

УДК 577.2, 573.6

Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы

М. В. Шепелев*, С. В. Калинин, А. В. Дейкин, И. В. Коробко
Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5
*E-mail: mshepelev@mail.ru
Поступила в редакцию 12.12.2017
Принята к печати 16.08.2018

РЕФЕРАТ Использование трансгенных животных в качестве биореакторов для синтеза рекомбинантных белков, секретируемых в молоко, является актуальным направлением биотехнологии. Прогресс генно-инженерных технологий, включая появление технологий направленного редактирования генома, существенно упрощает и повышает эффективность получения трансгенных животных, в том числе хозяйственно ценных видов. В данном обзоре рассмотрены технологии получения трансгенных животных с акцентом на животных-продуцентов рекомбинантных белков, секретируемых в молоко. Современное состояние и перспективы развития этой области биотехнологии описаны в свете появления новых технологий редактирования генома, кратко освещены экспериментальные и уже используемые на практике разработки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гомологичная рекомбинация, молочная железа, направленное редактирование генома, рекомбинантный белок, сайт-специфическая рекомбинация, трансгенные животные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами); HDR – homology-directed repair (направляемая гомологией репарация); MMEJ – microhomology-mediated end joining (опосредованное микрогомологией соединение концов); NHEJ – non-homologous end joining (негомологичное соединение концов); RMCE – recombinase-mediated cassette exchange (опосредованный рекомбиназой обмен кассетами); SCNT – somatic cell nuclear transfer (перенос ядра соматической клетки); SSA – single strand annealing (отжиг одиночных цепей); TALE – transcription activator-like effector (эффektor, подобный активатору транскрипции); TALEN – transcription activator-like effector nuclease (TALE-нуклеаза); ZFN – zinc finger nuclease (нуклеаза с цинковыми пальцами).

ВВЕДЕНИЕ

Генетически измененные лабораторные животные на протяжении многих лет остаются эффективным инструментом для изучения функциональных свойств генов, белков и иных молекул, значение которых в качестве моделей заболеваний человека при проведении биомедицинских исследований трудно переоценить. С использованием таких животных можно изучать патогенез и молекулярные особенности заболеваний, выявлять и валидировать новые терапевтические мишени, проводить эффективный поиск и разработку новых лекарственных средств, включая доклинические исследования. Наряду с этим, генетически измененные животные приобретают все большую привлекательность и в таких областях, как животноводство, где с помощью изменений генома можно корректировать хозяйственно ценные признаки животных. Наконец, трансгенные животные могут служить биореакторами для синте-

за рекомбинантных белков, секретируемых в молоко, позволяя нарабатывать рекомбинантные белки в существенно больших количествах и со значительно меньшими затратами по сравнению с получением белков в культурах эукариотических клеток [1]. По прогнозу аналитической компании RAND Corporation, опубликованному в 2006 году, использование молочной железы в качестве биореакторов для продукции рекомбинантных белков будет одним из актуальных направлений биотехнологии в период до 2020 года [2]. Об актуальности прогноза свидетельствует не только большое число экспериментальных исследований в этом направлении, но и коммерчески доступные сегодня лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков человека. Так из молока трансгенных коз получают рекомбинантный антитромбин III человека (лекарственный препарат Atryn®), а из молока кроликов – рекомбинантный ингибитор C1-эстеразы человека (лекарственный

препарат Ruconest®) [3]. В последнее десятилетие в области модификации генома произошли революционные изменения благодаря возможности высокоэффективного направленного редактирования генома и существенному упрощению этой технологии после открытия системы CRISPR/Cas9. Это делает возможной разработку новых подходов к созданию животных, в том числе хозяйственно ценных видов, в молоке которых продуцируются рекомбинантные белки. Новые подходы позволяют кардинально упростить и повысить эффективность получения таких животных. В настоящем обзоре рассмотрены технологии получения трансгенных животных с акцентом на животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке. Сегодняшний ландшафт и перспективы в этой области обрисованы в свете появления новых технологий редактирования генома, кратко освещены экспериментальные и уже используемые на практике разработки.

«КЛАССИЧЕСКИЙ» ТРАНСГЕНЕЗ ЖИВОТНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

«Классический» метод получения трансгенных млекопитающих, разработанный в начале 80-х годов XX века и широко применяемый до настоящего времени, предполагает микроинъекцию фрагмента ДНК, содержащего трансген, в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки с последующей ее трансплантацией компетентным (псевдобеременным) животным. В этой схеме фрагмент ДНК, содержащий трансген, случайным образом встраивается в геном организма-реципиента в ходе естественных процессов образования разрывов геномной ДНК и их репарации [4]. Содержащие трансген линейные фрагменты ДНК как интактные, так и претерпевшие неспецифическое расщепление в клетке могут встраиваться в различные места генома. Также в широких пределах варьирует число копий трансгена в сайте интеграции [5]. Кроме того, процесс интеграции может происходить на различных стадиях развития эмбриона, что приводит к мозаицизму первичных трансгенных животных, т.е. к присутствию трансгена не во всех клетках организма. Очевидно, что для получения линии животных, несущих трансген, важно присутствие трансгена в геноме половых клеток и передача геномной ДНК, содержащей трансген, по наследству.

Таким образом, в процессе «классического» трансгенеза трансген встраивается случайным образом в геном организма-реципиента с неконтролируемым числом копий интегрировавшего трансгена, в том числе и его неполноразмерных фрагментов. При необходимости получения рекомбинантного белка в состав трансгенной конструкции, учитывая произволь-

ную интеграцию трансгена, необходимо включать полноценный экспрессионный модуль, обеспечивающий автономную транскрипцию трансгена в целевых тканях организма и правильный процессинг мРНК. При использовании альтернативных методов трансгенеза и технологий направленного редактирования генома (см. ниже) это условие не является обязательным.

Ключевой детерминантой, обеспечивающей тканевую специфичность экспрессии трансгена, является промотор. Для продукции рекомбинантных белков в молочной железе успешно использовали ряд промоторов генов, кодирующих белки молока. Такими промоторами, позволяющими получать целевой белок в молоке на достаточно высоком уровне (до десятков граммов на литр молока), являются промоторы генов β -казеина козы и коровы, α -s1-казеина коровы, кислого сывороточного белка (WAP) кролика, α -лактальбумина человека, β -лактоглобулина овцы. Однако уровень продукции белка зависит не только от промотора, но и от ряда других факторов. При этом в силу консервативности транскрипционных факторов, регулирующих продукцию белков молока в клетках молочной железы, промоторы организма одного вида могут обеспечивать эффективную транскрипцию трансгена в клетках молочной железы организма другого вида [6–19].

Как показал опыт получения трансгенных животных, для эффективной продукции рекомбинантного белка, помимо тканеспецифичного промотора, необходимого для обеспечения высокого уровня транскрипции трансгена, часто требуется включение в трансген интронов. Включение интронов в трансген в одних экспериментальных системах позволяло увеличить уровень транскрипта трансгена до 400 раз по сравнению с неинтронированной кДНК, в то время как в других системах эффект от введения интронов был минимальным [20, 21]. Разные интроны, помещенные в одно и то же место гена, могут противоположным образом влиять на уровень экспрессии трансгена [21], и один и тот же интрон в различных позициях в трансгене может оказывать противоположные эффекты на уровень экспрессии [20, 21]. Интроны, наряду с возможным содержанием в них энхансеров, способствующих высокой тканеспецифической транскрипции трансгена, как в случае первого интрона гена β -казеина мыши [22], могут оказывать и не связанный с усилением транскрипции эффект на уровень экспрессии трансгена. Один из возможных механизмов усиления экспрессии заключается в формировании регулярно расположенных нуклеосом в гене и промоторной области благодаря присутствию интронов в последовательности ДНК. Предполагается, что нарушение распределения

нуклеосом может нарушать инициацию или элонгацию транскрипции, затрудняя доступ факторов транскрипции или продвижение РНК-полимеразы в случае слишком близко расположенных нуклеосом [23]. Еще одним механизмом интронзависимого усиления экспрессии трансгена может быть ассоциация сплайсинга с полиаденилированием транскрипта [24]. Таким образом, включение интронов в трансген в целом рассматривается как способ повышения уровня экспрессии трансгена [25]. Этот факт определяет дизайн белоккодирующей последовательности трансгена, которая может быть представлена в виде кДНК, полногеномной копии гена, содержащей эндогенные интроны, либо в виде мини-гена, включающего либо минимизированные нативные интроны гена, либо гибридные или искусственные интроны [25–28]. В ряде случаев мини-ген позволяет увеличить уровень экспрессии трансгена по сравнению с использованием в качестве трансгена кДНК при одновременном снижении общего размера генетической конструкции по сравнению с полноразмерной геномной копией, что упрощает манипуляции с ней. Стоит отметить, что, несмотря на значительное количество данных по дизайну трансгенов, тем не менее, не существует однозначного и универсального рецепта конструирования кодирующей части трансгена. В идеале, при создании животного, продуцирующего рекомбинантный белок в молоко, желателен сравнительный анализ продукции белка с использованием для трансгенеза генетических конструкций, содержащих кДНК, полноразмерный ген и мини-ген. Однако проведение таких работ, несомненно, требует существенных затрат.

Даже оптимальный дизайн экспрессионной кассеты не гарантирует эффективную экспрессию трансгена, что обусловлено случайностью места его интеграции в геном реципиента. Окружающий хроматин, в зависимости от области интеграции трансгена, может оказывать негативное влияние на его транскрипцию. Кроме того, часто встречающаяся тандемная интеграция нескольких копий трансгена может приводить к супрессии их транскрипции за счет интерференции транскрипции соседних копий [29]. Поэтому для увеличения уровня экспрессии трансгена при «классическом» трансгенезе в генетическую конструкцию часто включают *ψис*-элементы, предназначенные для ограждения трансгена от влияния окружения на его транскрипцию. Одним из таких наиболее часто используемых *ψис*-элементов является инсультатор HS4 β-глобинового локуса кур [30, 31]. Включение двух тандемно расположенных копий инсультатора HS4 β-глобинового локуса кур на 5'-конец генетической конструкции для трансгенеза позволяет улучшить экспрессию трансгена, однако не обе-

спечивает экспрессию, не зависящую от геномного сайта интеграции и числа копий трансгена [31, 32].

Таким образом, применяемый с начала 80-х годов XX века «классический» трансгенез имеет ряд существенных недостатков, к которым, прежде всего, относится высокая вариабельность экспрессии трансгена, обусловленная случайностью сайта его интеграции в геном. Поэтому для отбора линии животных с удовлетворительными характеристиками продукции рекомбинантного белка необходимо иметь достаточно большое число первичных трансгенных животных. При создании хозяйственно значимых трансгенных животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке, это может представлять существенную техническую проблему из-за необходимости получения большого количества эмбрионов для создания линии трансгенных животных с приемлемыми показателями продукции целевого рекомбинантного белка.

Помимо этих недостатков «классического» трансгенеза, случайность интеграции трансгена в геном животного-реципиента и неконтролируемая вариабельность числа его копий создают определенные сложности, специфические для трансгенных животных, предназначенных для практического использования в реальном секторе экономики. А именно, регистрационный процесс модифицированных организмов предусматривает обязательное определение события трансформации (точного места интеграции трансгенной конструкции в геном), уникального для линии трансгенных животных. При «классическом» трансгенезе определение события трансформации для каждой линии трансгенных животных представляет отдельную экспериментальную задачу, решение которой усложняется при встраивании в геном множественных копий трансгена.

АЛЬТЕРНАТИВЫ «КЛАССИЧЕСКОМУ» ТРАНСГЕНЕЗУ ЖИВОТНЫХ

Случайность интеграции трансгена в геном животного-реципиента и неконтролируемая вариабельность числа его копий являются существенными недостатками «классического» подхода к получению трансгенных животных. Наличие этих недостатков стимулировало развитие альтернативных технологий, позволяющих осуществлять интеграцию трансгена в определенное место генома. До недавнего времени такой альтернативой была интеграция трансгена в определенное место генома с использованием гомологичной рекомбинации либо в эмбриональных стволовых клетках с последующей инъекцией генетически модифицированных клеток в бластоцисты, либо в соматических клетках с последующим переносом ядра соматической клетки в ооцит (somatic cell nucle-

ar transfer, SCNT). В обоих случаях генетические манипуляции проводят с клетками в культуре, что позволяет охарактеризовать корректность интеграции трансгена еще до получения трансгенных животных. Кроме того, качественным улучшением технологии «классического» трансгенеза стала интеграция трансгена в заранее определенное место генома с использованием гомологичной рекомбинации за счет фланкирования экспрессионной кассеты для трансгенеза геномными областями («плечами гомологии», как правило, протяженностью в несколько тысяч пар нуклеотидов). Стоит отметить, что при использовании описанных выше подходов генетические элементы, обеспечивающие получение рекомбинантного белка в молоке, будут такими же, как и при «классическом» трансгенезе. К недостаткам упомянутых подходов относятся необходимость использования селективных маркеров для отбора клонов клеток с интегрированным в геном трансгеном и трудоемкий процесс селекции клонов, требующий проведения анализа большого числа (от нескольких сотен и более) клонов клеток даже при использовании негативной селекции, что вызвано низкой эффективностью гомологичной рекомбинации. При этом даже в случае последующего удаления из экспрессионной кассеты селективного маркера, например, с использованием сайт-специфической рекомбинации при его фланкировании соответствующими сайтами рекомбинации, в геноме, помимо целевых последовательностей трансгена, неизбежно остаются экзогенные последовательности ДНК, что может быть нежелательным.

В качестве клеток-реципиентов для проведения генетических манипуляций *in vitro* можно использовать эмбриональные стволовые клетки. В этом случае для получения генетически модифицированного животного стволовые клетки, несущие генетическую модификацию, инъецируют в бластоцисты с их последующей имплантацией и получением животных, мозаичных по присутствию трансгена [33]. Потомки животных, содержащих трансген в половых клетках, будут немозаичными трансгенными животными. Недостатком этой технологии является возможность утраты плюрипотентных свойств стволовыми клетками при получении генетически модифицированных клонов в процессе культивирования. Кроме того, возможности этого подхода существенно ограничиваются доступностью эмбриональных стволовых клеток целевого вида животных. Создание модифицированных животных с использованием стволовых клеток получило относительно широкое практическое применение лишь для лабораторных животных. Соматические клетки являются альтернативой эмбриональным стволовым клеткам, исключая зависимость от сохранения плюрипотентных свойств и по-

зволяя осуществлять генетические модификации практически любых видов животных. В этом случае для получения трансгенных животных используют технологию SCNT, заменяя ядро ооцита на ядро соматической клетки, несущей генетическую модификацию, и индуцируя после этого развитие эмбриона. Несмотря на то что эпигенетические различия между геномами зиготы и соматической клетки в этом случае не оказывают существенного влияния на характеристики получаемых организмов, эффективность процедуры SCNT остается невысокой. Животные часто оказываются нежизнеспособными и преждевременно погибают, что связывают с побочными эффектами переноса ядра соматической клетки, в частности, с дефектами в развитии внеэмбриональных тканей и эпигенетическом репрограммировании [34–36]. Тем не менее, именно этот технологический подход был успешно применен при создании коз, продуцирующих рекомбинантный антитромбин III человека в молоко, который является основой одобренного к применению лекарственного препарата Atryn® [37], а также ряда других линий трансгенных животных, пригодных к промышленному использованию [8, 38, 39].

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАЗЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ВСТРОЙКИ ТРАНСГЕНА В ГЕНОМ

Помимо методов, основанных на гомологичной рекомбинации трансгена, и использовании клеток в культуре в сочетании с позитивной и негативной селекцией для отбора клонов клеток с гомологичной рекомбинацией, еще одной альтернативой, позволяющей осуществлять таргетную вставку трансгена в геном реципиента, является использование сайт-специфических рекомбиназ. В целом концепция применения сайт-специфических рекомбиназ заключается в получении линии трансгенных животных, несущих в своем геноме сайт(ы) узнавания рекомбиназ, которые могут быть интегрированы в определенное место генома в результате гомологичной рекомбинации или в случайное место генома при использовании «классического» трансгенеза. В последнем случае из линий трансгенных животных с различными вариантами локализации трансгена в геноме отбирается та, в которой трансген интегрирован в участок генома, обеспечивающий требуемые свойства его экспрессии. Такая линия животных используется затем как универсальный реципиент для встраивания различных трансгенов в определенное место генома посредством сайт-специфической рекомбинации. С этой целью генетическую конструкцию, содержащую трансген, фланкированный сайтами рекомбинации, микроинъецируют в оплодотворенную яйцеклетку трансгенного животного,

содержащего в геноме такие же сайты рекомбинации, вместе с вектором для экспрессии рекомбиназы или ее мРНК [40, 41]. В результате происходит сайт-специфическая рекомбинация, и трансген встраивается в геном животного-реципиента. Важно отметить, что таким способом можно проводить микроинъекции непосредственно в ооциты, помимо использования в качестве реципиента трансгенной конструкции линий эмбриональных стволовых или соматических клеток, несущих в геноме сайты узнавания рекомбиназ.

На практике для сайт-специфического трансгена достаточно широко используют три системы рекомбинации: на основе рекомбиназ Cre фага P1 и Flp дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и интегразы фага ФС31 [42, 43]. При этом использование нативного сайта рекомбинации в паре с его вариантом с измененной последовательностью, обеспечивающим рекомбинацию только с полностью идентичным, но не нативным сайтом рекомбинации, позволяет осуществлять встройку трансгенной кассеты в заранее заданном направлении (технология опосредованного рекомбиназой обмена кассетами, Recombinase-Mediated Cassette Exchange, RMCE) [42, 44]. При интеграции кассеты с сайтами рекомбинации непосредственно в ген, кодирующий белок молока, становится возможным экспрессия целевого трансгена, обеспечивающего продукцию рекомбинантного белка в молоке под контролем эндогенного промотора, активность которого специфична для клеток молочной железы [45]. В качестве такого промотора (гена для интеграции) можно использовать ген, кодирующий β -казеин [46–48], отсутствие которого не влияет на нормальный процесс лактации [49, 50].

Альтернативный подход к обеспечению эффективной и стабильной экспрессии трансгена, в том числе в клетках молочной железы, с помощью соответствующих тканеспецифичных промоторов, состоит в использовании в качестве сайтов интеграции трансгенов так называемых «спокойных гаваней» (safe harbor). Под такими гаванями понимают геномные локусы, с одной стороны, несущественные для развития и функционирования организма, что позволяет без вреда для организма встроить в такой локус трансген, а с другой, обеспечивающие высокий уровень экспрессии трансгена при наличии соответствующих регуляторных элементов в нем. Примерами таких геномных локусов являются локусы *ROSA26*, *Cd6*, *Hipp11* и ряд других [33, 40, 51, 52].

В дополнение к перечисленным преимуществам применение сайт-специфических рекомбиназ и интеграз для направленной встройки трансгена в геном животных имеет и регуляторное значение в случае трансгенных животных, предназначенных для прак-

тического использования, поскольку существенно упрощается задача характеристики события трансформации (места интеграции трансгена в геном организма-реципиента).

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ ТРАНСГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ

К существенному прогрессу в области трансгенеза животных привело появление технологий направленного редактирования генома с использованием сайт-специфических нуклеаз, позволяющих намного более эффективно осуществлять встройку трансгена в определенное место генома организма-реципиента, по сравнению с использованием лишь последовательностей для гомологичной рекомбинации, фланкирующих трансген [53]. Ниже будут рассмотрены молекулярные механизмы, лежащие в основе технологий направленного редактирования генома, которые представляются наиболее перспективными для получения хозяйственно ценных животных, в молоке которых продуцируются рекомбинантные белки.

Таргетная интеграция трансгена с использованием сайт-специфических нуклеаз основана на значительном увеличении эффективности сайт-специфической интеграции трансгена в геном организма-реципиента в ходе процессов репарации двух- или одноцепочечных разрывов ДНК [54]. Технологии направленного редактирования генома существенно увеличивают эффективность встройки трансгена в предопределенное место генома, позволяя в ряде случаев отказаться от использования селективных маркеров и, что особенно важно, с достаточно высокой эффективностью осуществлять направленную встройку трансгена непосредственно в геном зиготы с последующим получением трансгенных животных [55–57].

Можно выделить несколько классов искусственных нуклеаз, используемых для направленного редактирования генома и получения трансгенных животных: ZFN (Zinc finger nuclease) [58], TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) [59], искусственные мегануклеазы [60], а также гибридные варианты искусственных нуклеаз на их основе, например, мега-TAL [61] и др. Однако без преувеличения революционным прорывом в этой области можно считать появление технологии направленного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 благодаря простоте ее практической реализации в сочетании с высокой эффективностью по сравнению с TALEN и ZFN [53].

ZFN была первой нуклеазой, сконструированной для применения в генной инженерии с целью направленного редактирования генома. Нуклеаза содержит

ДНК-связывающие домены цинк-пальцевого белка ZFP (zinc finger protein), обеспечивающего высоко-специфичное связывание с целевой последовательностью ДНК, и каталитический домен эндонуклеазы рестрикции FokI, вносящий в сайт связывания двухцепочечный разрыв. Каждый цинковый палец узнает определенный триплет нуклеотидов. При конструировании ДНК-связывающего домена ZFN используют от трех до шести цинковых пальцев. Комбинируя их, можно создать ZFN практически для любой последовательности ДНК [62]. Строение и применение ZFN подробно описаны в [63].

Позднее был расшифрован более простой по сравнению с ZFN код TALE (transcription activator-like effector) [64, 65]. Белки TALE патогенных бактерий растений рода *Xanthomonas* содержат ДНК-связывающий домен, состоящий из серии мономеров, каждый из которых связывается с одним нуклеотидом в целевой нуклеотидной последовательности. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 33–35 аминокислотных остатков, кроме последнего «полуповтора», который состоит из 20 аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки, расположенные в позициях 12 и 13 мономера, являются высоковариабельными, они отвечают за узнавание определенного нуклеотида: Asn-Пе, Asn-Gly, Asn-Asn и His-Asp связывают нуклеотиды А, Т, G и С соответственно. Как и ZFN, искусственная нуклеаза TALEN представляет собой химеру ДНК-связывающего домена TALE, состоящего из 20–30 мономеров, и каталитического домена нуклеазы FokI [66], что позволяет вносить двухцепочечный разрыв в непосредственной близости от определяемой вариабельными аминокислотными остатками мономеров TALEN целевой последовательности ДНК.

В системе CRISPR/Cas9 мишень узнается за счет комплементарного взаимодействия crPНК (CRISPR PНК) и ДНК целевого сайта. При этом образуется комплекс tracrRNA (trans-activating crRNA), crPНК и нуклеазы Cas9, которая вносит двухцепочечный разрыв в дуплекс PНК/ДНК [67]. Таким образом, для определения специфичности и для направленного действия нуклеазы в системе CRISPR/Cas9 необходим лишь синтез PНК, комплементарной целевой ДНК в геноме, в отличие от технологий на основе ZFN и TALEN, требующих зачастую сложного и трудоемкого дизайна белков. На сегодняшний день разработан ряд модификаций и аналогов системы CRISPR/Cas9, например, CRISPR/Cpf1 и CRISPR/C2c2 [68–72], с улучшенными свойствами для редактирования генома и решения определенных целевых задач.

Необходимо отметить, что искусственные нуклеазы ZFN и TALEN не обладают абсолютной специфичностью. Еще в большей степени эта проблема

относится к системе CRISPR/Cas9. Проблемы расщепления ДНК искусственными нуклеазами в нецелевых сайтах генома могут решаться различными способами, позволяющими увеличить специфичность внесения изменений в геном и снизить вероятность возникновения незапрограммированных генетических изменений. Вместе с тем следует отметить, что проблема неспецифического внесения изменений в геном организма-реципиента не является столь острой при получении трансгенных животных по сравнению с технологиями направленного редактирования генома в области клинического применения, поскольку изменения, случайно возникшие в нецелевых сайтах генома, можно исключить в процессе скрещивания.

В эукариотических клетках двухцепочечные разрывы, вносимые сайт-специфическими нуклеазами, могут репарироваться посредством нескольких механизмов, в частности в результате гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR), при которой матрицей для репарации служит сестринская, или гомологичная хроматида, а также донорная ДНК с плечами гомологии длиной 200–800 п.н. [73], позволяющая интегрировать ДНК между плечами гомологии в место разрыва в геномной ДНК [74]. Кроме того, репарация может осуществляться за счет негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), при котором происходит лигирование негомологичных концов или имеющих небольшую гомологию (2–5 нуклеотидов), в результате чего могут появляться делеции или инсерции длиной несколько нуклеотидов [75]. Репарация может также происходить путем опосредованного микрогомологией соединения концов (microhomology-mediated end joining, MMEJ), которое нуждается в гомологичной ДНК длиной 5–25 нуклеотидов в месте разрыва или рядом с ним, и приводит к делециям, инсерциям и транслокациям [76], а также за счет одностороннего отжига цепи (single strand annealing, SSA), для которого необходимы гомологичные участки одноцепочечной матрицы длиной более 30 нуклеотидов [77].

Ключевым механизмом репарации разрывов, вносимых сайт-направленными нуклеазами в детерминированное место генома, является гомологичная рекомбинация, позволяющая интегрировать трансген, находящийся между плечами гомологии, в заданное место генома. Это подход успешно реализуется при трансгенезе животных с использованием двухцепочечных матриц, содержащих трансген, фланкированный плечами гомологии длиной от 1 до 3 т.п.н., с эффективностью репарации от 0.5 до 20% [77–80]. Поскольку репарация разрывов, вносимых искусственными нуклеазами, с большей эффективностью (до 80%) происходит по механизму NHEJ [81], одним

из способов увеличения эффективности гомологичной рекомбинации и инсерции трансгена является использование ингибиторов NHEJ [82, 83], которые, однако, обладают мутагенным эффектом и увеличивают вероятность встройки трансгена в нецелевой локус генома [80]. Эффективность гомологичной рекомбинации может быть увеличена путем удлинения плечей гомологии и подбора оптимальных концентраций микроинъектируемых в зиготу компонентов для CRISPR/Cas9-опосредованной модификации генома [78], а также за счет использования мутантной формы нуклеазы Cas9 (nCas9, никаза), вносящей одноцепочечные разрывы в ДНК в плюс- и минус-цепи геномного локуса-мишени на удалении друг от друга [84].

Вместе с тем, разработаны альтернативные технологии, обеспечивающие направленное встраивание протяженных (до 10–15 т.п.н.) фрагментов ДНК в заданное место генома без использования механизма HDR. Например, одна из таких технологий основана на репарации разрывов по механизму NHEJ за счет лигирования комплементарных перекрывающихся одноцепочечных концов ДНК геномного сайта-мишени и матрицы для репарации, включающей в себя трансген, генерируемых парой нуклеаз ZFN при расщеплении целевых последовательностей генома и матрицы для репарации [85, 86]. Инсерция протяженных фрагментов ДНК в заданное место генома может происходить и по механизму MMEJ воносимые нуклеазами TALEN или Cas9 двухцепочечные разрывы при включении в матрицу для гомологичной рекомбинации коротких последовательностей, гомологичных прилегающим к сайту расщепления нуклеаз участкам ДНК [87, 88].

Таким образом, бурное развитие технологий направленного редактирования генома позволяет избежать ряд недостатков, присущих «классическому» трансгенезу, таких, как случайное встраивание трансгена в геном и неконтролируемая вариабельность числа копий трансгена. С помощью технологии CRISPR/Cas9 можно создавать трансгенных животных с интеграцией трансгена в заданное место генома, что вместе с использованием гомологичной рекомбинации определяет контролируемое число копий трансгена. В частности, одним из наиболее перспективных подходов к созданию животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке, считается таргетная интеграция трансгена с помощью системы CRISPR/Cas9 в гены, кодирующие белки молока таким образом, чтобы экспрессия трансгена контролировалась эндогенными регуляторными последовательностями гена животного-реципиента. Применение подобных технологий позволит упростить и стандартизировать технологии получения

трансгенных животных-продуцентов рекомбинантных белков. Это позволит сделать процесс трансгенеза более эффективным и снизит затраты на получение хозяйственно ценных трансгенных животных. Технологии редактирования генома позволят создавать трансгенных животных с интеграцией одной копии трансгена в определенное место генома, что позволит проводить достоверное сравнение влияния тех или иных генетических элементов, представленных в конструкции для трансгенеза, на уровень продукции рекомбинантного белка в молоке, что невозможно сделать при «классическом» трансгенезе в силу интеграции неконтролируемого количества копий трансгенов в разные геномные локусы у разных линий трансгенных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие технологий направленного редактирования генома открывает перспективы для создания трансгенных животных на качественно новом уровне. Благодаря применению знаний о молекулярно-генетических механизмах регуляции экспрессии генов, функционирования генома и доступным сегодня гено-инженерным технологиям становится возможной стандартизация процесса получения трансгенных животных с заданными и стабильными целевыми характеристиками, что в полной мере относится к продукции рекомбинантных белков в молоке для производства лекарственных препаратов, биологически активных добавок и т.д.

С учетом совокупности разработанных на сегодняшний день технологий, которые продолжают активно развиваться, оптимальным направлением работ в области продукции рекомбинантных белков в молоке хозяйственно ценных животных является создание линий животных (в зависимости от потребности в целевом белке – кроликов, овец и коз, коров), геном которых модифицирован инсерцией в ген, кодирующий белок молока (например, ген β -казеина), последовательностей для асимметричной направленной рекомбинации экспрессионной кассеты. Промотор и иные регуляторные последовательности этого гена будут обеспечивать высокий уровень экспрессии трансгена. Подобная инсерция может осуществляться с высокой эффективностью путем микроинъекции в ооциты генетической конструкции с экспрессионной кассетой в смеси с соответствующей рекомбинантной интегразой или ее мРНК. Такие линии животных с недоступной ранее эффективностью могут создаваться с применением технологий редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 или ее аналогов благодаря простоте реализации и дизайна этой системы. При этом технологии синтетической биологии позволяют использовать

для обеспечения эффективной экспрессии трансгена и продукции целевого белка не полногеномные копии в качестве трансгена, а мини-гены с искусственными интронами, что упрощает дизайн и создание генетических конструкций для трансгенеза.

Перспективность развития этого направления производства рекомбинантных белков, прежде всего для нужд медицины, подтверждается присутствием на рынке двух лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков, получаемых из молока трансгенных животных. Необходимо отметить возможность получения значительных количеств рекомбинантных белков с затратами, существенно меньшими по сравнению с продукцией в клеточных системах.

Применение современных технологий существенно упрощает выполнение требований регулятора в части описания события трансформации. В то же время требования к биологической безопасности получения рекомбинантных белков в молоке потребуют пересмотра стандартов содержания сельскохозяйственных животных и ветеринарного контроля для исключения присутствия зоонозных и антропонозных инфекционных агентов, а также контролируемых параметров производимых лекарственных средств. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда
(проект № 16-14-00150).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J., Liu E. // *BioMed Res. Internat.* 2013. V. 2013. P. 580463.
- The Global Technology Revolution 2020, In-Depth Analyses. Bio/Nano/Materials/Information Trends, Drivers, Barriers, and Social Implications. RAND Corp., 2006. P. 145.
- Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5. С. 33–47.
- Smith K. // *Reprod. Nutr. Dev.* 2001. V. 41. P. 465–485.
- Niemann H., Kues A.W. // *Anim. Reprod. Sci.* 2000. V. 60–61. P. 277–293.
- Levy J.H., Weisinger A., Ziomek C.A., Echelard Y. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2001. V. 27. P. 405–416.
- Coulbaly S., Besenfelder U., Miller I., Zinovieva N., Lassnig C., Kotler T., Kotler T., Jameson J.L., Gemeiner M., Müller M., et al. // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 63. P. 3003008.
- Amiri Yekta A., Dalman A., Eftekhari-Yazdi P., Sanati M.H., Shahverdi A.H., Fakheri R., Vazirinasab H., Daneshzadeh M.T., Vojgani M., Zomorodipour A., Fatemi N., et al. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 131–142.
- Mikus T., Malý P., Poplstein M., Landa V., Trefil P., Lidický J. // *Folia Biol. (Praha).* 2001. V. 47. P. 187–195.
- Carver A., Wright G., Cottom D., Cooper J., Dalrymple M., Temperley S., Udell M., Reeves D., Percy J., Scott A. // *Cytotechnology.* 1992. V. 9. P. 77–84.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. // *Nat. Biotechnol.* 1991. V. 9. P. 830–834.
- Archibald A.L., McClenaghan M., Hornsey V., Simons J.P., Clark A.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. V. 87. P. 5178–5182.
- Baldassarre H., Hockley D.K., Doré M., Brochu E., Hakier B., Zhao X., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 73–84.
- Baldassarre H., Hockley D.K., Olaniyan B., Brochu E., Zhao X., Mustafa A., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 863–872.
- Huang Y.-J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 13603–13608.
- Nuijens J.H., van Berkel P.H., Geerts M.E., Hartevelt P.P., de Boer H.A., van Veen H.A., Pieper F.R. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 8802–8807.
- Platenburg G.J., Kootwijk E.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J., Pieper F.R., de Boer H.A., Strijker R. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 99–108.
- Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., et al. // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4466–4476.
- Li H., Liu Q., Cui K., Liu J., Ren Y., Shi D. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 169–178.
- Buchman A.R., Berg P. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 4395–4405.
- Bourdon V., Harvey A., Lonsdale D.M. // *EMBO Rep.* 2001. V. 2. P. 394–398.
- Kang Y.K., Lee C.S., Chung A.S., Lee K.K. // *Mol. Cells.* 1998. V. 8. P. 259–265.
- Liu K., Sandgren E.P., Palmiter R.D., Stein A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995. V. 92. P. 7724–7728.
- Huang M.T., Gorman C.M. // *Nuc. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 937–947.
- Palmiter R.D., Sandgren E.P., Avarbock M.R., Allen D.D., Brinster R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. P. 478–482.
- Choi T., Huang M., Gorman C., Jaenisch R. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 3070–3074.
- Barash I., Nathan M., Kari R., Ilan N., Shani M., Hurwitz D.R. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 602–610.
- Тихонов М.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г., Коробко И.В. // *Молекуляр. биология.* 2017. Т. 51. С. 671–676.
- Eszterhas S.K., Bouhassira E.E., Martin D.I., Fiering S. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 469–479.
- Emery D.W., Yannaki E., Tubb J., Nishino T., Li Q., Stamatoyannopoulos G. // *Blood.* 2002. V. 100. P. 2012–2019.
- Guglielmi L., Le Bert M., Truffinet V., Cogné M., Denizot Y. // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 307. P. 466–471.
- Truffinet V., Guglielmi L., Cogné M., Denizot Y. // *Immunol. Lett.* 2005. V. 96. P. 303–304.
- Kong Q., Hai T., Ma J., Huang T., Jiang D., Xie B., Wu M., Wang J., Song Y., Wang Y., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. P. e107945.
- Eilertsen K.J., Power R.A., Harkins L.L., Misica P. // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 98. P. 129–146.
- Campbell K.H., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D., Lee J.H., Xhu J. // *Theriogenology.* 2007. V. 68. Suppl 1. P. S214–231.
- Dinnyes A., Tian X.C., Yang X. // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. Suppl 2. P. 302–309.
- Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood.* 1998. V. 91. P. 4561–4571.
- Yang P., Wang J., Gong G., Sun X., Zhang R., Du Z., Liu Y., Li

- R., Ding F., Tang B., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3453.
39. Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J.F., et al. // *Theriogenology*. 2003. V. 59. P. 831–839.
40. Tasic B., Hippenmeyer S., Wang C., Gamboa M., Zong H., Chen-Tsai Y., Luo L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 7902–7907.
41. Yu H., Wang X., Zhu L., He Z., Liu G., Xu X., Chen J., Cheng G. // *Gene*. 2013. V. 515. P. 367–371.
42. Wirth D., Gama-Norton L., Riemer P., Sandhu U., Schucht R., Hauser H. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. P. 411–419.
43. Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C., Fees S., Fraser S., Eshkind L., Oesch F., Zabel B. // *Physiol. Genomics*. 2002. V. 11. P. 115–132.
44. Bode J., Schlake T., Iber M., Schübeler D., Seibler J., Snezhkov E., Nikolaev L. // *Biol. Chem.* 2000. V. 381. P. 801–813.
45. Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2565.
46. Jeong Y.H., Kim Y.J., Kim E.Y., Kim S.E., Kim J., Park M.J., Lee H.G., Park S.P., Kang M.J. // *Zygote*. 2016. V. 24. P. 442–456.
47. Lee S.M., Kim J.W., Jeong Y.H., Kim S.E., Kim Y.J., Moon S.J., Lee J.H., Kim K.J., Kim M.K., Kang M.J. // *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 2014. V. 27. P. 1644–1651.
48. Robinson C., Kolb A.F. // *Exp. Cell. Res.* 2009. V. 315. P. 508–522.
49. Kumar S., Clarke A.R., Hooper M.L., Horne D.S., Law A.J., Leaver J., Springbett A., Stevenson E., Simons J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 6138–6142.
50. Cosenza G., Pauciullo A., Colimoro L., Mancusi A., Rando A., Di Bernardino D., Ramunno L. // *Anim. Genet.* 2007. V. 38. P. 655–658.
51. Soriano P. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 70–71.
52. DeKever R.C., Choi V.M., Moehle E.A., Paschon D.E., Hockemeyer D., Meijsing S.H., Sancak Y., Cui X., Steine E.J., Miller J.C., et al. // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 1133–1142.
53. Kasperek P., Krausova M., Haneckova R., Kriz V., Zbodakova O., Korinek V., Sedlacek R. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 3982–3988.
54. Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3831–3842.
55. Remy S., Tesson L., Menoret S., Usal C., De Cian A., Thepenier V., Thinard R., Baron D., Charpentier M., Renaud J.B., et al. // *Genome Res.* 2014. V. 24. P. 1371–1383.
56. Ménoret S., Fontanière S., Jantz D., Tesson L., Thinard R., Rémy S., Usal C., Ouisse L.H., Fraichard A., Anegon I. // *FASEB J.* 2013. V. 27. P. 703–711.
57. Porteus M.H., Carroll D. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 967–973.
58. Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Science*. 2011. V. 333. P. 1843–1846.
59. Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau P., Pâques F. // *Curr. Gene Ther.* 2011. V. 11. P. 11–27.
60. Boissel S., Jarjour J., Astrakhan A., Adey A., Gouble A., Duchateau P., Shendure J., Stoddard B.L., Certo M.T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 2591–2601.
61. Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., Dreier B., Effertz K., Huber A., Koksche B., Lund C.V., Magnenat L., Valente D., et al. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 2137–2148.
62. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 636–646.
63. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. // *Science*. 2009. V. 326. P. 1509–1512.
64. Moscou M.J., Bogdanove A.J. // *Science*. 2009. V. 326. P. 1501.
65. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Genetics*. 2010. V. 186. P. 757–761.
66. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 3rd. // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 397–405.
67. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. P. 19–40.
68. Ruan J., Xu J., Chen-Tsai R.Y., Li K. // *Transgenic Res.* 2017. V. 26. P. 715–726.
69. Stella S., Alcón P., Montoya G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. P. 882–892.
70. Murugan K., Babu K., Sundaresan R., Rajan R., Sashital D.G. // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 15–25.
71. Mitsunobu H., Teramoto J., Nishida K., Kondo A. // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 983–996.
72. Chira S., Gulei D., Hajitou A., Zimta A.A., Cordelier P., Berindan-Neagoe I. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2017. V. 7. P. 211–222.
73. Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., Holmes M.C. // *Nature*. 2005. V. 435. P. 646–651.
74. Moynahan M.E., Jasin M. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. P. 196–207.
75. Lieber M.R. // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 181–211.
76. McVey M., Lee S.E. // *Trends Genet.* 2008. V. 24. P. 529–538.
77. Sugawara N., Ira G., Haber J.E. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 5300–5309.
78. Wang B., Li K., Wang A., Reiser M., Saunders T., Lockey R.F., Wang J.W. // *Biotechniques*. 2015. V. 59. P. 201–208.
79. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. // *Cell*. 2013. V. 153. P. 910–918.
80. Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch L. // *Cell*. 2013. V. 154. P. 1370–1379.
81. Frit P., Barboule N., Yuan Y., Gomez D., Calsou P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 17. P. 81–97.
82. Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 538–542.
83. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 543–548.
84. Li K., Wang G., Andersen T., Zhou P., Pu W.T. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e105779.
85. Maresca M., Lin V.G., Guo N., Yang Y. // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 539–546.
86. Cristea S., Freyvert Y., Santiago Y., Holmes M.C., Urnov F.D., Gregory P.D., Cost G.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. V. 110. P. 871–880.
87. Nakade S., Tsubota T., Sakane Y., Kume S., Sakamoto N., Obara M., Daimon T., Sezutsu H., Yamamoto T., Sakuma T., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 5560.
88. Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.T., Yamamoto T. // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. P. 118–133.