществом гистосовместимости и иммуногенетики (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics — ASHI). CWD-аллели — редкие. Согласно номенклатуре *HLA*-генов, группу аллелей, кодирующих одинаковую аминокислотную последовательность всей молекулы *HLA*, выявляет типирование на уровне 2-го поля, например *HLA-A*01:01* [16]. *HLA*-типирование на уровне 3-го поля определяет группу аллелей, кодирующих одинаковую нуклеотидную последовательность всех экзонов гена *HLA*. *HLA-A*02:01:02* отличается от *A*02:01:01* синонимичной, не приводящей к замене синтезируемого белка, нуклеотидной заменой.

Только HLA-типирование на уровне 4-го поля позволяет определить конкретный аллель HLA-гена с нуклеотидными заменами в кодирующих и некодирующих регионах гена HLA [16].

Именно данными аллелями и вариабельны разработанные нами линии трансгенных мышей.

Впервые проведенное на уровне 4-го поля *HLA*-типирование у русских доноров-нижегородцев позволило выявить как схожесть, так и некоторые отличия в частотах *HLA*-аллелей по сравнению с американцами европейского происхождения, которые нельзя выявить при рутинном типировании на уровне высокого разрешения. Например, в обеих популяциях *HLA-C*05:01:01:02* встречается чаще, чем *HLA-C*05:01:01:01*, а *HLA-C*07:02:01:03* — чаще, чем *HLA-C*07:02:01:01* [6].

В базе AFND в настоящее время увеличивается объем данных о взаимосвязи различных форм гена *HLA* и побочных реакций на действие лекарственных препаратов, демонстрирующих разный риск развития иммуноопосредованных побочных реакций на определенные лекарственные препараты, что имеет огромное значение для фармакогенетических исследований и клинической практики.

Генно-инженерные конструкции, строение и обоснования выбора компонентов

Общая схема генно-инженерной конструкции, разработанной в нашем Центре и встраиваемой в геном мышей-биомоделей, одинакова для всех линий на всех участках, кроме одного аллель-специфического HLA-участка, имеющего нативный полиморфизм в природе (рис. 2) [2, 4].

Созданные генные конструкции содержат нуклеотидные последовательности, кодирующие:

- CBH-промотор;
- структурную часть: кДНК гена *β2*-микроглобулина человека, соединенную глицин-сериновым линкером с α1-доменом молекулы HLA, α1- и α2-домены молекулы HLA класса I и α3-домен молекулы H2K;
- посттрансляционный регуляторный элемент WPRE;
- сигнал полиаденилирования TK PA.

Мыши всех полученных линий имеют в своем геноме ДНК последовательность, кодирующую химерный белок. Конструкции отличаются друг от друга только HLA-последовательностью (540 п.н.).

Нашей **задачей** являлось сравнение аллель-специфических участков HLA человека в геномной ДНК тканей мышей полученных гуманизированных линий, определение правильной нуклеотидной последовательности ГИК CBH-b2m-(A-02:01, B-07:02, C-07:02)-h2k у животных-биомоделей.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

Для проведения исследования использовались самцы новых гуманизированных трансгенных линий мышей с интегрированным рекомбинантным геном CBH-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k поколений F0–F3, полученные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России. Животные содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12 со свободным доступом к корму и воде. Для получения F1 трансгенные особи F0 скрещивались с половозрелыми гибридными животными CBA/lac × C57Bl/6 (F1), а для получения F2 и следующих поколений племенные ядра формировали из трансгенных особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания, подтверждённых методом ПЦР.

Биоматериал для генетического анализа

Для определения нуклеотидной последовательности *HLA*-фрагментов трансгена и степени химеризма использовали лейкоциты цельной крови, а также биоптаты внутренних органов 4-месячных животных трансгенных линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 — селезенки и печени.

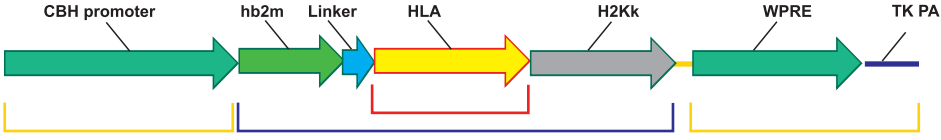

Рис. 2. *Принципиальная схема генных конструкций для микроинъекций. В желтых рамках — регуляторные области рекомбинантного гена, в синей рамке — кодирующая химерный белок последовательность, в красной рамке — вариабельная часть генно-инженерной конструкции: высокополиморфный фрагмент кДНК HLA класса I, кодирующий антигенпрезентирующие домены α1 и α2.*

Fig. 2. *Schematic diagram of HLA gene constructs for microinjections. The yellow frame shows the regulatory regions of the recombinant gene; the blue frame shows the sequence encoding the chimeric protein; and the red frame shows the variable part of the genetically engineered structure: a highly polymorphic fragment of HLA class I cDNA encoding the antigen-presenting domains α1 and α2.*

Выделение РНК

Получение препаратов РНК проводили с использованием набора реагентов РИБО сорб («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовые растворы РНК хранили при температуре не выше -16°С не более 1 мес.

Выделение лимфоцитов

Проводили с использованием набора фиколл-урографин (плотностью 1,077 г/мл) по инструкции производителя («ДНК-Технология», Россия).

Обратная транскрипция

Получение кДНК для последующего анализа методом ПЦР проводили с использованием комплекта реагентов РЕВЕРТА-L («AmpliSens», Россия) согласно инструкции производителя. Готовый препарат кДНК хранился при температуре не выше -16°С в течение 1 недели или при температуре не выше -68°С в течение года.

Подбор праймеров

Для подбора праймеров было использовано программное обеспечение Vector NTI («Thermo Fisher Scientific», США). Синтез праймеров осуществлялся ООО «ДНК синтез» (Россия).

Классическая ПЦР

Реакцию проводили с использованием общих для ГИК праймеров (ООО «ДНК-синтез», Россия) на амплификаторе «Терцик» («ДНК-Технология», Россия). Продукт ПЦР использовали в реакции секвенирования по Сэнгеру.

С использованием аллель-специфичных праймеров проводили ПЦР для идентификации принадлежности трансгенных мышей соответствующей трансгенной линии.

Секвенирование по Сэнгеру

Процедуру проводили с использованием прямых и обратных праймеров на секвенаторе Genetic Analyser 3500 («Applied Biosystems», США). Обработку полученных результатов, сравнение и выравнивание последовательностей проводили с помощью программного обеспечения Vector NTI («Thermo Fisher Scientific», США) и онлайн-модуля BLAST Align (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/BlastAlign.cgi).

Дизайн системы для ПЦР-детекции структурных фрагментов генной конструкции CBH-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k у трансгенных мышей методом определения размеров амплификатов

С помощью ПЦР в реальном времени быстро и качественно определяется наличие трансгена в тканях и органах, однако данный метод позволяет получить достаточно короткие ампликоны (как правило, около 200 п.н.) и не позволяет определять достаточно протяжённые участки генома. Для определения точной первичной последовательности ГИК в геноме мышей была разработана методика получения ампликонов, кодирующих основные функциональные части трансгена, с применением метода классической ПЦР. В табл. 1 представлены праймеры, используемые для классической ПЦР, а на рис. 5 — схема основных функциональных частей ГИК.

Полученные таким образом ампликоны могут быть использованы в дальнейшем как для верификации наличия трансгена методами электрофоретического фракционирования ДНК и определения размера ампликонов, так и служат материалом для определения точной нуклеотидной последовательности методом секвенирования по Сэнгеру.

Результаты и их обсуждение

Подтверждение соответствия трансгена HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 заявленной ГИК методом секвенирования по Сэнгеру

Секвенирование является одним из ключевых методов в арсенале молекулярной биологии, который позволяет точно установить первичную последовательность нуклеотидов в цепочке ДНК. Полученные при этом первичные данные с помощью специальных программ и анализа методами

Таблица 1. *Праймеры для ПЦР-детекции структурных фрагментов генной конструкции СВН-b2m-(A*02:0,1, B*07:02, C*07:02)-h2k**

Table 1. *Primers for PCR detection of structural fragments of a SVN-b2m-(A*02:01, B*07:02, C*07:02)-h2k* gene design*

№	Праймер	Последовательность 5'-3'	Соответствие ГИК	Размер, п.н.
1	hb2mF1	TCCAGCGTACTCCAAAGATTCAGGT	b2m	572
	A02-R1	GTCAACTCTGTGGGTCTGACTGTGAGCT	HLA-A*02:01**	
	B07-R1	TTCTCTCGGTAAGTCTGTGTGTTGGTC	HLAB*07:02**	571
	C07-R1	AGACACTCTGTCGGCTTGAGCTTGTCTC	HLAC*07:02**	572
2	b2mF	TGCCTGCCGTGTGAACCATGTGACT	b2m	780
	m4ExR	AGCTCCTCCCCATTCAACTGCCA	H2Kk	

Примечание: ** — см. схему детекции, рис. 2; ** — праймеры, высокоспецифичные для HLA-аллеля соответствующей линии гуманизированных животных.*

Note: ** — see the detection scheme, Fig. 2; ** — primers highly specific for the HLA allele of the corresponding line of humanized animals.*

биоинформатики могут быть использованы для картирования ДНК, поиска последовательностей и других целей. В нашем случае использование данного метода позволяет подтвердить правильность нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, её соответствие заявленной ГИК и соответствующему гену человека. При сравнивании нуклеотидных последовательностей, кодирующих антигенпрезентирующие домены α1 и α2 *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, нами были подобраны обратные праймеры, соответствующие высокополиморфным фрагментам (рис. 3).

В качестве матрицы для секвенирования использовали кДНК, полученную из выделенного препарата мРНК образцов ткани внутренних органов и лимфоцитов крови мышей, несущих гены *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*. Выбор кДНК обоснован тем, что данной процедурой мы подтверждаем не просто наличие гена в геноме животного, но и активную ГИК в клетках, т.е. транскрипционную активность трансгена, что может косвенно свидетельствовать о функциональной активности конечного продукта — гибридной молекулы МНС класса I на поверхности клеток.

Применение пар праймеров hb2mF1/A02-R1 (B07-R1, C07-R1) (табл. 1), где прямой праймер является общим для всех генных конструкций, а обратный — аллель-специфичным (рис. 2), позволяет однозначно определить принадлежность трансгенного животного одной из трех полученных

Рис. 3. *Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, входящих в состав генно-инженерных конструкций. Скриншот окна Vector NTI. В рамках — высокополиморфные последовательности, которым соответствуют аллель-специфичные обратные праймеры.*

Fig. 3. *Alignment of nucleotide sequences of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 fragments, which are part of genetically engineered structures. Screenshot of the Vector NTI window. Within the frames – highly polymorphic sequences, which correspond to allele-specific reverse primers.*

линий классическим ПЦР и электрофорезом в агарозном геле.

С использованием пары праймеров b2mF/mEx4R получали ПЦР-ампликон размером 780 п.н., в состав которого входили 3'-фрагмент последовательности β2-микроглобулина человека, последовательность линкера, *HLA*-фрагмент полностью (540 п.н.) и фрагмент H2 мыши (4-й экзон). Секвенирование выбранного участка позволяет нам определить не только нуклеотидную последовательность *HLA*-фрагмента, но и фланкирующие ее элементы генной конструкции.

Сравнение нуклеотидных последовательностей трансгена фрагментов *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07*, *HLA-C*07* из разных органов проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно заявленной нуклеотидной последовательности ГИК. Секвенирование проводили с использованием как прямого (b2mF), так и обратного (mEx4R) праймеров, что позволило более точно сопоставить и прочесть полученные нуклеотидные последовательности.

На рисунках представлены примеры сиквенсов с прямым праймером нуклеотидных последовательностей ПЦР-ампликонов трансгенов *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* геномной ДНК, полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов крови (рис. 4, 6), печени и селезёнки. Сравнение проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно нуклеотидных последовательностей генных конструкций, соответствующих линиям трансгенных животных. В работе использовали программу Vector NTI, приложение Align.

В геномной кДНК исследуемых тканей трансгенных мышей гуманизированных линий подтверждено наличие фрагментов, соответствующих основным компонентам генной конструкции: ***структурная часть гена β2-микроглобулина человека, соединенная глицин-сериновым линкером с α1- и α2-доменами молекулы HLA соответствующего аллеля. Проведено сравнение полученных сиквенсов***.

1. Мыши трансгенной гуманизированной линии HLA-A*02:01. Результаты проверки представлены на рис. 4.

Сравнение полученной последовательности *HLA*-фрагмента (на рис. 4 выделено желтым) с последовательностью фрагмента *HLA-A*02:01* генетической конструкции СВН-b2m-A0201 -h2k в онлайн-приложении BLAST показало 100% совпадение (рис. 5).

Результат: амплифицированный и прочтённый в прямом и обратном направлениях фрагмент кДНК содержит полную последовательность *HLA-A*02:01* генной конструкции, фланкированную соответственно

GTGGGATCGAGACATGACGCGTGGTGGAGGTGGCAGTGGAGGTGGAGGCTCTGGTGGTGGAGGATCTCACAGCATGAGGTACTTCT
TCACCAGCGTGTCCAGACCTGGCAGAGGTGAACCCAGGTTCATTGCCGTTGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTTCGCTTCGAC
AGCGATGCTGCAAGTCAGAGGATGGAACCGAGAGCACCCTGGATCGAGCAGGAAGGTCCTGAGTACTGGGATGGAGAGACCAGGAA
GGTGAAAGCTCACAGTCAGACCCACAGAGTTGACCTTGGAACACTGAGAGGCTACTACAACCAGTCTGAGGCAGGCAGCCACACAG
TGCAGAGGATGTATGGCTGTGATGTTGGCAGCGACTGGAGGTTCCTGAGAGGCTACCATCAGTATGCCTACGATGGCAAGGACTAC
ATTGCTCTGAAGGAGGACTTGAGAAGCTGGACAGCAGCTGACATGGCAGCACAGACCACCAAGCACAAGTGGGAAGCTGCTCATGT
TGCTGAGCAACTGAGAGCCTATCTGGAAGGCACCTGTGTGGAGTGGTTGAGACGCTATCTGGAGAATGGCAAGGAGACCTTGCAGA
GAACCGATTCCCCAAAGGCTCATGTGACCCGTCACAGCAG

Рис. 4. *Фрагмент нуклеотидной последовательности секвенированного ампликона геномной ДНК мыши линии HLA-A*02:01, выделенной из лейкоцитов. Ампликон получен с использованием пары праймеров b2mF/mEx4R (табл. 1). Красным шрифтом выделен сайт для связывания аллельспецифичного праймера A02-R1.*
Примечание: *Hb2mg-Linker-A*02:01-H2, заливка блоков соответствует фрагменту генной конструкции.*
Fig. 4. *Fragment of the nucleotide sequence of the sequenced amplicon of the mouse genomic DNA of the HLA-A*02:01 line isolated from leukocytes. The amplicon was obtained using a pair of b2mF/mEx4R primers (Table 1). The site for binding the allele-specific primer A02-R1 is highlighted in red font.*
Note: *Hb2mg-Linker-A*02:01-H2, the color of the blocks corresponds to the fragment of the gene construction.*

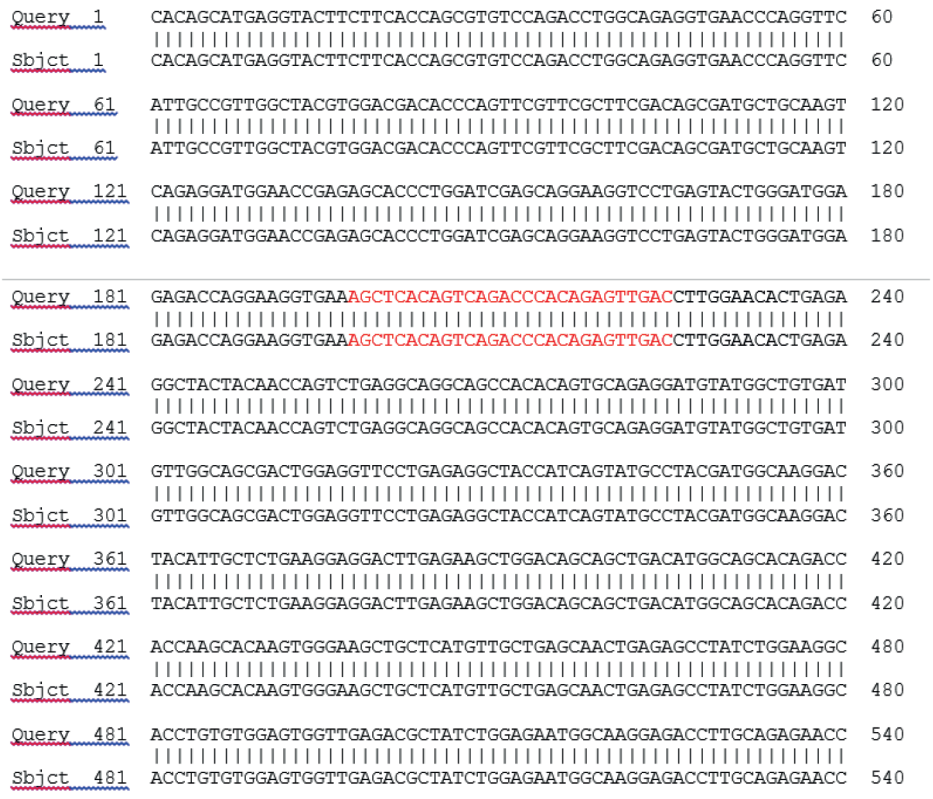

Рис. 5. *Выравнивание полученной при секвенировании нуклеотидной последовательности (Query) с последовательностью фрагмента HLA-A*02:01 генетической конструкции (Sbjct). Онлайн-приложение BLAST (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).*

Fig. 5. *Alignment of the nucleotide sequence (Query) obtained during sequencing with the sequence of the HLA-A*02:01 fragment of the genetic construct (Sbjct). The online BLAST app (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi).*

конструкции. 100% совпадение с фрагментом интегрированного трансгена. Аналогичный результат получен при секвенировании ДНК, выделенной из селезенки и печени.

2. Мыши трансгенной гуманизированной линии HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02.

На рис. 6 представлены примеры сиквенса с прямым праймером нуклеотидной последовательности трансгена *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02*, полученной из образцов иммунокомпетентных органов и тканей — лимфоцитов крови, печени и селезёнки. Сравнение проводили выравниванием полученных сиквенсов относительно нуклеотидных последовательностей генных конструкций, соответствующих линиям трансгенных животных. В работе использовали программу Vector NTI, приложение Align.

В геномной ДНК исследуемых тканей трансгенных мышей гуманизированных линий подтверждено наличие фрагментов, соответствующих основным компонентам генной конструкции: ***структурная часть гена β2-микроглобулина человека, соединенная глицин-сериновым линкером с α1- и α2-доменами молекулы HLA соответствующего аллеля. Проведено сравнение полученных сиквенсов.***

Результат: амплифицированный и прочтенный в прямом и обратном направлениях фрагмент кДНК содержит полные после-

Рис. 6. *Выравнивание нуклеотидных последовательностей фрагментов HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, входящих в состав генно-инженерных конструкций. Скриншоты окна Vector NTI. В рамках – высокополиморфные последовательности, которым соответствуют аллель-специфичные обратные праймеры, прочие аллель-специфичные фрагменты для HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 - размыты.*

Fig. 6. *Alignment of nucleotide sequences of fragments of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02, which are part of genetically engineered structures. Screenshots of the Vector NTI window. Within the framework are highly polymorphic sequences, which correspond to allele-specific reverse primers, other allele-specific fragments for HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 are blurred.*

довательности *HLA-A*02:01, HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02*, генных конструкций, фланкированных соответственно конструкциям. 100% совпадение с фрагментами интегрированных трансгенов. Аналогичный результат получен при секвенировании ДНК, выделенной из селезенки и печени.

Таким образом, полученные животные несут полный и транскрипционно активный трансген, целиком соответствующий заявленной генно-инженерной конструкции, и кодирующие α1- и α2-домены соответствующих аллелей гена *HLA* человека. Сравнение нуклеотидных последовательностей из разных органов расхождений в первичной структуре трансгена не выявлено.

Заключение

При создании новых линий трансгенных животных необходимо знать, каким образом будет осуществляться детекция трансгена в геноме организма и контроль качества новой линии. При использовании генно-инженерных конструкций с механизмом случайного встраивания трансгена его интеграция в состав ДНК осуществляется, как правило, в транскрипционно активные участки генома, что может внести изменения в функциональную активность данного региона [11] вплоть до нарушения работы собственных генов организма [13] или активации онкогенов [7]. ДНК региона встраивания также может негативно влиять на работу трансгена, приводя к неконтролируемой экспрессии трансгена или, наоборот, его «замалчиванию» [15]. Постоянный генетический анализ поголовья животных необходим не только для контроля наличия гена интереса, но и для качественного отбора для размножения особей, которые максимально соответствуют задачам исследования. В качестве критериев могут выступать: плодовитость и репродуктивный потенциал, сила экспрессии трансгена, отсутствие физиологических и поведенческих побочных эффектов, наличие мутаций

и генетических перестроек. Контроль генетической чистоты и отбор наиболее перспективных особей и сублиний для размножения лежат в основе эффективной селекционно-генетической работы с новыми линиями мышей HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02.

При выведении мышей новых трансгенных линий, кроме верификации животных по целевым участкам ГИК (наличие β2-микроглобулина человека и аллель-специфического участка HLA), мы проводим контроль на наличие других функционально значимых фрагментов:

- CBH-промотор;
- посттрансляционный регуляторный элемент WPRE;
- сигнал полиаденилирования TK PA;
- H2K.

Нами разработаны методики верификации трансгена у животных новых гуманизированных трансгенных линий мышей-биомоделей HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 методом ПЦР в реальном времени с применением флуоресцентных зондов. Это позволяет быстро и качественно идентифицировать трансгенных животных, а полученные результаты косвенно указывают на перспективность размножения животных отдельных сублиний на основании оценки уровня экспрессии целевого трансгена. Выбор метода обоснован его точностью, наглядностью получаемых результатов и высокой специфичностью используемых праймеров и зондов при детекции модификаций генома.

Метод позволяет за достаточно короткий срок провести скрининг большого количества животных для их использования в селекционно-генетической работе или иных исследовательских целях.

На основании полученных результатов можно сделать заключение, что выполненная нами работа позволила получить доказательства наличия ***структурной части гена β2-микроглобулина человека, соединенной глицин-сериновым линкером с α1-доменом молекулы HLA*** соответствующего аллеля, на уровне мРНК молекулярно-генетическим методом секвенирования по Сэнгеру.

Центральная догма молекулярной биологии, сформулированная Ф. Криком в 1958 году, а именно передача генетической информации происходит последовательно от ДНК к РНК, затем к белку, — является универсальным процессом для всех без исключения клеточных организмов и лежит в основе биосинтеза макромолекул, что мы показали в этой работе и продолжили доказательства наличия трансгенного белка у мышей-биомоделей иммунологическими методами, которые будут представлены в следующей статье данного выпуска журнала «Биомедицина».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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)].

2. 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. [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. *Biomeditsina* [*Journal Biomed*]. 2024;20(1):8–20. (In Russian)]. DOI: 10.33647/2074-5982-20-1-8-20.
3. 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)].
4. Петрова Н.В., Скрипкина М.М. Особенности организации содержания и выведения трансгенных линий мышей в НЦБМТ ФМБА России. *Биомедицина*. 2021;17(3E):70–75. [Petrova N.V., Skripkina M.M. Osobennosti organizacii soderzhaniya i vyvedeniya transgennyh linij myshej v NCBMT FMBA Rossii [Maintenance and Breeding of Transgenic Mouse Strains at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the FMBA of Russia]. *Biomeditsina* [*Journal Biomed*]. 2021;17(3E):70–75. DOI: 10.33647/2713-0428-17-3E-70-75.
5. 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 myshej 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)].
6. Хамаганова Е.Г., Леонов Е.А., Абдрахимова А.Р., Хижинский С.П., Гапонова Т.В., Савченко В.Г. HLA генетическое разнообразие русской популяции, выявленное методом секвенирования следующего поколения. *Медицинская иммунология*. 2021;23(3):509–522. [Khamaganova E.G., Leonov E.A., Abdrakhimova A.R., Khizhinsky S.P., Gaponova T.V., Savchenko V.G. HLA geneticheskoe raznoobrazie russkoj populyacii, vyyavlennoe metodom sekvenirovaniya sleduyushchego pokoleniya [HLA genetic diversity of the Russian population revealed by next-generation sequencing]. *Medical Immunology*. 2021;23(3):509–522. DOI: 10.15789/1563-0625-HDI-2182.
7. Giraldo P., Rival-Gervier S., Houdebine L.M., Montoliu L. The potential benefits of insulators on heterologous constructs in transgenic animals. *Transgenic Res*. 2003;12:751–755.
8. Gonzalez-Galarza F.F., McCabe A., et al. Allele frequency net database (AFND) 2020 update: gold-standard data classification, open access genotype data and new query tools. *Nucleic Acids Res*. 2020;48(D1):D783-D788. DOI: 10.1093/nar/gkz1029.
9. Goulder P.J.R., Walker B.D. HIV and HLA Class I: an evolving relationship. *Immunity*. 2012;37(3):426–440. doi: 10.1016/j.immuni.2012.09.005.
10. Lima-Junior J. da C., Pratt-Riccio L.R. Major Histocompatibility Complex and Malaria: Focus on Plasmodium vivax Infection. *Front Immunol*. 2016;7:13. DOI: 10.3389/fimmu.2016.00013.
11. Ma L., Wang Y., Wang H., Hu Y., Chen J., Tan T., Hu M., Liu X., Zhang R., Xing Y., Zhao Y., Hu X., Li N. Screen and Verification for Transgene Integration Sites in Pigs. *Sci. Rep*. 2018;8(1):7433.
12. Mazzaccaro R.J., Gedde M., Jensen E.R., van Santen H.M., Ploegh H.L., Rock K.L., Bloom B.R. Major histocompatibility class I presentation of soluble antigen facilitated by Mycobacterium tuberculosis infection. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 1996;93(21):11786–11791. DOI: 10.1073/pnas.93.21.11786.
13. Schroder A.R.W., et al. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110:521–529.
14. Wang C., Xiong C., Hsu Y.-C., Wang X., Chen L. Human leukocyte antigen (HLA) and cancer immunotherapy: HLA-dependent and -independent adoptive immunotherapies. *Annals of Blood*. 2020;5:14. DOI: 10.21037/aob-20-27.
15. Yang D.S., et al. Expression of Huntington's disease protein results in apoptotic neurons in the brains of cloned transgenic pigs. *Hum. Mol. Genet*. 2010;19:3983–3994.
16. https://hla.alleles.org/nomenclature/naming.html

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

Слободенюк Владимир Владимирович, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: prof-v-iprim@mail.ru

Vladimir V. Slobodenyuk, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: prof-v-iprim@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

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

Ларюшина Надежда Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: kichi09@mail.ru

Nadezhda A. Laryushina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: kichi09@mail.ru

Васильева Ирина Андреевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: rozhstul@mail.ru

Irina A. Vasil'eva, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: rozhstul@mail.ru

Петров Дмитрий Валерьевич, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Dmitriy V. Petrov, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: 1941-65@mail.ru

Болотских Любовь Александровна, к.с.-х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Lyubov' A. Bolotskih, Cand. Sci. (Agricult.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lyuba.bolotskikh@mail.ru

Савина Мария Анатольевна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: graff22@mail.ru

Maria A. Savina, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: graff22@mail.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author