


Перевод на английский язык <https://vavilov.elpub.ru/jour>

Создание трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусам: платформа изучения вирусного патогенеза и тестирования вакцин

Н.Р. Баттулин^{1, 2}, О.Л. Серов^{1, 2} 

¹ Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия


² Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

 serov@bionet.nsc.ru

Аннотация. За последние 20 лет коронавирусы вызвали три эпидемии, SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV2, причем летальность первых двух была очень высокой: около 10 и 26 % соответственно. Последняя вспышка коронавирусной инфекции, вызванная SARS-CoV2 в 2019 г. в Китае, охватила всю планету, и она все еще продолжает распространяться. Источником этих вирусов у человека были животные: летучие мыши, гималайские циветы и верблюды. Геномы MERS-CoV, SARS-CoV и SARS-CoV2 имеют высокое сходство между собой. Установлено, что заражение коронавирусной инфекцией (SARS-CoV и SARS-CoV2) происходит посредством контакта вирусного белка S с рецептором легочного эпителия – ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 (ACE2), благодаря чему вирус попадает в клетки. Наиболее привлекательной моделью для исследования особенностей развития этих заболеваний является лабораторная мышь, которая, однако, резистентна к коронавирусной инфекции. Резистентность объясняется различием аминокислотного состава белков Ace2 мыши и ACE2 человека. Поэтому при получении мышей, восприимчивых к коронавирусам SARS-CoV и SARS-CoV2, в их геном переносят ген ACE2 человека. Экзогенная ДНК конструкций встраивается в реципиентный геном случайным образом и с варьирующим числом копий. На основе этой технологии были получены линии трансгенных мышей, восприимчивых к интраназальной коронавирусной инфекции. Применение технологии адресной модификации геномов с помощью CRISPR/Cas9 позволило получить линии трансгенных животных с инсерцией гена ACE2 человека под контроль промотора эндогенного гена Ace2 мыши. Такая «гуманизация» гена Ace2 дает возможность получить животных, наиболее близко имитирующих коронавирусную инфекцию человека. Таким образом, к настоящему времени создана серия линий трансгенных мышей – животных, моделирующих коронавирусные инфекции человека и потенциально способных служить платформами для тестирования вакцин.
Ключевые слова: коронавирусы CoVs; SARS-CoV; MERS-CoV; COVID-19; трансгенез; «гуманизация» генома мышей; технология CRISPR/Cas9.


Для цитирования: Баттулин Н.Р., Серов О.Л. Создание трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусам: платформа изучения вирусного патогенеза и тестирования вакцин. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2022;26(4):402-408. DOI 10.18699/VJGB-22-49

Creation of transgenic mice susceptible to coronaviruses: a platform for studying viral pathogenesis and testing vaccines

N.R. Battulin^{1, 2}, O.L. Serov^{1, 2} 

¹ Institute of Cytology and Genetics of the Siberian Branch of the Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, Russia

² Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

 serov@bionet.nsc.ru

Abstract. Over the past 20 years, coronaviruses have caused three epidemics: SARS-CoV, MERS-CoV, and SARS-CoV2, with the first two having a very high lethality of about 10 and 26 %, respectively. The last outbreak of coronavirus infection caused by SARS-CoV2 in 2019 in China has swept the entire planet and is still spreading. The source of these viruses in humans are animals: bats, Himalayan civets, and camels. The genomes of MERS-CoV, SARS-CoV and SARS-CoV2 are highly similar. It has been established that coronavirus infection (SARS-CoV and SARS-CoV2) occurs through the viral protein S interaction with the lung epithelium – angiotensin-converting enzyme receptor 2 (ACE2) – due to which the virus enters the cells. The most attractive model for studying the development of these diseases is a laboratory mouse, which, however, is resistant to coronavirus infection. The resistance is explained by the difference in the amino acid composition of mouse Ace2 and human ACE2 proteins. Therefore, to create mice susceptible to SARS-CoV and SARS-CoV2 coronaviruses, the human ACE2 gene is transferred into their genome. The exogenous DNA of the constructs is inserted into the recipient genome randomly and with a varying number of copies. Based on this technology, lines of transgenic mice susceptible to intranasal coronavirus infection have been created. In addition, the use of the technology of targeted genome modification using CRISPR/Cas9 made it possible to create lines of

transgenic animals with the insertion of the human *ACE2* gene under the control of the endogenous murine *Ace2* gene promoter. This "humanization" of the *Ace2* gene makes it possible to obtain animals susceptible to infection with coronaviruses. Thus, transgenic animals that simulate coronavirus infections and are potential platforms for testing vaccines have now been created.

Key words: coronaviruses CoVs; SARS-CoV; MERS-CoV; COVID-19; transgenesis; "humanization" of the mouse genome; CRISPR/Cas9 technology.

For citation: Battulin N.R., Serov O.L. Creation of transgenic mice susceptible to coronaviruses: a platform for studying viral pathogenesis and testing vaccines. *Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding*. 2022;26(4):402-408. DOI 10.18699/VJGB-22-49

Введение

Вирусная инфекция, вызывавшая атипичную пневмонию (severe acute respiratory syndrome, SARS), впервые зафиксирована в декабре 2019 г. в Китае в городе Ухань, быстро распространилась по всему миру в масштабе пандемии (Li et al., 2020; Zhou P. et al., 2020; Zhu et al., 2020). Вскоре, в конце января 2020 г., были опубликованы данные о том, что возбудителем заболевания является новый тип коронавируса, выделенный из бронхоальвеолярных выделений шести пациентов и получивший название 2019-nCov (Zhu et al., 2020). Позднее по рекомендации Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) заболевание, вызванное новым вирусом SARS-CoV2, стали называть COVID-19. Почти одновременно (в начале февраля 2020 г.) были опубликованы дополнительные данные о природе новой коронавирусной инфекции, полученные от семи пациентов, шесть из которых были продавцы и поставщики морепродуктов на Уханьском рынке (Zhou F. et al., 2020). Согласно данным P. Zhou с коллегами (2020), геном вируса SARS-CoV2 имеет сходство на 85 % с коронавирусом, распространенным среди летучих мышей, и 79.6 % сходства с ранее описанным SARS-CoV у человека.

Модельные животные – важный инструмент в исследовании многих патологий человека. Однако создание адекватных животных моделей инфекционных болезней имеет свою специфику, связанную с высокой скоростью коэволюции системы «паразит–хозяин», в процессе которой оба участника приобретают множество специфических приспособлений. Примером этому может служить тропизм инфекционных вирусов человека, основанный на специфическом взаимодействии вирусных белков с клеточными рецепторными белками, что дает старт инфекции. Отсутствие этого звена – специфического связывания белков вируса и белков клеток-мишеней – обуславливает резистентность или, наоборот, восприимчивость к конкретной вирусной инфекции у разных видов.

С другой стороны, различие в реакции иммунной системы на тот или иной вирусный агент у человека и животных может также стать непреодолимым препятствием для использования животных в качестве модельных объектов. Несмотря на эти сложности, на сегодняшний день создано немало мышиных моделей вирусных заболеваний человека (полиомиелита, кори, гепатитов В и С), что позволяет исследовать фундаментальные аспекты развития конкретного заболевания, такие как процессы инфицирования, течение вирусного заболевания и взаимодействие вируса и иммунной системы. Подобные модели оказались крайне востребованными для проведения доклинических испытаний новых вакцин и противовирусных препаратов (Takaki et al., 2017).

Настоящий обзор посвящен созданию лабораторных мышей, восприимчивых к коронавирусам SARS-CoV2 и SARS-CoV, с целью разработки экспериментальной платформы для исследования как самого вирусного патогенеза, так и тестирования фармакологических противовирусных препаратов и вакцин.

Коронавирусные инфекции человека и животных

Группа коронавирусов (CoVs) представлена крупными оболочечными вирусами, геном которых состоит из однонитевой РНК (Lai et al., 2007). Коронавирусы входят в субсемейство Coronavirinae, семейства Coronaviridae, отряда Nidovirales. Коронавирусы состоят из четырех родов: альфа-, бета-, гамма- и дельта-коронавирусы (Woo et al., 2009a, b), и все они вызывают зоонозные инфекции у животных. В последние два десятилетия из всей когорты коронавирусов два оказались патогенными для человека, вызывая атипичную пневмонию (severe acute respiratory syndrome, SARS) и ближневосточный респираторный синдром (Middle East respiratory syndrome; MERS-CoV). В первом случае эпидемия вспыхнула в провинции Гуанджоу в Китае в декабре 2002 г., а затем охватила пять континентов (Peiris et al., 2003). Согласно данным ВОЗ, эпидемия SARS-CoV затронула 8437 человек, из которых 813 скончались. Коронавирусная инфекция MERS-CoV вспыхнула на Аравийском полуострове в 2012 г. (Zaki et al., 2012) и распространилась в странах Ближнего Востока, Англии и Южной Кореи. По данным ВОЗ, эпидемия затронула 1728 человек, причем в 624 случаях инфицирование MERS-CoV закончилось летальным исходом. Установлено, что источником инфицирования человека SARS-CoV и MERS-CoV являются животные (см. подробнее ниже).

Процесс инфицирования коронавирусами человека и животных

Проникая в клетки-мишени человека, SARS-CoV и MERS-CoV используют свою «корону», которая представлена многочисленными шиповидными (S) белками. Установлено, что S-белок вируса SARS-CoV взаимодействует с ангиотензин-конвертирующим ферментом 2 (ACE2; кодируется геном *ACE2*) в качестве входного рецептора (Li et al., 2003; Ge et al., 2013). В процессе вирусной инфекции тримерный белок S расщепляется на субъединицы S1 и S2, после чего они узнаются рецепторами клеток человека (Belouzard et al., 2009). Далее субъединица S1, содержащая рецептор-связывающий домен, напрямую связывается с пептидазным доменом белка ACE2, тогда как S2 отвечает за слияние мембран (Li et al., 2005).

Основываясь на этих данных, несколько независимых групп исследователей предположили, что новый коронавирус SARS-CoV2 использует такой же способ проникновения в клетки человека, что и ранее описанные SARS-подобные вирусы. Для подтверждения этой гипотезы были осуществлены сравнения между последовательностями белков SARS-подобных вирусов и нового коронавируса SARS-CoV2 и показан высокий уровень их сходства. Затем для установления сайтов связывания был проведен кристаллографический анализ комплекса между S1-субъединицей коронавируса и белка ACE2 человека. Установлено, что белок ACE2 имеет пять ключевых аминокислотных последовательностей, которые участвуют в связывании S1-субъединицы вируса (Lan et al., 2020; Wan et al., 2020; Wang et al., 2020).

Ген *ACE2* у человека экспрессируется в легких, артериях, сердце, головном мозге и тонком кишечнике и является важным компонентом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (Bader, 2013). Экспрессия *ACE2* в легких ограничена главным образом альвеолярными эпителиальными клетками второго типа. При коронавирусной инфекции происходит взаимодействие белка ACE2 с рецептор-связывающим доменом белка шипа вируса, что приводит к эндоцитозу вирусных частиц и их интернализации (Kuba et al., 2010). В результате этих событий развиваются тяжелый острый респираторный синдром, повреждение ткани легкого и обширный воспалительный процесс (Imai et al., 2005).

Важно заметить, что первые стадии коронавирусных инфекций, вызванных SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV2, имеют значительное сходство между собой.

Создание трансгенных мышей, восприимчивых к заражению коронавирусом

Как отмечалось выше, источником коронавирусных заболеваний человека были животные. В 2003 г. китайские исследователи установили, что переносчиками коронавируса SARS-CoV человеку были летучие мыши через посредника – гималайских цивет, чье мясо считается деликатесом в китайской кухне (Guan et al., 2003; Peiris et al., 2003). Основанием для такого вывода стало 99.8 % сходство генома SARS-CoV с выделенным вирусом у летучих мышей и гималайских цивет. Естественным носителем в природе коронавируса MERS-CoV являются также летучие мыши, а промежуточным переносчиком вируса к человеку – верблюды (van Boheemen et al., 2012; Reusken et al., 2013).

Следует отметить, что существует несколько видов животных, восприимчивых к инфекции SARS-CoV: хорьки, сирийские хомячки, кошки и ряд приматов – макаки, африканская зеленая обезьяна и мармозетки (Glass et al., 2004; Martina et al., 2003; Roberts et al., 2005; Subbarao, Roberts, 2006). Предполагается, что к новому коронавирусу, SARS-CoV2, могут быть восприимчивы и другие животные (Wan et al., 2020). Однако у этих инфицированных животных проявляются минимальные признаки нарушения и, как правило, отсутствуют клинические симптомы, характерные для коронавирусной инфекции у человека.

В связи с описанным выше, в основу стратегии создания модельных животных заложена технология введения в

их геном гена *ACE2* человека, т. е. основного рецептора коронавируса. Действительно, в одной из первых работ по созданию трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусной инфекции, была разработана конструкция рекомбинантной ДНК *pK18-hACE2*, включающая 5'-промотор и 1-й интрон (с мутацией в 3'-сплайс акцептора) гена *CK18* человека (кодирует цитокератин-18), а также трансляционный энхансер α -вируса мозаики люцерны (общий размер 2.5 т. п. н.), кДНК *ACE2* человека и 3'-последовательность, включающая экзон 6, интрон 6, экзон 7 и полиА-сигнальный элемент гена *CK18* человека (McCray et al., 2007). По замыслу авторов, в конструкции присутствовали все элементы для обеспечения высокого уровня ее экспрессии в эпителиальных клетках. Очищенный фрагмент ДНК размером 6.8 т. п. о., вырезанный из *pK18-hACE2*, был инъецирован в пронуклеусы гибридных (C57BL/6Jx SJL/J) зигот для получения трансгенных животных.

В эксперименте (McCray et al., 2007) получено три линии трансгенных мышей от разных основателей. Нужно отметить, что выбранная технология предусматривает случайную встройку трансгена в реципиентный геном, причем с разным числом копий. По данным авторов, количество копий трансгена в линиях варьировало от 4 до 10. Экспрессия трансгена наблюдалась в разных тканях полученных мышей: легких, тонком кишечнике, печени и почке и на низком уровне была обнаружена в головном мозге.

После интраназального заражения коронавирусом SARS-CoV трансгенных *CK18-hACE2* животных всех трех линий все они погибали позже 7-го дня после инокуляции вируса. Причем мыши, несущие большее число копий трансгена, погибали уже на 4-й день после заражения. Необходимо добавить, что потеря веса наблюдалась у всех трансгенных линий мышей в первые дни после заражения. Высокий титр вируса определялся в легких, по сравнению с контролем, и достигал наивысшего уровня на 2-й день после заражения. Эти данные предполагают повышенную репликацию вируса как ключевой элемент развития тяжелой формы заболевания у трансгенных животных. Интересно, что, несмотря на экспрессию *ACE2* человека в тонком кишечнике, печени и почке, присутствие вируса в них не обнаружено. Среди тестируемых трех линий трансгенных мышей только в одной вирус был выявлен в головном мозге, хотя экспрессия трансгена была на уровне фона.

Гистологический анализ легких на 2-й день заражения показал признаки васкуляризации и перибронхиолярного воспаления, а затем наблюдали расширение зоны воспалительного процесса, инфильтрацию клеток и слущивание клеточного эпителия у двух линий трансгенных мышей. В целом картина интраназального заражения трансгенных *CK18-hACE2* линий продемонстрировала сходство с развитием острого респираторного синдрома у человека, вызванного инфекцией SARS-CoV, т. е. эти животные могут быть использованы как модельные объекты для исследования патогенеза коронавирусной инфекции (McCray et al., 2007; Netland et al., 2008). Позднее инфицирование *CK18-hACE2* мышшей SARS-CoV2 показало сходство с клиническими проявлениями инфекции COVID-19 человека (Yinda et al., 2020).

Практически одновременно другая группа исследователей создала трансгенных мышей, экспрессирующих *ACE2* человека под контролем конститутивного CAG-промотора (Tseng et al., 2007). Последовательность кДНК гена *ACE2* человека была вставлена в экспрессирующий вектор рCAGGS/MCS, который содержал в 5'-последовательности энхансера раннего промотора цитомегаловируса «слитого» с промотором гена актина курицы, а в 3'-области – сайты сплайсинга гена глобина кролика. Общий размер экспрессирующего вектора рCAGGS-*ACE2* был 7750 п.о. Фрагмент ДНК этой кассеты был инъецирован в пронуклеусы гибридных зигот C57BL/6J × C3H/HeJ. Среди родившихся F0 потомков из экспериментальных зигот было идентифицировано пять трансгенных животных, из которых два основателя, AC70 и AC63, дали начало двум линиям. ОТ-ПЦР анализ показал присутствие транскриптов трансгена *ACE2* человека в желудке, сердце, мышцах, головном мозге, почках, легких и тонком кишечнике.

Инфицирование трансгенных мышей SARS-CoV выявило следующую симптоматику: перманентную потерю веса, одышку, неконтролируемую двигательную активность. Гибель животных наблюдалась после 3-го дня инфицирования и заканчивалась тотальной летальностью к 8-му дню. Размножение вируса происходило преимущественно в легочной ткани, тогда как в других образцах (мазках из ротовой полости, крови, сердце, селезенке, почках, моче или кале) вирус не обнаруживался. С.Т. Tseng с коллегами (2007) сделали заключение, что полученные трансгенные линии мышей восприимчивы к инфекции SARS-CoV, проявляя внешние признаки, сходные с таковыми у человека, включая летальный исход инфицированных животных. По мнению авторов, такие мыши могут быть полезны для исследования патогенеза SARS-CoV инфекции.

В 2007 г. появилась третья статья по созданию трансгенных мышей, восприимчивых к инфекции SARS-CoV (Yang et al., 2007). Эта группа исследователей использовала конструкцию, включающую промотор гена *Ace2* мыши, «слитый» с геном *ACE2* человека. ДНК этой конструкции инъецировали в зиготы ICR мышей и наблюдали рождение трансгенных животных. Экспрессия *ACE2* человека детектировалась в легких, сердце, почках и тонком кишечнике. На 3-й и 7-й дни после заражения SARS-CoV наблюдались репликация вируса в легких и признаки поражения легких: интерстициальная гиперемия и геморрагия, моноцитарная и лимфоцитарная инфильтрация, пролиферация альвеолярного эпителия и его слущивание. Интересно, что много позднее после интраназального заражения SARS-CoV2 этих трансгенных мышей была умеренная потеря веса в первые пять дней, но не зарегистрировано летальных исходов ни в одном случае (Bao et al., 2020). Мишенью и местом репликации COVID-19 была ткань легкого, что приводило к развитию признаков пневмонии. Таким образом, трансгенная линия мышей, созданная в 2007 г. (Yang et al., 2007), стала удобной платформой для исследования патогенеза двух коронавирусов, SARS-CoV и SARS-CoV2.

При использовании классической технологии трансгенеза – микроинъекций ДНК экспрессирующих векторов в пронуклеусы зигот – следует иметь в виду, что они встраиваются в реципиентный геном случайным образом

и с разным числом копий (Smirnov et al., 2020), вследствие чего экспрессия трансгена варьирует у разных основателей. Заслуживает внимания одно из таких исследований – получение трансгенных C3B6 мышей, несущих *ACE2* человека под контролем промотора HFH4, специфичного для реснитчатых эпителиальных клеток легкого (Ostrowski et al., 2003; Menachery et al., 2016). Экспрессия *ACE2* человека обнаружена в легких, головном мозге, печени, почках трансгенных HFH4-hACE2 мышей. Интраназальное заражение SARS-CoV или одного из его штаммов, WIV1-CoV, вызывало потерю веса в первые дни заражения и гибель животных после 6-го дня от момента инфекции (Menachery et al., 2016). Важно, что на этих мышках были испытаны вакцины и наблюдался их позитивный эффект против обоих типов коронавируса. Позднее эти трансгенные мыши были успешно использованы для тестирования противовирусной терапии против SARS-CoV2 (Jiang et al., 2020).

Имеет смысл остановиться на исследовании российской группы А.В. Дейкина, в котором впервые предусмотрены защитные меры самих исследователей от инфицированных коронавирусами трансгенных мышей (Bruter et al., 2021). Эти исследователи создали кассету, состоящую из двух основных элементов: вектора рKB1 и открытой рамки считывания *hACE2*. Ампициллин-резистентный вектор рKB1 сконструирован для клонирования генов, экспрессия которых зависит от Cre-рекомбинации (Cre-рекомбиназа присутствует в геноме прокариот, но отсутствует у эукариота), и содержит инсульторы и терминаторы («защитающие» трансген от влияния близлежащих последовательностей), CAG-промотор и СТОП-кассету. Кроме того, вектор содержит IRES – элемент вируса энцефаломиокардита, репортерный ген *GFP* и полиА-сигнал вируса SV40. Важно, что экспрессия трансгена *ACE2* человека активируется только после удаления СТОП-кассеты Cre-рекомбиназой.

Рекомбинантная ДНК кассеты была микроинъецирована в зиготы гибридных F₁ CBA × C57BL/6 мышей. Полученные трансгенные животные не экспрессировали ни *ACE2* человека, ни ген-репортер. Для активации трансгена проводили скрещивание трансгенных мышей с мышками B6. Cg-NdoriTg(UBC-cre/ERT2)1Ejb/1J (сокращенно Ubi-Cre), несущих ген Cre-рекомбиназы под контролем промотора UBC. У дигетерозиготных мышей ACE2-GFP и Cre- активацию трансгена проводили тамоксифеном, который активирует Cre-UBC, которая, в свою очередь, «вырезает» СТОП-кассету, и происходит активация экспрессии *ACE2* и гена-репортера (Bruter et al., 2021). Таким образом, дигетерозиготные мыши становятся восприимчивыми к коронавирусной инфекции (Dolskiy et al., 2022).

Действительно, в прямых экспериментах показано, что вирус при интраназальном заражении трансгенных мышей SARS-CoV2 вызывает утолщение перегородок альвеолярных ходов, обусловленных диффузной гиперплазией альвеолярного эпителия II типа. Кроме того, легочная ткань была подвержена лимфоцитарной инфильтрации. Важно отметить, что в легочной ткани наблюдались множественные скопления эритроцитов в сосудах (признак тромбоза). В отличие от образцов легких, при гистологическом анализе головного мозга не выявлено ка-

Основные трансгенные линии мышей с кДНК гена *ACE2* человека, восприимчивых к коронавирусной инфекции SARS-CoV и SARS-CoV2

Год создания	Название линии	Промотор	Использованная технология	Литературный источник
2007	СК18- <i>hACE2</i>	Ген <i>СК18</i> человека	Случайная инсерция трансгена	McCray et al., 2007
2007	AC70 Tg ⁺ AC63 Tg ⁺	CAG – «слитый» промотор гена актина курицы + энхансер мегаловируса	Случайная инсерция трансгена	Tseng et al., 2007
2007	<i>hACE2</i>	Ген <i>Ace2</i> мыши	Случайная инсерция трансгена	Yang et al., 2007
2003, 2016	HFH4- <i>hACE2</i>	Специфический HFH4/FOXJ1-промотор, активный в клетках реснитчатого эпителия	Случайная инсерция трансгена	Ostrowski et al., 2003 Menachery et al., 2016
2021	<i>hACE2</i> (LoxP-Stop)	CAG-промотор	Случайная инсерция трансгена	Bruter et al., 2021
2020	<i>hACE2</i>	Промотор гена <i>Ace2</i> мыши	Адресная инсерция трансгена с помощью CRISPR/Cas9	Sun et al., 2020
2021	C57BL/6N- <i>Ace2</i> ^{em2} (<i>hACE2</i> -WPRE, pgk-puro)/CCLA BALB/c- <i>Ace2</i> ^{em1} (<i>hACE2</i> -WPRE, pgk-puro)/CCLA	Промотор гена <i>Ace2</i> мыши	Адресная инсерция трансгена с помощью CRISPR/Cas9	Liu et al., 2021

ких-либо нарушений, за исключением присутствия множественных скоплений эритроцитов (признаки тромбоза) в сосудах головного мозга (Dolskiy et al., 2022). Следует заметить, что все экспериментальные трансгенные мыши погибали с 5-го до 10-го дня после интраназального вирусного заражения.

Пандемия COVID-19 стимулировала поиски новых технологий создания модельных животных – лабораторных мышей. Разработка адресной модификации геномов человека и животных с помощью технологии CRISPR/Cas9 открыла перспективу получения «гуманизированных» животных, в геноме которых целевые эндогенные гены можно заменить на гомологичные гены человека. В качестве примера можно привести эксперименты по «инсерции» кДНК гена *ACE2* человека в кодирующую последовательность эндогенного гена *Ace2* у мышей линии C57BL/6 с помощью технологии CRISPR/Cas9 (Sun et al., 2020). кДНК гена *ACE2* человека была вставлена во 2-й экзон мышинового гена *Ace2* в зиготах мыши. Такая вставка инактивировала эндогенный ген *Ace2*, а для визуализации экспрессии *ACE2* человека в его 3'-конце был вставлен ген-репортер флуоресцентного белка tdTomato (красное свечение) вместе с сайтом IRES и полиА-последовательностью. Среди родившихся мышей из экспериментальных зигот были идентифицированы трансгенные животные с целевой вставкой гена *ACE2* человека.

Такие мыши были восприимчивы к интраназальной инфекции SARS-CoV2 в молодом и зрелом возрасте; вирус поражал легкие, трахеи и головной мозг. При интраназальном инфицировании развивалась интерстициальная пневмония, сходная по проявлениям с таковой человека, инфицированного SARS-CoV2, но без летального эффекта. Вполне понятно, что такие ген-модифицированные мыши рассматриваются как привлекательная модель ко-

ронавирусной инфекции человека и потенциально могут служить платформой для испытания вакцин и тестирования фармакологических препаратов.

Сходный подход «гуманизации» гена *Ace2* мыши посредством целевой инсерции кДНК гена *ACE2* человека был использован на линиях эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) мышей C57BL/6 и BALB/c с применением технологии CRISPR/Cas9 (Liu et al., 2021). Уместно напомнить, что использованные линии ЭСК способны после инъекции в полость тетраплоидных бластоцист замещать эндогенные клетки внутренней массы, в результате чего рождаются трансгенные потомки, развившиеся из донорских ЭСК. Полученные таким способом трансгенные линии мышей, названные C57BL/6N*Ace2em2*(*hACE2*-WPRE, pgk-puro)/CCLA и BALB/c-*Ace2em1*(*hACE2*-WPRE, pgk-puro)/CCLA, были восприимчивы к интраназальной инфекции SARS-CoV2, хотя и отличались от трансгенных мышей, полученных S.-H. Sun с коллегами (2020) по ряду признаков. Таким образом, к настоящему времени получена серия линий «гуманизированных» мышей, несущих трансген *ACE2* человека и восприимчивых к коронавирусной инфекции и потенциально способных моделировать коронавирусную патологию человека.

Заключение

Суммируя данные по получению трансгенных мышей, восприимчивых к коронавирусной инфекции, следует отметить, что, несмотря на разнообразие созданных трансгенных линий мышей (см. таблицу), наибольшей популярностью у исследователей пользуются мыши СК18-*hACE2*, полученные Р.В. McCray с коллегами (2007). По данным PubMed, в период с 2020 по 2022 г. опубликована 101 статья, где использована эта линия как модельный объект для исследования патогенеза коронавирусной ин-

фекции SARS-CoV2. Тем не менее разработка новых моделей продолжается, поскольку источником поставки мышей линии SK18-hACE2 является Джексонская лаборатория (США), которая поставляет их только на эксперимент без права разведения их в национальных вивариях других стран.

Список литературы / References

- Bader M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: the other side of the coin. *Pflugers Arch.* 2013;465(1):79-85. DOI 10.1007/s00424-012-1120-0.
- Bao L., Deng W., Huang B., Gao H., Liu J., Ren L., Wei Q., Yu P., Xu Y., Qi F., Qu Y., Li F., Lv Q., Wang W., Xue J., Gong S., Liu M., Wang G., Wang S., Song Z., Zhao L., Liu P., Zhao L., Ye F., Wang H., Zhou W., Zhu N., Zhen W., Yu H., Zhang X., Guo L., Chen L., Wang C., Wang Y., Wang X., Xiao Y., Sun Q., Liu H., Zhu F., Ma C., Yan L., Yang M., Han J., Xu W., Tan W., Peng X., Jin Q., Wu G., Qin C. The pathogenicity of SARS-CoV-2 in hACE2 transgenic mice. *Nature.* 2020;583(7818):830-833. DOI 10.1038/s41586-020-2312-y.
- Belouzard S., Chu V.C., Whittaker G.R. Activation of the SARS coronavirus spike protein via sequential proteolytic cleavage at two distinct sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009;106(14):5871-5876. DOI 10.1073/pnas.0809524106.
- Bruter A.V., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Sergiev P.S., Kalinina A.A., Ilchuk K.A., Yuliya Yu., Silaeva Y.Y., Korshunov E.K., Soldatov V.O., Deykin A.V. Novel transgenic mice with Cre-dependent co-expression of GFP and human ACE2: a safe tool for study of COVID-19 pathogenesis. *Transgenic Res.* 2021;30(3):289-301. DOI 10.1007/s11248-021-00249-8.
- Dolskiy A.A., Gudymo A.S., Taranov O.S., Grishchenko I.V., Shitik E.M., Prokopov D.Y., Soldatov V.O., Sobolevskaya E.V., Bodnev S.A., Danilchenko N.V., Moiseeva A.A., Torzhkova P.Y., Bulanovich Y.A., Onhonova G.S., Ivleva E.K., Kubekina M.V., Belykh A.E., Tregubchak T.V., Ryzhikov A.B., Gavrilova E.V., Maksyutov R.A., Deykin A.V., Yudkin D.V. The tissue distribution of SARS-CoV-2 in transgenic mice with inducible ubiquitous expression of hACE2. *Front. Mol. Biosci.* 2022;8:821506. DOI 10.3389/fmolb.2021.821506.
- Ge X.-Y., Li J.-L., Yang X.-L., Chmura A.A., Zhu G., Epstein J.H., Mazet J.K., Hu B., Zhang W.L., Peng C., Zhang Y.-J., Luo C.-M., Tan B., Wang N., Zhu Y., Cramer G., Zhang S.-Y., Wang L.-F., Daszak P., Shi Z.-L. Isolation and characterization of a bat SARS-like coronavirus that uses the ACE2 receptor. *Nature.* 2013;503(7477):535-538. DOI 10.1038/nature12711.
- Glass W.G., Subbarao K., Murphy B., Murphy P.M. Mechanisms of host defense following severe acute respiratory syndrome-coronavirus (SARS-CoV) pulmonary infection of mice. *J. Immunol.* 2004;173(6):4030-4039. DOI 10.4049/jimmunol.173.6.4030.
- Guan Y., Zheng B.J., He Y.Q., Liu X.L., Zhuang Z.X., Cheung C.L., Luo S.W., Li P.H., Zhang L.J., Guan Y.J., Butt K.M., Wong K.L., Chan K.W., Lim W., Shortridge K.F., Yuen K.Y., Peiris J.S., Poon L.L. Isolation and characterization of viruses related to the SARS coronavirus from animals in southern China. *Science.* 2003;302(5643):276-278. DOI 10.1126/science.1087139.
- Imai Y., Kuba K., Rao S., Huan Y., Guo F., Guan B., Yang P., Sarao R., Wada T., Leong-Poi H., Crackower M.A., Fukamizu A., Hui C.-C., Hein L., Uhlig S., Slutsky A.S., Jiang C., Penninger J.M. Angiotensin-converting enzyme 2 protects from severe acute lung failure. *Nature.* 2005;436(7047):112-116. DOI 10.1038/nature03712.
- Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shan C., Zhou Y.-W., Shen X.-R., Li Q., Zhang L., Zhu Y., Si H.-R., Wang Q., Min J., Wang X., Zhang W., Li B., Zhang H.-J., Baric R.S., Zhou P., Yang X.-L., Shi Z.-L. Pathogenesis of SARS-CoV-2 in transgenic mice expressing human angiotensin-converting enzyme 2. *Cell.* 2020;182(1):50-58.e8. DOI 10.1016/j.cell.2020.05.027.
- Kuba K., Imai Y., Ohto-Nakanishi T., Penninger J.M. Trilogy of ACE2: a peptidase in the renin-angiotensin system, a SARS receptor, and a partner for amino acid transporters. *Pharmacol. Ther.* 2010;128(1):119-128. DOI 10.1016/j.pharmthera.2010.06.003.
- Lai M.M.C., Perlman S., Anderson J. Coronaviridae. In: Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). *Fields Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins, 2007;1305-1335.
- Lan J., Ge J., Yu J., Shan S., Zhou H., Fan S., Zhang Q., Shi X., Wang Q., Zhang L., Wang X. Structure of the SARS-CoV-2 spike receptor-binding domain bound to the ACE2 receptor. *Nature.* 2020;581(7807):215-220. DOI 10.1038/s41586-020-2180-5.
- Li F., Li W., Farzan M., Harrison S.C. Structure of SARS coronavirus spike receptor binding domain complexed with receptor. *Science.* 2005;309(5742):1864-1868. DOI 10.1126/science.1116480.
- Li Q., Guan X., Wu P., Wang X., Zhou L., Tong Y., Ren R., Leung K.S.M., Lau E.H.Y., Wong J.Y., Xing X., Xiang N., Wu Y., Li C., Chen Q., Li D., Liu T., Zhao J., Liu M., Tu W., Chen C., Jin L., Yang R., Wang Q., Zhou S., Wang R., Liu H., Luo Y., Liu Y., Shao G., Li H., Tao Z., Yang Y., Deng Z., Liu B., Ma Z., Zhang Y., Shi G., Lam T.T.Y., Wu J.T., Gao G.F., Cowling B.J., Yang B., Leung G.M., Feng Z. Early transmission dynamics in Wuhan, China, of novel Coronavirus-infected pneumonia. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(13):1199-1207. DOI 10.1056/NEJMoa2001316.
- Li W., Moore M.J., Vasilieva N., Sui J., Wong S.K., Berne M.A., Somasundaran M., Sullivan J.L., Luzuriaga K., Greenough T.C., Choe H., Farzan M. Angiotensin-converting enzyme 2 is a functional receptor for the SARS coronavirus. *Nature.* 2003;426(6965):450-454. DOI 10.1038/nature02145.
- Liu F.-L., Wu K., Sun J., Duan Z., Quan X., Kuang J., Chu S., Pang W., Gao H., Xu L., Li Y.-C., Zhang H.-L., Wang X.-H., Luo R.-H., Feng X.-L., Schöler H.R., Chen X., Pei D., Wu G., Zheng Y.-T., Chen J. Rapid generation of ACE2 humanized inbred mouse model for COVID-19 with tetraploid complementation. *Natl. Sci. Rev.* 2021;8(2):nwaa285. DOI 10.1093/nsr/nwaa285.
- Martina B.E., Haagmans B.L., Kuiken T., Fouchier R.A., Rimmelzwaan G.F., Van Amerongen G., Peiris J.S.M., Lim W., Osterhaus A.D.M.E. Virology: SARS virus infection of cats and ferrets. *Nature.* 2003;425(6961):915. DOI 10.1038/425915a.
- McCray P.B. Jr., Pewe L., Wohlford-Lenane C., Hickey M., Manzel L., Shi L., Netland J., Jia H.P., Halabi C., Sigmund C.D., Meyerholz D.K., Kirby P., Look D.C., Perlman S. Lethal infection of K18-hACE2 mice infected with severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Virol.* 2007;81(2):813-821. DOI 10.1128/JVI.02012-06.
- Menachery V.D., Yount B.L. Jr., Sims A.C., Debbink K., Agnihothram S.S., Gralinski L.E., Graham R.L., Scobey T., Plante J.A., Royal S.R., Swanstrom J., Sheahan T.P., Pickles R.J., Corti D., Randell S.H., Lanzavecchia A., Marasco W.A., Baric R.S. ARS-like WIV1-CoV poised for human emergence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016;113(11):3048-3053. DOI 10.1073/pnas.1517719113.
- Netland J., Meyerholz D.K., Moore S., Cassell M., Perlman S. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection causes neuronal death in the absence of encephalitis in mice transgenic for human ACE2. *J. Virol.* 2008;82(15):7264-7275. DOI 10.1128/JVI.00737-08.
- Ostrowski L.E., Hutchins J.R., Zakel K., O'Neal W.K. Targeting expression of a transgene to the airway surface epithelium using a ciliated cell-specific promoter. *Mol. Ther.* 2003;8(4):637-645. DOI 10.1016/S1525-0016(03)00221-1.
- Peiris J.S., Lai S.T., Poon L.L., Guan Y., Yam L.Y.C., Lim W., Nicholls J., Yee W.K.S., Yan W.W., Cheung M.T., Cheng V.C.C., Chan K.H., Tsang D.N.C., Yung R.W.H., Ng T.K., Yuen K.Y., SARS study group. Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet.* 2003;361(9366):1319-1325. DOI 10.1016/S0140-6736(03)13077-2.
- Reusken C.B., Haagmans B.L., Müller M.A., Gutierrez C., Godeke G.J., Meyer B., Muth D., Raj V.S., Smits-De Vries L., Corman V.M., Drexler J.-F., Smits S.L., El Tahir Y.E., De Sousa R., van Beek J., Nowotny N., van Maanen K., Hidalgo-Hermoso E., Bosch B.-J.,

- Rottier P., Osterhaus A., Gortázar-Schmidt C., Drosten C., Koopmans M.P. Middle East respiratory syndrome coronavirus neutralising serum antibodies in dromedary camels: a comparative serological study. *Lancet. Infect. Dis.* 2013;13(10):859-866. DOI 10.1016/S1473-3099(13)70164-6.
- Roberts A., Vogel L., Guarner J., Hayes N., Murphy B., Zaki S., Subbarao K. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of golden Syrian hamsters. *J. Virol.* 2005;79(1):503-511. DOI 10.1128/JVI.79.1.503-511.2005.
- Smirnov A., Fishman V., Yunusova A., Korablev A., Serova I., Skryabin B.V., Rozhdestvensky T.S., Battulin N. DNA barcoding reveals that injected transgenes are predominantly processed by homologous recombination in mouse zygote. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(2):719-735. DOI 10.1093/nar/gkz1085.
- Subbarao K., Roberts A. Is there an ideal animal model for SARS? *Trends Microbiol.* 2006;14(7):299-303. DOI 10.1016/j.tim.2006.05.007.
- Sun S.-H., Chen Q., Gu H.-J., Yang G., Wang Y.-X., Huang X.-Y., Liu S.-S., Zhang N.-N., Li X.-F., Xiong R., Guo Y., Deng Y.-Q., Huang W.-J., Liu Q., Liu Q.-M., Shen Y.-L., Zhou Y., Yang X., Zhao T.-Y., Fan C.-F., Zhou Y.-S., Qin C.-F., Wang Y.-C. A mouse model of SARS-CoV-2 infection and pathogenesis. *Cell Host Microbe.* 2020;28(1):124-133.e4. DOI 10.1016/j.chom.2020.05.020.
- Takaki H., Oshiumi H., Shingai M., Matsumoto M., Seya T. Development of mouse models for analysis of human virus infections. *Microbiol. Immunol.* 2017;61(3-4):107-113. DOI 10.1111/1348-0421.12477.
- Tseng C.T., Huang C., Newman P., Wang N., Narayanan K., Watts D.M., Makino S., Packard M.M., Zaki S.R., Chan T.-S., Peters C.J. Severe acute respiratory syndrome coronavirus infection of mice transgenic for the human angiotensin-converting enzyme 2 virus receptor. *J. Virol.* 2007;81(3):1162-1173. DOI 10.1128/JVI.01702-06.
- van Boheemen S., de Graaf M., Lauber C., Bestebroer T.M., Raj V.S., Zaki A.M., Osterhaus A.D., Haagmans B.L., Gorbalenya A.E., Snijder E.J., Fouchier R.A. Genomic characterization of a newly discovered coronavirus associated with acute respiratory distress syndrome in humans. *mBio.* 2012;3(6):e00473-12. DOI 10.1128/mBio.00473-12.
- Wan Y., Shang J., Graham R., Baric R.S., Li F. Receptor recognition by the novel coronavirus from Wuhan: an analysis based on decade-long structural studies of SARS coronavirus. *J. Virol.* 2020;94(7):e00127-20. DOI 10.1128/jvi.00127-20.
- Wang Q., Zhang Y., Wu L., Niu S., Song C., Zhang Z., Lu G., Qiao C., Hu Y., Yuen K.-Y., Wang Q., Zhou H., Yan J., Qi J. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. *Cell.* 2020;181(4):894-904. DOI 10.1016/j.cell.2020.03.045.
- Woo P.C.Y., Lau S.K.P., Huang Y., Yuen K.-Y. Coronavirus diversity, phylogeny and interspecies jumping. *Exp. Biol. Med. (Maywood).* 2009a;234(10):1117-1127. DOI 10.3181/0903-MR-94.
- Woo P.C., Lau S.K., Lam C.S., Lai K.K., Huang Y., Lee P., Luk G.S., Dyrting K.C., Chan K.H., Yuen K.Y. Comparative analysis of complete genome sequences of three avian coronaviruses reveals a novel group 3c coronavirus. *J. Virol.* 2009b;83(2):908-917. DOI 10.1128/JVI.01977-08.
- Yang X.H., Deng W., Tong Z., Liu Y.X., Zhang L.F., Zhu H., Gao H., Huang L., Liu Y.L., Ma C.M., Xu Y.F., Ding M.X., Deng H.K., Qin C. Mice transgenic for human angiotensin-converting enzyme 2 provide a model for SARS coronavirus infection. *Comp. Med.* 2007;57(5):450-459. PMID: 17974127.
- Yinda C.K., Port J.R., Bushmaker T., Owusu I.O., Avanzato V.A., Fischer R.J., Schulz J.E., Holbrook M.G., Hebner M.J., Rosenke R., Thomas T., Marzi A., Best S.M., de Wit E., Shaia C., van Doremalen N., Munster V.J. K18-hACE2 mice develop respiratory disease resembling severe COVID-19. *bioRxiv.* 2020;Aug 11; 2020.08.11.246314. DOI 10.1101/2020.08.11.246314.
- Zaki A.M., van Boheemen S., Bestebroer T.M., Osterhaus A.D.M.E., Fouchier R.A.M. Isolation of a novel coronavirus from a man with pneumonia in Saudi Arabia. *N. Engl. J. Med.* 2012;367(19):1814-1820. DOI 10.1056/NEJMoa1211721.
- Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., Guan L., Wei Y., Li H., Wu X., Xu J., Tu S., Zhang Y., Chen H., Cao B. Clinical course and risk factors for mortality of adult inpatients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study. *Lancet.* 2020;395(10229):1054-1062. DOI 10.1016/S0140-6736(20)30566-3.
- Zhou P., Yang X.-L., Wang X.-G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.-R., Zhu Y., Li B., Huang C.-L., Chen H.-D., Chen J., Luo Y., Guo H., Jiang R.-D., Liu M.-Q., Chen Y., Shen X.-R., Wang X., Zheng X.-S., Zhao K., Chen Q.-J., Deng F., Liu L.-L., Yan B., Zhan F.-X., Wang Y.-Y., Xiao G.-F., Shi Z.-L. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature.* 2020;579(7798):270-273. DOI 10.1038/s41586-020-2012-7.
- Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., Niu P., Zhan F., Ma X., Wang D., Xu W., Wu G., Gao G.F., Tan W. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N. Engl. J. Med.* 2020;382(8):727-733. DOI 10.1056/NEJMoa2001017.

ORCID ID

O.L. Serov orcid.org/0000-0003-1056-2966

Благодарности. Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60094. Доступ к полнотекстовым версиям публикаций осуществлялся при поддержке бюджетного проекта № FWNR-2022-0019.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию 16.02.2022. После доработки 25.03.2022. Принята к публикации 25.03.2022.