

ДОКАЗАТЕЛЬСТВО НАЛИЧИЯ ЦЕЛЕВЫХ БЕЛКОВ — β2m hom И HLA У ГУМАНИЗИРОВАННЫХ ТРАНСГЕННЫХ МЫШЕЙ ЛИНИЙ HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 И HLA-C*07:02

В.Н. Каркищенко, А.Г. Берзина*, Н.В. Петрова, И.А. Помыткин, Е.С. Глотова,
Д.В. Петров, Л.А. Таболякова, Л.А. Болотских, Н.А. Ларюшина

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

Человеческий лейкоцитарный антиген играет первостепенное значение в формировании иммунного ответа и патогенезе заболеваний различной этиологии, в т.ч. при развитии негативных побочных эффектов на фармакологические препараты. Современные стандарты фармакобезопасности требуют совершенствования существующих тест-систем для проведения качественных доклинических исследований. В НЦБМТ ФМБА России был разработан и создан ряд гуманизированных трансгенных линий мышей, несущих гибридные молекулы HLA I класса на поверхности клеток, которые соответствуют аллельным вариантам человека *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02*. В данной статье представлены экспериментальные данные по количественному определению белка β2-микроглобулина человека и результаты определения HLA «сэндвич»-методом ИФА у мышей, несущих разные аллели генов HLA I класса. Полученные данные подтверждают наличие целевых функциональных белков (трансгенность) у гуманизированных трансгенных мышей, что согласуется с данными, полученными нами при определении первичной последовательности трансгена методом секвенирования по Сэнгеру. Кроме того, в работе рассматривается научно-практическая значимость таких биомоделей и область их применения.

Ключевые слова: иммунопероксидазный конъюгат, ИФА, «сэндвич»-метод, гуманизированные трансгенные мыши, β2-микроглобулин, HLA A-, B-, C-

Конфликт интересов: авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: государственное задание по теме «Получение новой линии гуманизированных трансгенных мышей, несущих ген *HLA-A*рХ* человека и нокаут комплекса H-2K мыши» (шифр: «Транскокаут-2024») ФГБУН НЦБМТ ФМБА России.

Для цитирования: Каркищенко В.Н., Берзина А.Г., Петрова Н.В., Помыткин И.А., Глотова Е.С., Петров Д.В., Таболякова Л.А., Болотских Л.А., Ларюшина Н.А. Доказательство наличия целевых белков — β2m hom и HLA у гуманизированных трансгенных мышей линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. *Биомедицина*. 2024;20(2):32–44. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-32-44>

Поступила 04.03.2024

Принята после доработки 20.05.2024

Опубликована 10.06.2024

EVIDENCE FOR THE PRESENCE OF β2m hom TARGET PROTEINS AND HLA IN HUMANIZED TRANSGENIC MICE OF HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, AND HLA-C*07:02 LINES

Vladislav N. Karkischenko, Asya G. Berzina*, Nataliya V. Petrova, Igor A. Pomytkin,
Elena S. Glotova, Dmitry V. Petrov, Lidiya A. Taboyakova,
Lubov' A. Bolotskih, Nadezhda A. Laryushina

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

Human leukocyte antigen plays a primary role in the formation of immune response and pathogenesis of diseases of various etiologies, including the development of negative side effects induced by pharmacological agents. Modern pharmacosafety standards require improvement of existing test systems to conduct high-quality preclinical studies. A number of humanized transgenic mouse lines with hybrid HLA I class molecules on the cell surface, which correspond to the human allelic variants *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, and *HLA-C*07:02*, were developed at the Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia. In this article, we present experimental data on quantitative determination of $\beta 2$ -microglobulin protein and HLA by the “sandwich” ELISA method in mice with different alleles of HLA I class genes. The results obtained confirm the presence of target functional proteins (transgenicity) in humanized transgenic mice, which is consistent with our previous data obtained when determining the primary sequence of the transgene using Sanger sequencing. We also discuss the scientific and practical significance of such biomodels, as well as the scope of their application.

Keywords: immunoperoxidase conjugate, ELISA, sandwich method, humanized transgenic mice, $\beta 2$ -microglobulin, HLA A-, B-, C-

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 V.N., Berzina A.G., Petrova N.V., Pomytkin I.A., Glotova E.S., Petrov D.V., Tabolyakova L.A., Bolotskih L.A., Laryushina N.A. Evidence for the Presence of $\beta 2m$ hom Target Proteins and HLA in Humanized Transgenic Mice of HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, and HLA-C*07:02 Lines. *Journal Biomed.* 2024;20(2):32–44. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-20-2-32-44>

Submitted 04.03.2024

Revised 20.05.2024

Published 10.06.2024

Введение

С момента открытия технологии направленного редактирования генома исследователи получили мощный инструмент для решения широкого круга фундаментальных и прикладных задач, начиная от исследований на молекулярно-генетическом уровне до создания живых организмов с заданными свойствами. Манипуляции с геномом позволили ученым выйти на новый уровень планирования и проведения исследований, что способствовало созданию биомodelей, удовлетворяющих условиям каждого отдельно взятого эксперимента. Особое место заняли т.н. гуманизированные модели — биомodelи со встроенным в геном организма животного геном человека. Исследования, проведённые на гуманизированных организмах, позволяют получить

наиболее полное представление об особенностях нормального строения и работы отдельных генов, регуляции их экспрессии и сигнальных путях, проследить роль генов в филогенезе и онтогенезе, а также патогенезе заболеваний и пр. Использование гуманизированных биомodelей на сегодня — важный инструмент в арсенале трансляционной медицины, являясь кратчайшим и наиболее корректным способом экстраполяции результатов научных изысканий на человека.

Однако при создании трансгенных биомodelей необходима система контроля и валидации используемых методов. Манипуляции с генами могут приводить к возникновению многих побочных эффектов, в т.ч. таких, как встраивание трансгена в транскрипционно неактивную область,

утрата функциональных частей исходной генно-инженерной конструкции, нарушение транскрипции и сборка нефункционального продукта. Оценить активность трансгена на каждом уровне реализации генетической информации (ДНК, мРНК, белок) позволяют методы молекулярной биологии, биохимии, иммунологии и многие другие.

В НЦБМТ ФМБА России были созданы гуманизированные трансгенные линии мышей, несущих ген главного комплекса гистосовместимости (МНС) человека I класса (HLA I класса) на поверхности клеток. Данный комплекс стабилизируется молекулой β 2-микроглобулина человека, «сшитого» глицин-сериновым линкером с α 1-доменом HLA. Созданные биомодели демонстрируют аллельные варианты *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02* человека.

Особую важность для многих исследований имеет необходимость не только качественно оценить наличие трансгена, но и количественно измерить генный продукт. Для каждой созданной линии мышей с геном *HLA (A*02:01, B*07:02, C*07:02)* в НЦБМТ ФМБА России были разработаны методики детекции целевого трансгена с помощью ПЦР в реальном времени, которые позволяют быстро произвести скрининг поголовья животных. Кроме того, методом секвенирования по Сэнгеру было показано отсутствие химеризма и полное соответствие трансгена заявленной генно-инженерной конструкции и исходному гену человека [2]. Однако отсутствие зависимости транскрипционной активности региона (т.е. количества мРНК) и содержания продуктов генов (в нашем случае, белка HLA и β 2-микроглобулина человека) не позволяет констатировать наличие искомым белков, что требует применения эффективных и высокочувствительных методов детекции.

Перспективным направлением работы в данной области является разработка иммунохимических методов, позволяющих

не только качественно показать наличие белкового продукта, но и количественно оценить его содержание в биологических образцах. На сегодня таким требованиям наиболее полно отвечает «сэндвич»-вариант иммуноферментного анализа (ИФА). При постановке данного метода на твердой фазе — поверхности лунок полистирольных планшетов — иммобилизуют первичные антитела с их последующей блокировкой. Далее в лунки вносят исследуемое вещество, содержащее антиген, и инкубируют. Образовавшийся на твердой фазе комплекс антиген-антитело отмывают от несвязавшегося антигена и добавляют меченные ферментом антитела, специфичные к определяемому антигену. Затем вносят субстрат и проводят детекцию путем измерения оптической плотности окрашенного продукта ферментативной реакции. «Сэндвич»-вариант ИФА позволяет с высокой точностью определить наличие целевых молекул в различных биологических жидкостях и экстрактах из клеток и тканей. Измерение оптической плотности в результате реакции позволяет произвести расчет количества определяемого белка в пробах, поскольку его концентрация прямо пропорциональна количеству фермента, присутствующего в лунке. Для выполнения таких расчетов в эксперимент необходимо включать калибровочную кривую, которая создается путем сопоставления измеряемой оптической плотности (ОП) с известными концентрациями целевого белка [13].

Стадия «узнавания» анализируемого соединения специфическим к нему антителом происходит в строго количественном соотношении, которое зависит от аффинности, концентрации компонентов и условий проведения реакции. Для доказательства наличия белков β 2m hom и HLA в биоматериале, полученном от трансгенных мышей, нами были разработаны тест-системы для определения этих белков «сэндвич»-методом ИФА. С применением коммерческого препарата рекомбинантного белка β 2m hom удалось количественно опреде-

лить искомый белок в сыворотках крови трансгенных мышей по калибровочной кривой. Использование в работе коммерческих препаратов моноклональных антител к HLA ABC дало возможность достоверно идентифицировать эти белки в экстрактах селезенки гуманизированных мышей.

Обнаружение искомых белков в биоматериале, полученном от животных линий, несущих гены человека — ген *HLA* и ген $\beta 2$ -микроглобулина человека, является прямым доказательством не только экспрессии трансгена и трансляции целевых белков (т.е. трансгенности), но и их соответствия по антигенным свойствам исходным белкам человека (т.е. гуманизированности).

Целью настоящей **работы** явилось определение белков HLA-A*02:01, HLA-B*07:02, HLA-C*07:02 в экстрактах селезенки трансгенных мышей и количественное определение белка $\beta 2m$ hom в сыворотках крови соответствующих трансгенных линий, полученных в НЦБМТ ФМБА России, с применением «сэндвич»-метода ИФА.

Материалы и методы

Экспериментальные животные

В работе использовались мыши трёх гуманизированных трансгенных линий с интегрированными генами *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02* и *HLA-C*07:02*, представляющих аллели человеческого МНС I класса *HLA A*-, *B*- и *C*- соответственно, полученные в ФГБУН НЦБМТ ФМБА России [1, 3, 4], а также гибриды F1 CBA/lac $\times$ C57BL/6, полученные из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, которые являются генетическим фоном для всех анализируемых в данной работе трансгенных линий (для удобства чтения в тексте обозначены как WT или F1). Для получения F2 и следующих поколений племядра формировали из подтверждённых особей предыдущего поколения по технологии инбредного скрещивания. Животные соот-

ветствовали категории улучшенных конвенциональных. Группы формировались методом пар-аналогов, по 6 особей в каждой. Сформированные группы содержались в системе индивидуальных вентилируемых клеток при световом режиме 12/12, со свободным доступом к пище и воде, по 2 мыши в клетке. Условия содержания соответствовали стандартным зоотехническим нормам, применяемым для лабораторных мышей.

Биоматериал для анализа

В качестве источника антигенов использовали сыворотку крови, а также биопатат селезенки экспериментальных животных — подтверждённых (по данным ПЦР-РВ) носителей трансгена HLA A-, B-, и C-.

«Сэндвич»-вариант ИФА для определения HLA A-, B-, C-

Разработку тест-системы («сэндвич»-вариант ИФА) для определения HLA A-, B-, C- проводили с использованием коммерческих моноклональных антител — mAb to HLA Class I к HLA ABC ab 155381 (“Abcam”, Китай), а также набора для определения МНС методом ИФА (человек) (“Cloud-Clone Corp.”, Китай). Конъюгацию антител с пероксидазой хрена (“Sigma-Aldrich”, США) проводили периодатным методом [18].

«Сэндвич»-вариант ИФА для количественного определения $\beta 2$ -микроглобулина человека ($\beta 2m$ hom)

Тест-систему для количественного определения $\beta 2m$ hom разрабатывали с применением поликлональных антител к $\beta 2m$ hom, полученных от морских свинок, иммунизированных коммерческим препаратом рекомбинантного белка $\beta 2m$ hom (“Cloud-Clone Corp.”, Китай) по схеме, представленной в работе [28]. Титр антител к $\beta 2m$ hom в сыворотках крови морских свинок определяли непрямой метод ИФА с применением антивидового иммунопероксидазного конъюгата Anti-Guinea Pig+Ph (“Sigma-Aldrich”, США).

Получение иммунопероксидазного конъюгата осуществлялось периодатным методом.

Оптимизация условий постановки ИФА

Определение оптимальных концентраций раствора антител, применяющегося для сенсибилизации полистирольных планшетов, а также для оптимального разведения конъюгатов антител с ферментом осуществлялось в каждом конкретном случае экспериментально методом «шахматного» титрования. В качестве отрицательного контроля использовали сыворотку крови неиммунных мышей, а также экстракт селезёнки контрольных мышей WT (F1). С целью исключения ложноположительной реакции в ИФА осуществлялась экспериментальная подборка разведений экстрактов и сывороток крови. Блокировка неспецифической реакции осуществлялась раствором 0,3% бычьего сывороточного альбумина (БСА) в фосфатно-солевом буфере с Твин-20 (PBST) в стандартных условиях.

Регистрация результатов анализа ИФА

В качестве субстрата пероксидазы использовали р-р тетраметилбензидина (ТМБ, ООО «Абисенс», Россия). Оптическую плотность окрашенного продукта ферментативной реакции измеряли на планшетном мультимодальном ридере Feyond-A400 («Allsheng», Китай) при длине волны 450 нм. Полученные значения оптической плотности (OP_{450}) представлены в оптических единицах (о.е.). Стандартизацию разработанных иммуноферментных тест-систем для определения $\beta 2m$ hom и HLA (A-, B-, C-) проводили с использованием тестов для проверки надежности, точности, специфичности и воспроизводимости, используя критерии, принятые для иммуноферментного анализа [17].

Иммунизации трансгенных мышей

В эксперименте участвовали 4 группы (n=6) мышей в возрасте 2 мес.: I (HLA-A*02:01), II (HLA-B*07:02), III

(HLA-C*07:02) группы — трансгенные мыши, IV группа — контроль (WT, гибриды F1 CBA/lac × C57BL/6, генетический фон для всех анализируемых в данной работе трансгенных линий). Животные содержались в одинаковых условиях по 2 особи в каждой клетке. С целью активации иммунной системы мыши получали одну подкожную инъекцию антигена — коммерческого препарата IgG horse («Sigma-Aldrich», США) в дозе 25 мкг на мышь. Антиген вводили в физ. р-ре в смеси 1:1 с полным адъювантом Фрейнда («Sigma Aldrich», США). Объем инъекции суммарно составил 0,1 мл. На 7-й день после иммунизации у всех животных производился прижизненный забор крови из ретроорбитального сплетения в объеме 0,2 мл.

Образцы сыворотки крови

Кровь брали в пробирки с активатором свёртывания, затем выдерживали 30 мин при комнатной температуре. Сыворотку крови для определения $\beta 2$ -микроглобулина человека «сэндвич»-методом ИФА у мышей отделяли центрифугированием при 3000 об./мин в течение 15 мин, после чего супернатанты использовали немедленно: в двукратном разведении вносили в лунки полистирольных планшетов («Dynatech», Швейцария) для проведения ИФА.

Экстракты ткани селезенки для определения HLA A-, B-, C-

Перед анализом ткань селезенки промывали ледяным р-ром PBS для тщательного удаления крови. 100–150 мг ткани измельчали на стекле лезвием на мелкие кусочки и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе с добавлением PBS в соотношении 1:5. Полученную суспензию подвергали двум циклам замораживания оттаивания для дальнейшего разрушения клеточных мембран, затем гомогенат центрифугировали в течение 15 мин при 1500 g (или 5000 об./мин). Супернатант немедленно использовали для анализа или делали аликваты для длительного хранения при -80°C.

Обработка данных

Статистический анализ результатов проводили параметрическими и непараметрическими методами с использованием пакета программ ANOVA.

Результаты и обсуждение

Содержание $\beta 2m$ hom в сыворотке крови

Иммунизация морских свинок коммерческим препаратом $\beta 2m$ hom позволила получить моноспецифическую антисыворотку с титром антител 1:200 000 (по данным непрямого метода ИФА). На основе поликлональных антител морской свинки к $\beta 2m$ hom был получен иммунопероксидазный конъюгат для количественного определения $\beta 2m$ hom с помощью «сэндвич»-метода ИФА.

В результате подбора условий для проведения эксперимента была выбрана оптимальная концентрация антител для сенсibilизации полистирольных планшетов — 2 мкг/мл и оптимальная концентрация меченных ферментом антител — 2,5 мкг/мл. На рис. 1 представлена калибровочная кривая для ИФА определения $\beta 2m$ hom в коммерче-

ском препарате $\beta 2m$ hom. Чувствительность теста составила 10 нг/мл.

По калибровочной кривой (рис. 1) на основе полученных данных в результате анализа сывороток крови экспериментальных мышей была определена концентрация $\beta 2m$ hom (средняя для каждой группы). Так, для группы I (HLA-A*02:01) эта величина составила 1750 нг/мл, в группах II (HLA-B*07:02) и III (HLA-C*07:02) — 1000 и 1500 нг/мл соответственно. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений показал статистически значимое отличие для всех указанных трансгенных линий ($p < 0,001$ – $0,0001$) по сравнению с контрольными мышами во всем диапазоне разведений сыворотки крови мышей. Полученные данные явно показывают наличие функционально активного белка $\beta 2$ -микроглобулина человека в сыворотке крови у анализируемых линий гуманизированных трансгенных мышей HLA-A*02:01 (рис. 2А), HLA-B*07:02 (рис. 2Б) и HLA-C*07:02 (рис. 2В), т.е., трансгенность.

Специфичность реакции с полученными нами антителами к коммерческому

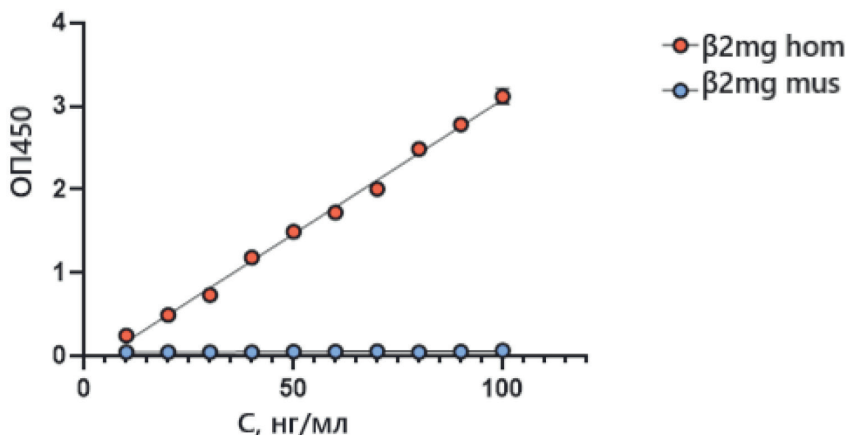


Рис. 1. Калибровочная кривая для ИФА определения «сэндвич»-методом белка $\beta 2m$ hom в коммерческом препарате $\beta 2m$ hom. Контроль — $\beta 2$ -микроглобулин мыши $\beta 2m$ mus.

Fig. 1. Calibration curve for determination of $\beta 2m$ hom protein using the ELISA sandwich method in a commercial $\beta 2m$ hom preparation. Control — mouse $\beta 2$ -microglobulin $\beta 2m$ mus.

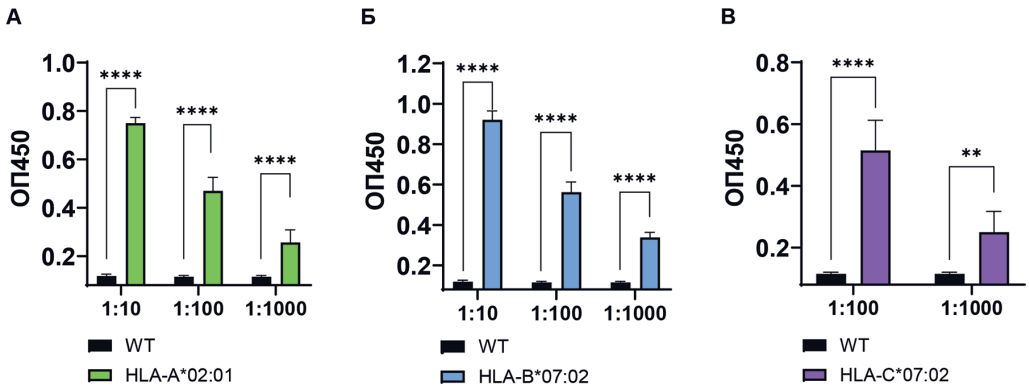


Рис. 2. Определение β 2-микροглобулина человека в сыворотке крови «сэндвич»-методом ИФА у мышей линий HLA-A*02:01 (А), HLA-B*07:02 (Б) и HLA-C*07:02 (В). Среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=6$). ** — $p<0,01$, **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения сыворотки крови.

Fig. 2. Determination of human β 2-microglobulin in the blood serum of mice of the HLA-A*02:01 (A), HLA-B*07:02 (Б), and HLA-C*07:02 (B) lines by the “sandwich” ELISA method. Mean $\pm$ standard deviation ($n=6$). ** — $p<0,01$, **** — $p<0,0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows blood serum dilutions.

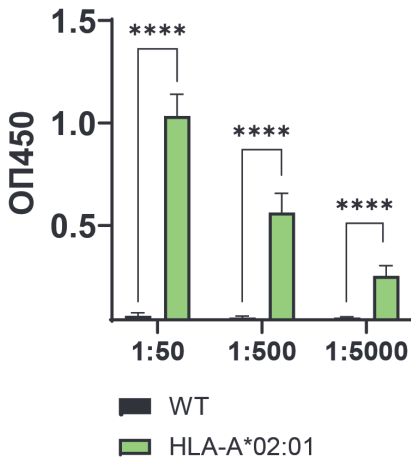


Рис. 3. Определение HLA-A в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 3. Determination of HLA-A in spleen extracts of HLA-A*02:01 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean $\pm$ standard deviation ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

β 2m hom доказывает полное соответствие трансгена β 2m hom по антигенным свойствам исходному гену β 2-микροглобулина человека, т.е. гуманизированность животных по гену β 2m hom.

Содержание HLA (A-, B-, C-) в экстрактах селезёнки

Для определения HLA (A-, B-, C-) был получен иммунопероксидазный конъюгат на основе моноклональных антител к соответствующему типу HLA.

На рис. 3 представлены результаты количественного определения содержания белка HLA A- у трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 в сравнении с мышами F1 (WT). Из полученных данных следует, что ОП₄₅₀ в опытных образцах существенно превышает аналогичные показатели в контроле — селезенке мышей дикого типа. Так, при разведении экстракта 1:50, ОП₄₅₀ у трансгенных мышей линии HLA-A*02:01 составила 1,10 о.е., в то время как в контроле средние значения ОП₄₅₀ составили 0,05 о.е., что соответствует фоновым значениям для данного метода.

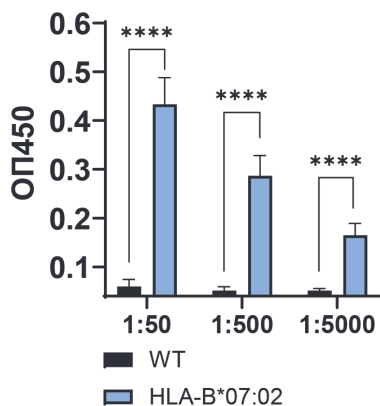


Рис. 4. Определение HLA-B в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-B*07:02 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 4. Determination of HLA-B in spleen extracts of HLA-B*07:02 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean $\pm$ standard deviation ($n=6$).

**** — $p<0.0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

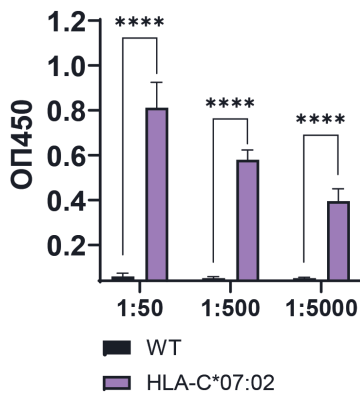


Рис. 5. Определение HLA-C в экстрактах селезенки трансгенных мышей линии HLA-C*07:02 «сэндвич»-методом ИФА. Среднее $\pm$ стандартное отклонение ($n=6$). **** — $p<0,0001$ (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака).

Примечание: на оси абсцисс показаны разведения экстракта селезенки.

Fig. 5. Determination of HLA-C in spleen extracts of HLA-C*07:02 transgenic mice by the “sandwich” ELISA method. Mean $\pm$ standard deviation ($n=6$).

**** — $p<0.0001$ (two-way ANOVA, Sidak post hoc test).

Note: x-axis shows the dilutions of spleen extract.

Аналогичные данные были получены при исследовании образцов селезенки, полученных от мышей линии HLA-B*07:02: при разведении гомогената 1:50 ОП₄₅₀ у трансгенных мышей линии HLA-B*07:02 составила 0,45 о.е., в то время как в контроле средние значения ОП₄₅₀ оставались на уровне фона — 0,05 о.е. (рис. 4). Достоверность полученных результатов подтверждается двухфакторным дисперсионным анализом ANOVA с достоверностью $p<0,0001$.

При исследовании образцов селезенки, полученных от гуманизированных трансгенных животных линии HLA-C*07:02, экспериментальные данные также подтвердили высокое содержание белка HLA-C и его отсутствие у особей WT (рис. 5), ОП₄₅₀ в опытных образцах существенно превышает аналогичные показатели в контроле: при разведении гомогената 1:50 ОП₄₅₀

у трансгенных мышей линии HLA-C*07:02 составила 0,80 о.е. против 0,05 о.е.

Проведённые нами исследования наглядно подтверждают наличие линии специфических белков HLA у мышей новых гуманизированных трансгенных линий HLA-A*02:01, HLA-B*07:02 и HLA-C*07:02. Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений показал статистически значимое отличие для всех указанных трансгенных линий ($p<0,0001$) по сравнению с мышами WT во всем диапазоне разведений экстрактов селезенки. Использование качественных коммерческих моноклональных антител к аллелям HLA при разработке тест-системы ИФА, а также подбор оптимальных условий для постановки реакции позволили с высокой степенью надёжности и достоверности доказать наличие у экспериментальных животных заявленных ха-

рактеристик — трансгена *HLA* и его полное соответствие по антигенным свойствам исходному гену человека, т.е. трансгенность и гуманизированность по соответствующему линии гену *HLA*.

Заключение

Биомоделирование является неотъемлемой частью прогресса во многих областях, включая фармакологию, изучение иммунных реакций и исследования в области токсичности и безопасности. Адекватный выбор биомодели определяет возможность получения интересующих данных, а также их корректность и транслируемость на другие биологические виды, включая человека. Несмотря на существенный прогресс в использовании альтернативных методов, ни один из них не позволяет даже приблизиться к результатам, которые можно получить на живых организмах. Рациональный подход и грамотный подбор биомодели определяют ход всего исследования, возможность использования инструментальных методов и тестов.

Потребности различных отраслей науки в биомоделях всё расширяются, а экспертам нужны биомодели нового уровня — максимально воспроизводящие особенности патологии, заболевания и пр., но при этом экономически эффективные и простые в поддержании. Наиболее популярным объектом в лабораториях всего мира является мышь: физиолого-анатомически и биохимически близка к человеку, быстро размножается и даёт до 6–10 поколений за год, удобна для содержания и исследования. Однако с открытием процесса гомологичной рекомбинации и получением первых нокаутных и трансгенных животных возможности учёных в плане биомоделирования существенно возросли. Более того, исследования в области популяционной медицины и появление фармакогенетики обосновали необходимость использования гуманизированных биомodelей, воспроизводящих особенности генотипов различных групп населения при исследова-

ниях в области фармакобезопасности и тестировании эффективности новых препаратов. Особую роль играют гены главного комплекса гистосовместимости, которые определяют возможности иммунного ответа организма и участвуют в формировании ответа организма на лекарственные агенты.

Полиморфизм системы *HLA*, свойственный конкретной популяции, служит отправным моментом в комплексном изучении многих заболеваний. У людей гены *HLA* I класса играют решающую роль в реакции отторжения трансплантата органа и реакции «трансплантат против хозяина» после трансплантации гемопоэтических стволовых клеток [25, 31]. Также была показана связь между *HLA* I класса и различными аутоиммунными заболеваниями [7, 9, 21, 24], а также инфекционными заболеваниями [26] и развитием негативных побочных эффектов на приём лекарственных препаратов [12, 16]. Помимо первостепенной роли *HLA* в формировании адаптивного иммунного ответа, была показана роль МНС класса I в качестве регулятора при поддержании беременности, выборе партнёра и распознавании родственников [30], а также при выборе полового партнёра и предотвращении инбридинга [14]. Кроме того, гены *HLA* I класса оказывают влияние на развитие и пластичность центральной нервной системы [6, 8, 11, 19, 29], взаимодействие нервных клеток [15, 22], синаптические функции и поведение [10, 27], в т.ч. формирование некоторых неврологических и психических расстройств [5, 20, 23]. Эти особенности *HLA* I класса показывают особое положение этих генов и необходимость детального их изучения, что приводит нас к актуальности создания и поддержания биомodelей, несущих аллельные варианты классических и неклассических генов *HLA* I класса.

В связи с нестабильной геополитической обстановкой возможность получения интересующих линий животных из зарубежных источников сильно ограничена как слож-

ностями в логистике, так и за пределами высокой стоимостью генно-модифицированных животных, что приводит нас к необходимости обеспечения технологического суверенитета и развитию собственных центров получения и поддержания животных-биомоделей.

В ФГБУН НЦБМТ ФМБА России был создан ряд линий мышей, гуманизированных и трансгенных по генам классического *HLA* I класса (*A*-, *B*- и *C*-). Данные животные несут в геноме генетическую конструкцию, кодирующую химерную молекулу главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I на поверхности клеток, состоящую из $\alpha 1$ -, $\alpha 2$ -доменов *HLA* человека и $\alpha 3$ -домена комплекса *H-2K* мыши, стабилизированную $\beta 2$ -микроглобулином человека, соединённым глицин сериновым линкером с $\alpha 1$ -доменом *HLA*.

В данной работе нами проведены исследования, доказывающие состоятельность созданных биомоделей и их соответствие заявленным характеристикам по наличию функционально активного *HLA* I класса, стабилизированного $\beta 2$ -микроглобулином человека. Определение $\beta 2m$ hom в сыворотках крови трансгенных мышей, предварительно иммунизированных иммуноглобулином лошади с целью активации иммунной системы, показало наличие $\beta 2m$ hom в концентрациях от 1000 до 1750 нг/мл, а результаты определения *HLA A*-, *B*- и *C*- в селезенке трансгенных мы-

шей линий *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* соответственно методом «сэндвич» ИФА наглядно подтвердили наличие белка *HLA* (*A*-, *B*- или *C*-) в экстрактах селезенки всех трех групп экспериментальных животных. Полученные нами данные согласуются с результатами определения первичной последовательности трансгена, полученными методом секвенирования по Сэнгеру (см. статью «Доказательства трансгенности и гуманизированности у мышей, полученных в НЦБМТ ФМБА России, методом секвенирования по Сэнгеру» в этом номере журнала), т.е. доказывают наличие функционально активного трансгена не только на уровне транскрипции (мРНК), но и на уровне целевого белка.

Таким образом, созданные на базе НЦБМТ ФМБА России гуманизированные трансгенные линии мышей *HLA-A*02:01*, *HLA-B*07:02*, *HLA-C*07:02* отвечают заявленным характеристикам и могут быть использованы для исследований, направленных на решение широкого спектра научно-практических задач, включая исследования иммунных реакций, инфекционных, аутоиммунных и онкологических заболеваний, разработку и тестирование вакцин и исследования в области фармакобезопасности и иммуногенности, а также для создания мультитрансгенных животных, несущих несколько разных аллелей *HLA* I класса, для обеспечения качественных исследований на новом уровне.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ | REFERENCES

1. 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., Bolotskikh L.A., Kapanadze G.D., Karkischenko N.N., Koloskova E.M., Maksimenko S.V., Matveyenko E.L., Petrova N.V., Ryabiyh V.P., Revyakin A.O., Stankova N.V., Semenov H.H. Sozdanie linij transgennykh zhivotnykh-modelej s genami cheloveka *NAT1* i *NAT2* [Creation of lines of transgenic animal models with human *NAT1* and *NAT2* genes]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2016;1:74–84. (In Russian)].
2. 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 novoy transgennoj gumanizirovan-

- noj po *HLA-A*02:01:01:01* i h2m linii myshej [Genetic Screening of a New Transgenic Mice Line Humanized for *HLA-A*02:01:01:01* and h2m]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2023;19(3E):10–24. (In Russian)].
3. 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. Principy sozdaniya genno-inzhenernoj konstrukcii dlya polucheniya gumanizirovannykh transgennykh myshej, nesushchih gen *HLA-S*07:02:01:01*, kak proobraz innovacionnykh transgenno-nokautnykh biomodelej [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]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2024;20(1):8–20. (In Russian)].
 4. 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 novoy gumanizirovannoj transgennoj linii myshej s integrirovannym genomom cheloveka *HLA A*02:01:01:01* [Embryological Aspects of Creation of a New Humanized Transgenic Mice with Integrated human *HLA A*02:01:01:01* gene]. *Biomedicina [Journal Biomed]*. 2022;18(4):10–23. (In Russian)].
 5. Bailey S.L., Carpentier P.A., McMahon E.J., Begolka W.S., Miller S.D. Innate and Adaptive Immune Responses of the Central Nervous System. *CRI*. 2006;26(2). DOI: 10.1615/CritRevImmunol.v26.i2.40.
 6. Boulanger L.M., Shatz C.J. Immune signalling in neural development, synaptic plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004;5(7):521–531. DOI: 10.1038/nrn1428.
 7. Cotsapas C., Voight B.F., Rossin E., et al. Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease. *PLoS Genet.* 2011;7(8):e1002254. DOI: 10.1371/journal.pgen.1002254.
 8. Cullheim S., Thams S. The microglial networks of the brain and their role in neuronal network plasticity after lesion. *Brain Research Reviews*. 2007;55(1):89–96. DOI: 10.1016/j.brainresrev.2007.03.012.
 9. Fernando M.M.A., Stevens C.R., Walsh E.C., et al. Defining the Role of the MHC in Autoimmunity: A Review and Pooled Analysis. Fisher EMC, ed. *PLoS Genet.* 2008;4(4):e1000024. DOI: 10.1371/journal.pgen.1000024.
 10. Goddard C.A., Butts D.A., Shatz C.J. Regulation of CNS synapses by neuronal MHC class I. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2007;104(16):6828–6833. DOI: 10.1073/pnas.0702023104.
 11. Huh G.S., Boulanger L.M., Du H., Riquelme P.A., Broetz T.M., Shatz C.J. Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity. *Science*. 2000;290(5499):2155–2159. DOI: 10.1126/science.290.5499.2155.
 12. Illing P.T., Vivian J.P., Dudek N.L., et al. Immune self-reactivity triggered by drug-modified HLA-peptide repertoire. *Nature*. 2012;486(7404):554–558. DOI: 10.1038/nature11147.
 13. Jagarlamudi K.K., Moreau L., Westberg S., Rönnerberg H., Eriksson S. A New Sandwich ELISA for Quantification of Thymidine Kinase 1 Protein Levels in Sera from Dogs with Different Malignancies Can Aid in Disease Management. *PLoS ONE*. 2015;10(9):e0137871. DOI: 10.1371/journal.pone.0137871.
 14. Jones J.S., Partridge L. Population genetics: Tissue rejection: the price of sexual acceptance? *Nature*. 1983;304(5926):484–485. DOI: 10.1038/304484a0.
 15. Matsuo R., Asada A., Fujitani K., Inokuchi K. LIRF, a Gene Induced during Hippocampal Long-Term Potentiation as an Immediate-Early Gene, Encodes a Novel RING Finger Protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001;289(2):479–484. DOI: 10.1006/bbrc.2001.5975.
 16. McCormack M., Alfirevic A., Bourgeois S., et al. *HLA-A*31:01* and Carbamazepine-Induced Hypersensitivity Reactions in Europeans. *New England Journal of Medicine*. 2011;364(12):1134–1143. DOI: 10.1056/NEJMoa1013297.
 17. Nagami K., Matsumoto H., Maki E., et al. Experimental methods for immunization and challenge in antigenicity studies in guinea pigs. *J. Toxicol. Sci.* 1995;20(5):579–594. DOI: 10.2131/jts.20.5.579.
 18. Nakane P.K., Kawaoi A. Peroxidase-labeled antibody a new method of conjugation. *J. Histochem. Cytochem.* 1974;22(12):1084–1091. DOI: 10.1177/22.12.1084.
 19. Ohtsuka M., Inoko H., Kulski J.K., Yoshimura S. Major histocompatibility complex (Mhc) class Ib gene duplications, organization and expression patterns in mouse strain C57BL/6. *BMC Genomics*. 2008;9(1):178. DOI: 10.1186/1471-2164-9-178.
 20. O’Keefe G.M., Nguyen V.T., Benveniste E.N. Regulation and function of class II major histocompatibility complex, CD40, and B7 expression in macrophages and microglia: Implications in neurological diseases. *Journal of NeuroVirology*. 2002;8(6):496–512. DOI: 10.1080/13550280290100941.
 21. Pandit L., Ban M., Sawcer S., et al. Evaluation of the established non-MHC multiple sclerosis loci in an Indian population. *Mult. Scler.* 2011;17(2):139–143. DOI: 10.1177/1352458510384011.
 22. Patiño-Lopez G., Hevezi P., Lee J., et al. Human class-I restricted T cell associated molecule is highly expressed in the cerebellum and is a marker for activated NKT and CD8⁺ T lymphocytes. *Journal of Neuroimmunology*. 2006;171(1–2):145–155. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2005.09.017.

23. Raha-Chowdhury R., Andrews S.R., Gruen J.R. CAT 53: A protein phosphatase 1 nuclear targeting subunit encoded in the MHC Class I region strongly expressed in regions of the brain involved in memory, learning, and Alzheimer's disease. *Molecular Brain Research*. 2005;138(1):70–83. DOI: 10.1016/j.molbrainres.2005.04.001.
24. Raychaudhuri S., Sandor C., Stahl E.A., et al. Five amino acids in three HLA proteins explain most of the association between MHC and seropositive rheumatoid arthritis. *Nat. Genet.* 2012;44(3):291–296. DOI: 10.1038/ng.1076.
25. Sasazuki T., Juji T., Morishima Y., et al. Effect of Matching of Class I HLA Alleles on Clinical Outcome after Transplantation of Hematopoietic Stem Cells from an Unrelated Donor. *N. Engl. J. Med.* 1998;339(17):1177–1185. DOI: 10.1056/NEJM 199810223391701.
26. The International HIV Controllers Study. The Major Genetic Determinants of HIV-1 Control Affect HLA Class I Peptide Presentation. *Science*. 2010;330(6010):1551–1557. DOI: 10.1126/science. 1195271.
27. Tonelli L.H., Postolache T.T., Sternberg E.M. Inflammatory genes and neural activity: involvement of immune genes in synaptic function and behavior. *FBL*. 2005;10(1):675–680. DOI: 10.2741/1562.
28. Wright P.F., Nilsson E., Van Rooij E.M.A., Lelenta M., Jeggo M.H. Standardisation and validation of enzyme-linked immunosorbent assay techniques for the detection of antibody in infectious disease diagnosis: -EN- -FR- -ES-. *Rev. Sci. Tech. OIE*. 1993;12(2):435–450. DOI: 10.20506/rst.12.2.691.
29. Xiao B.G., Link H. Immune regulation within the central nervous system. *Journal of the Neurological Sciences*. 1998;157(1):1–12. DOI: 10.1016/S0022-510X(98)00049-5.
30. Ziegler A., Kentenich H., Uchanska-Ziegler B. Female choice and the MHC. *Trends in Immunology*. 2005;26(9):496–502. DOI: 10.1016/j.it.2005.07.003.
31. Zinkernagel R.M., Doherty P.C. The discovery of MHC restriction. *Immunology Today*. 1997;18(1):14–17. DOI: 10.1016/S0167-5699(97)80008-4.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ | INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

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

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

Берзина Ася Григорьевна*, к.б.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: berzina07@mail.ru

Asya G. Berzina*, Cand. Sci. (Biol.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: berzina07@mail.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

Помыткин Игорь Анатольевич, к.х.н., ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: ipomytkin@mail.ru

Igor A. Pomytkin, Cand. Sci. (Chem.), Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: ipomytkin@mail.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

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

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

Табоякова Лидия Александровна, ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России»;
e-mail: lida-vet@mail.ru

Lidiya A. Taboyakova, Scientific Center of Biomedical Technologies of the Federal Medical and Biological Agency of Russia;
e-mail: lida-vet@mail.ru

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

Lubov' 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

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

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author