

УДК 577.29

ТРАНСГЕНЕЗ В ЧЕРВЯХ: ПРЕТЕНДЕНТЫ НА ИДЕАЛЬНУЮ МОДЕЛЬ

© 2022 г. И. С. Сухих^а *, М. Ю. Бирюков^а, А. Г. Блинов^а **

^а Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, 630090 Россия

*e-mail: igor3419@gmail.com

**e-mail: blinov@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 13.05.2022 г.

После доработки 23.06.2022 г.

Принята к публикации 28.06.2022 г.

Трансгенез – важный и зачастую необходимый метод для изучения многих процессов жизнедеятельности животных. Чтобы создать линии трансгенных животных, необходимы подходящие модельные организмы, которые имели бы полезные особенности для эффективного и доступного трансгенеза. В обзоре охарактеризованы существующие модельные организмы различных таксонов червей, для которых показан эффективный метод трансгенеза. Особое внимание уделено плоским червям, в частности *Macrostomum lignano* – как перспективному модельному организму для изучения процессов старения, регенерации и канцерогенеза.

Ключевые слова: плоские черви, *Macrostomum lignano*, трансгенез, модельные организмы, транспозоны

DOI: 10.31857/S0026898422060210

ВВЕДЕНИЕ

Для изучения функции генов в ходе онкогенеза, регенерации, старения, заболеваний и визуализации тканей и органов часто используют трансгенных животных, несущих в своем геноме искусственно введенные генные конструкции [1–9]. Такие трансгены позволяют локализовать клетки, в которых экспрессируются интересные гены, а также вносить функциональные изменения в работу клеток [10]. Выбор оптимальных модельных организмов – важный, возможно, ключевой момент в создании трансгенных животных для подобных исследований. Очевидно, что для медицины желательно использовать физиологически наиболее приближенные к человеку модельные организмы (такие как мыши, овцы, обезьяны и другие млекопитающие), однако далеко не всегда разумно использовать именно их [11]. Затраты на содержание, время смены поколений и скорость развития не позволяют быстро и доступно изучать многие процессы, связанные со старением и развитием тканей на примере млекопитающих [5, 10]. Более того, изучение регенерации, а также многих других процессов на моделях млекопитающих и других позвоночных весьма ограничено.

При выборе подходящих трансгенных кандидатов стоит искать модельные организмы, которые удовлетворяли бы следующим требованиям: 1) относительная простота содержания и поддер-

жания культур животных; 2) возможность разработки эффективного и воспроизводимого метода получения трансгенных линий; 3) быстрая скорость роста и развития до половозрелого состояния, быстрая смена поколений; 4) наличие полногеномной сборки.

Стоит отметить, что получение трансгенных линий напрямую зависит от возможности и доступности микроинъекций или других методов создания трансгенных линий. Еще одно важное достоинство – простота проверки встройки трансгена, так как процент успешного трансгенеза редко достигает больших значений. Таким образом, простой скрининг, например использование флуоресцентных белков при прозрачном теле модельного организма, будет большим преимуществом [2, 12]. Дополнительным преимуществом для любого модельного организма будет возможность применения методов редактирования генома, например с помощью системы CRISPR-Cas9, которая получила широкое распространение в последние годы благодаря эффективности и доступности [13].

Очевидно, что наибольшую скорость роста и развития, а также смены поколений стоит искать среди видов беспозвоночных. Как правило, чем проще устроен организм, тем его легче содержать и тем быстрее происходит смена поколений. Кроме того, для работы с большинством беспозвоночных видов не требуется соблюдения специ-

альных этических норм, что облегчает работу с ними [14]. Однако модельный организм должен обладать достаточной высокой степенью организации, чтобы на нем можно было изучать интересные процессы. Учитывая все вышперечисленное, логично заключить, что модельные организмы, удовлетворяющие данным требованиям, стоит искать среди различных таксонов червей.

ТРАНСГЕНЕЗ В ЧЕРВЯХ – МОДЕЛЬНЫХ ОРГАНИЗМАХ

Среди беспозвоночных существует широкий спектр модельных организмов, однако далеко не для всех успешно созданы трансгенные линии [2, 4, 7, 8, 12, 15]. При изучении процессов старения, регенерации и прочих связанных с ними механизмов имеет смысл искать модели среди червей различных групп. Одним из самых успешных и известных примеров является *Caenorhabditis elegans* [15, 16]. Интерес представляют также *Hofstenia miamia* [12] и плоские черви [2, 7, 8]. В табл. 1 приведены основные характеристики наиболее известных модельных объектов среди червей.

Caenorhabditis elegans

C. elegans уже долгие годы служит популярным модельным организмом для изучения регенерации и старения, а также многих других процессов. Метод трансгенеза показан для данного круглого червя [16], также разработан эффективный протокол микроинъекций для создания трансгенных линий [17]. Более того, для *C. elegans* получены эффективные методы редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 [18]. Таким об-

разом, как модель *C. elegans* привлекательна тем, что позволяет использовать обширный спектр различных методов манипуляции с геномом.

Взрослый червь имеет размер всего около 1 мм и является самооплодотворяющимся гермафродитом. *C. elegans* достигает половозрелости через 2.5–4 суток после вылупления из яйца и живет примерно 18–20 суток при температуре 20°C [19]. Благодаря небольшому размеру и неприхотливости в пище *C. elegans* достаточно прост в содержании и разведении в больших количествах (~250 червей за несколько дней). Более того, этот круглый червь обладает высокой степенью геномной гомологии с человеком (60–80%), что позволяет использовать его в качестве модели для тестирования многих лекарств [5]. Благодаря большому интересу исследователей к *C. elegans* в последние десятилетия, полностью собран его геном и разработаны многие молекулярно-биологические методы для его изучения, такие как трансгенез, РНК-интерференция и нокаут генов [20]. Быстрое развитие и размножение *C. elegans* позволяет использовать этот вид как хорошую модель для скрининга препаратов, направленных на замедление старения, а также для изучения старения в целом [21]. Так, например, Machino с соавт. [22] показали, что линия *C. elegans*, несущая трансген бета-амилоида 1–42 (A β) человека под контролем нейронспецифичного промотора, приводит к снижению локомоторной активности червей в восемь раз, и это согласуется с данными, полученными при наблюдении пациентов с болезнью Альцгеймера. В другой работе, Sonowal с соавт., установлено, что индол-3-карбоксальдегид и индолуксусная кислота могут увеличивать продолжительность жизни *C. elegans*. Эти соединения также эффективны в отношении

Таблица 1. Характеристики различных видов червей, которые важны при создании трансгенных линий для изучения старения, регенерации и канцерогенеза

Характеристики	Вид/тип				
	<i>Caenorhabditis elegans</i> / Nematoda	<i>Hofstenia miamia</i> / Xenacoelomorpha	<i>Schmidtea mediterranea</i> / Platyhelminthes	<i>Girardia tigrina</i> / Platyhelminthes	<i>Macrostomum lignano</i> / Platyhelminthes
Одноклеточные оплодотворенные яйца	+	+	–	–	+
Размер тела, мм	1	2–2.5	20	5–10	0.9
Прозрачность тела	+	+	–/+	–/+	+
Время достижения половозрелости, сутки	2.5–4	40–60	170–180	170–180	15–30
Высокая способность к регенерации	+	+	+	+	+
Наличие геномной сборки	+	+	+	+	+
Продолжительность жизни	18–20 суток	Не установлена	~3 года	~3 года	2–3 года
Наличие неопластов	–	+	+	+	+

дрозофилы и мышей, что позволяет говорить о потенциальном использовании об их в качестве кандидатов для создания лекарств, способствующих увеличению продолжительности жизни [23].

Таким образом, неудивительно, что *C. elegans* давно зарекомендовал себя как хороший модельный объект для изучения регенерации и старения, а также для первичного скрининга лекарств. Однако стоит отметить, что у *C. elegans* нет неопластов — стволовых клеток, опосредующих регенерацию, — поэтому изучение регенерации и восстановления частей тела на этих червях ограничено [24].

Hofstenia miamia

В отличие от *C. elegans*, *Hofstenia miamia* лишь недавно предложен как модельный организм для изучения стволовых клеток, регенерации и развития. Однако этот вид имеет большой потенциал в таких исследованиях. В статье Ricci с соавт. [12] представлен эксперимент по успешному созданию трансгенных линий турбеллярии *H. miamia* методом микроинъекций плазмид, несущих трансген. Также авторами установлена возможность редактирования генома с помощью системы CRISPR-Cas9 путем микроинъекции белка Cas9 и соответствующей гидовой РНК. *H. miamia* — представитель типа Xenacoelomorpha, базальный таксон билатеральных животных [25], относится к более древнему виду, чем большинство червей-моделей. Эти черви способны к регенерации всего тела с помощью популяции стволовых клеток — неопластов, что позволяет использовать их как модель для изучения регенерации. *H. miamia* обладает прозрачным телом, что дает возможность использовать флуоресцентные белки для мониторинга встройки трансгенов, а также визуализации различных органов и тканей [12].

H. miamia имеет значительно более длинный жизненный цикл, чем *C. elegans*: червь становится взрослым примерно через два месяца после откладки яйца. Данная особенность может быть полезна для изучения ранних стадий развития червя, однако относительно медленная смена поколений делает создание трансгенных линий затруднительным. В случае, когда трансген оказывает влияние на поздние стадии развития червя, необходимо ждать около двух месяцев для проверки влияния трансгена, что удлиняет время эксперимента [26]. Также определенные неудобства для трансгенеза вызывает отсутствие возможности искусственно индуцировать откладку яиц, что приводит к необходимости собирать оплодотворенные яйца в течение дня перед каждым раундом микроинъекций. Более того, некоторые участки генома имеют очень низкий GC-состав, что затрудняет картирование

трансгена в случае, если встройка происходит в такие районы [12].

Таким образом, *H. miamia* — молодой модельный организм с достаточным потенциалом для изучения регенерации частей тела, а также процессов, запускаемых при образовании ран и повреждении тканей.

ПЛОСКИЕ ЧЕРВИ

В последние десятилетия растет интерес к таксону плоских червей как к новому типу модельных организмов. Наличие специальных клеток — неопластов — позволяет плоским червям восстанавливать части тела после значительных повреждений, что делает их подходящими объектами для изучения важных процессов, таких как регенерация и старение [27]. Несмотря на то, что для большинства плоских червей-моделей не разработан протокол геномного редактирования, больших успехов в этом достигли Sankaranarayanan с соавт. [28]. Они показали возможность создания больших делеций с помощью системы CRISPR-Cas9 в геноме плоского червя *Schistosoma mansoni*, относящегося к паразитам животных и человека. Данный факт говорит о том, что для плоских червей, в целом, есть возможность редактирования генома с помощью современных, эффективных систем. В последние годы многими исследователями предложены различные виды плоских червей в качестве модельных организмов: *Schmidtea mediterranea*, *Girardia tigrina* и *Macrostomum lignano* [2, 7, 8].

Schmidtea mediterranea

S. mediterranea — свободноживущий плоский червь, который способен размножаться как асексуально, так и половым способом. Этот червь имеет размеры около 2 мм и неприхотлив в содержании [29]. Невероятная способность к регенерации благодаря неопластам сделала *S. mediterranea* одним из основных модельных организмов для изучения регенерации и восстановления органов и тканей. Несмотря на длительное время изучения, для *S. mediterranea* не разработано эффективного и простого механизма трансгенеза [8]. Создание трансгенных линий *S. mediterranea* осложнено многими факторами, такими как неэффективная доставка генетического материала в клетки, непрозрачное тело и отсутствие доступных стабильных линий, способных размножаться половым путем. Большая часть линий планарий размножаются исключительно бесполом путем при разделении червя на части с последующей регенерацией [30]. Однако, даже при наличии линии, размножающейся половым путем, обычный метод микроинъекций для доставки трансгена весьма затруднителен, так как планарии откладывают капсулы

с яйцами, в которых зиготы распределены среди большого количества клеток желтка [29, 31].

Ближе всего к решению данных проблем подошли Hall с соавт. [8], создав набор методов, основанных на трансфекции мРНК, кодирующей нанолуциферазу в соматических клетках червя, что позволило им измерять уровень экспрессии белка методами спектро- и микроскопии. Проблемы доставки мРНК решены с использованием нанотрубок из оксида алюминия и химического реагента для трансфекции. Из трех протестированных реагентов — Lipofectamine 3000, Trans-IT и Viromer — выбран последний, как наиболее эффективный по силе получаемого сигнала. Также решена проблема аутофлуоресценции червя, что позволило Hall с соавт. визуализировать клетки *S. mediterranea*, в которых происходила экспрессия репортерного белка. С этой целью ими исследована нанолуцифераза Nluc, полученная из креветки *Oplophorus gracilirostris*, которая дает сигнал, на порядок превышающий свечение других люцифераз [32]. Использование такой люциферазы позволяет регистрировать даже слабый сигнал экспрессии белка [8].

S. mediterranea была и будет значимым модельным организмом для изучения регенерации, однако использование трансгенов для изучения регенерации все еще остается невозможным. Создание и поддержание трансгенных линий также затруднено длительным периодом развития этого червя до взрослого состояния — около полугода. Таким образом, в случае *S. mediterranea* возникает та же проблема, что и для *H. miamia*, при использовании в исследованиях, связанных со сменой поколений, хотя ее можно обойти путем создания множества трансгенных линий в короткие сроки.

Girardia tigrina

Girardia tigrina, также как и *S. mediterranea*, представитель семейства Dugesidae, имеют множество особенностей, приведенных в табл. 1 [33]. Задолго до экспериментов по созданию трансгенных линий *S. mediterranea*, проведенных Hall с соавт. [8], показано успешное создание трансгенных линий *G. tigrina* методом микроинъекции транспозонных векторов в полость кишечника и паренхиму с последующей электропорацией. González-Estévez и соавт. [7] тестировали три разных транспозона в качестве возможных векторов для встройки гена флуоресцентного белка EGFP под контролем промотора P3, который работает в фоторецепторных клетках. Так как *G. tigrina* не обладает прозрачным телом, авторы выбрали глаза как орган, в котором флуоресценцию относительно легко регистрировать по сравнению с остальным телом. После микроинъекции и электропорации получены черви с мозаичным типом трансгенных вставок, что не соответствует пол-

ноценной трансгенной линии. Однако мозаичность присутствовала даже после нескольких циклов деления и регенерации, что говорит об устойчивом наследовании необластов в ряду поколений. Кроме того, авторы получили гомогенные линии из этих мозаичных линий путем регенерации необластов, несущих трансген [7]. Из трех использованных векторов наилучшие результаты были получены для транспозонов *Hermes* и *piggyBac*. Эффективность встраивания транспозона *mariner* была ниже. Таким образом, González-Estévez с соавт. [7] установили возможность создания трансгенных линий планарий. Однако все ограничения, связанные с использованием *S. mediterranea* как модельного организма для изучения старения: длительный период развития организма до половозрелого состояния и непрозрачное тело, — актуальны и в случае *G. tigrina*.

Macrostomum lignano

M. lignano представляет собой один из самых многообещающих модельных организмов для изучения процессов старения, регенерации и онкогенеза. До сих пор естественные случаи опухолеобразования не обнаружены у *M. lignano*, несмотря на высокую степень пролиферации стволовых клеток. Более того, этот червь обладает высокой резистентностью к внешним источникам повреждения ДНК, таким как ионизирующее излучение и химические канцерогены [34, 35].

Свободноживущий плоский червь *M. lignano* — это гермафродит, не обладающий способностью к самооплодотворению, имеет прозрачное тело и размер всего около 0.9 мм. Культуры данных червей легко поддерживать в больших количествах без значительных затрат. Черви откладывают по одному оплодотворенному яйцу один—два раза в сутки и даже в условиях голодания в течение трех—четырех дней. Только что отложенное яйцо находится на стадии одной клетки, что позволяет производить трансгенез методом микроинъекции. Через четыре—пять дней из яйца вылупляется червь, который примерно через 20—30 суток может давать потомство. Все эти особенности делают трансгенез этих червей не только возможным, но и удобным. В случае *M. lignano* уже разработан стабильно работающий метод трансгенеза на основе случайной интеграции, в результате которой получено несколько трансгенных линий [2, 36]. Помимо метода трансгенеза на основе случайной интеграции, недавно успешно созданы две трансгенные линии *M. lignano* с помощью векторной системы на основе транспозона *piggyBac* [37]. Положительный фактор — прочитанный и аннотированный геном [2]. Более того, разработаны протоколы проведения нокдауна генов методом РНК-интерференции путем простого помещения червей в раствор с двухцепочечной РНК. Несмотря

ря на то, что до сих пор не опубликован протокол геномного редактирования с помощью системы CRISPR-Cas9 для *M. lignano*, существенных препятствий для использования этого метода нет, особенно учитывая успехи применения CRISPR на шистосомах [28]. Возможность одновременной микроинъекции нуклеиновых кислот и белков в одноклеточные яйца может стать отличным заделом для доставки нуклеазы Cas9, гидовой РНК и матрицы ДНК в клетки. Таким образом, можно ожидать, что вскоре будет разработан эффективный протокол геномного редактирования *M. lignano* на основе системы CRISPR-Cas9. Такой метод создания линий червей-нокаутов, или нокинов, сделает *M. lignano* еще более привлекательным для исследователей. Более подробно биология и физиология *M. lignano* описана в обзорах Wudarski и др. [38] и Mouton и др. [39].

Недавно показано, что геном *M. lignano* подвергнулся дубликации с последующим слиянием одного гаплоидного набора хромосом в одну метацентрическую хромосому [40, 41]. Эта дубликация чрезвычайно интересна для изучения эволюции строения генома и хромосом, а также защиты генома *M. lignano* от повреждений. Однако она может быть недостатком при верификации успешности трансгенеза, так как точное картирование места встройки в трансгенную линию становится затруднительным.

Несмотря на то, что *M. lignano* представляет удобную модель для изучения фундаментальных клеточных процессов в ходе регенерации, старении и развитии, данный червь может быть использован и в исследованиях с более практическим уклоном. Так *M. lignano* может найти применение в разработке методов лечения шистосомозов, вызываемых паразитическими плоскими червями рода *Schistosoma*. Поиск жизненно необходимых генов, специфичных для плоских червей, может дать ученым дополнительные цели для сайленсинга в геноме шистосомы, а следовательно, появится возможность целенаправленно редактировать геном паразитов для лечения пораженного им организма.

Таким образом, *M. lignano* представляет собой наиболее удобную модель среди плоских червей для изучения множества процессов и может служить хорошей альтернативой *C. elegans* в исследованиях стволовых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Для изучения таких процессов, как регенерация, старение и канцерогенез, необходимы манипуляции с модельными организмами, для которых будут разработаны методы трансгенеза. Согласно критериям, приведенным в данном обзоре, наилучшей моделью для создания трансгенных линий служит плоский червь *M. lignano* и

хорошо зарекомендовавший себя круглый червь *C. elegans*. Благодаря быстрому росту и развитию до половозрелого состояния, при достаточно большой продолжительности жизни эти виды червей имеют большой потенциал для использования в качестве моделей при изучении процессов старения и канцерогенеза. Однако *M. lignano* имеет преимущество при исследовании процессов регенерации по сравнению с *C. elegans* из-за наличия стволовых клеток необластов. Планарии и *Hofstenia*, в свою очередь, могут служить отличными модельными организмами для изучения регенерации и эмбрионального развития.

Работа поддержана Российским научным фондом (№ 20-14-00147) и государственным бюджетным проектом (№ FWNR-2022-0016).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Murthy M., Ram J.L. (2015) Invertebrates as model organisms for research on aging biology. *Invertebr. Reprod. Dev.* **59**, 1–4. <https://doi.org/10.1080/07924259.2014.970002>
2. Wudarski J., Simanov D., Ustyantsev K., De Mulder K., Grelling M., Grudniewska M., Beltman F., Glazenburg L., Demircan T., Wunderer J., Qi W., Vizoso D.B., Weissert P.M., Olivieri D., Mouton S., Guryev V., Aboobaker A., Schärer L., Ladurner P., Berezikov E. (2017) Efficient transgenesis and annotated genome sequence of the regenerative flatworm model *Macrostomum lignano*. *Nat. Commun.* **8**(1), 2120. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02214-8>
3. Zabelina V., Vrhotova M., Yonemura N., Sezutsu H., Tamura T., Klymenko V., Sehna F., Zurovec M., Sehadova H., Sauman I. (2022) The exact timing of microinjection of parthenogenetic silkworm embryos is crucial for their successful transgenesis. *Front. Physiol.* **13**, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fphys.2022.822900>
4. Zayas R.M., Hernández A., Habermann B., Wang Y., Sary J.M., Newmark P.A. (2005) The planarian *Schmidtea mediterranea* as a model for epigenetic germ cell specification: analysis of ESTs from the hermaphroditic strain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 18491–18496. <https://doi.org/10.1073/pnas.0509507102>
5. Zhang S., Li F., Zhou T., Wang G., Li Z. (2020) *Caenorhabditis elegans* as a useful model for studying aging mutations. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **11**, 1–9. <https://doi.org/10.3389/fendo.2020.554994>
6. Bely A.E., Sikes J.M. (2010) Acoel and platyhelminth models for stem-cell research. *J. Biol.* **9**(2), 14. <https://doi.org/10.1186/jbiol223>
7. González-Estévez C., Momose T., Gehring W.J., Saló E. (2003) Transgenic planarian lines obtained by electroporation using transposon-derived vectors and an eye-spe-

- cific GFP marker. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **100**, 14046–14051.
<https://doi.org/10.1073/pnas.2335980100>
8. Hall R.N., Weill U., Khariton M., Leal-Ortiz S., Drees L., Chai C., Xue Y., Rosental B., Quake S.R., Sánchez A., Melosh N.A., Fire A., Rink J.C., Wang B. (2021) Heterologous reporter expression in the planarian *Schmidtea mediterranea* through somatic mRNA transfection. *bioRxiv*.
<https://doi.org/10.1101/2021.04.20.440701>
 9. Sasakura Y., Oogai Y., Matsuoka T., Satoh N., Awazu S. (2007) Transposon mediated transgenesis in a marine invertebrate chordate: *Ciona intestinalis*. *Genome Biol.* **8**(Suppl. 1), S3.
<https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-s1-s3>
 10. Sosa M.A.G., De Gasperi R., Elder G.A. (2010) Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct. Funct.* **214**, 91–109.
<https://doi.org/10.1007/s00429-009-0230-8>
 11. Costantini F. (2013) Transgenic animals. In: *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd ed., vol. 7. Elsevier Inc., pp. 117–123.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374984-0.01560-6>
 12. Ricci L., Srivastava M. (2021) Transgenesis in the acoel worm *Hofstenia miamia*. *Dev. Cell.* **56**, 3160–3170.e4.
<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2021.10.012>
 13. Adli M. (2018) The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat. Commun.* **9**(1), 1911
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-04252-2>
 14. Drinkwater E., Robinson E.J.H., Hart A.G. (2019) Keeping invertebrate research ethical in a landscape of shifting public opinion. *Methods Ecol. Evol.* **10**, 1265–1273.
<https://doi.org/10.1111/2041-210X.13208>
 15. Link C.D. (2001) Transgenic invertebrate models of age-associated neurodegenerative diseases. *Mech. Ageing Dev.* **122**, 1639–1649.
[https://doi.org/10.1016/S0047-6374\(01\)00291-3](https://doi.org/10.1016/S0047-6374(01)00291-3)
 16. Mello C.C., Kramer J.M., Stinchcomb D., Ambros V. (1991) Efficient gene transfer in *C. elegans*: extrachromosomal maintenance and integration of transforming sequences. *EMBO J.* **10**, 3959–3970.
<https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1991.tb04966.x>
 17. Nance J., Frøkjær-Jensen C. (2019) The *Caenorhabditis elegans* transgenic toolbox. *Genetics.* **212**(4), 959–990.
<https://doi.org/10.1534/genetics.119.301506>
 18. Dickinson D.J., Goldstein B. (2016) CRISPR-based methods for *Caenorhabditis elegans* genome engineering. *Genetics.* **202**, 885–901.
<https://doi.org/10.1534/genetics.115.182162>
 19. Hertweck M., Hoppe T., Baumeister R. (2003) *C. elegans*, a model for aging with high-throughput capacity. *Exp. Gerontol.* **38**, 345–346.
[https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00208-5](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00208-5)
 20. Matsunami K. (2018) Frailty and *Caenorhabditis elegans* as a benchtop animal model for screening drugs including natural herbs. *Front. Nutr.* **5**, 3–8.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00111>
 21. David D.C., Ollikainen N., Trinidad J.C., Cary M.P., Burlingame A.L., Kenyon C. (2010) Widespread protein aggregation as an inherent part of aging in *C. elegans*. *PLoS Biol.* **8**, 47–48.
<https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000450>
 22. Machino K., Link C.D., Wang S., Murakami H., Murakami S. (2014) A semi-automated motion-tracking analysis of locomotion speed in the *C. elegans* transgenics overexpressing beta-amyloid in neurons. **5**, 202.
<https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00202>
 23. Sonowal R., Swimm A., Sahoo A., Luo L., Matsunaga Y., Wu Z., Bhingarde J.A. (2017) Indoles from commensal bacteria extend healthspan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **114**, 7506–7515.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1706464114>
 24. Sánchez Alvarado A. (2007) Stem cells and the planarian *Schmidtea mediterranea*. *C. R. Biol.* **330**, 498–503.
<https://doi.org/10.1016/j.crvi.2007.05.005>
 25. Hooge M., Wallberg A., Todt C., Maloy A., Jondelius U., Tyler S. (2007) A revision of the systematics of panther worms (*Hofstenia* spp., Acoela), with notes on color variation and genetic variation within the genus. *Hydrobiologia.* **592**, 439–454.
<https://doi.org/10.1007/s10750-007-0789-0>
 26. Kimura J.O., Ricci L., Srivastava M. (2021) Embryonic development in the acoel *Hofstenia miamia*. *Dev.* **148**(13), dev188656.
<https://doi.org/10.1242/DEV.188656>
 27. Scimone M.L., Kravarik K.M., Lapan S.W., Reddien P.W. (2014) Neoblast specialization in regeneration of the planarian *Schmidtea mediterranea*. *Stem. Cell Rep.* **3**, 339–352.
<https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.06.001>
 28. Sankaranarayanan G., Coghlan A., Driguez P., Lotkowska M.E., Sanders M., Holroyd N., Tracey A., Berrihan M., Rinaldi G. (2021) Large CRISPR-Cas-induced deletions in the oxamniquine resistance locus of the human parasite *Schistosoma mansoni*. *Wellcome Open Res.* **5**, 178.
<https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.16031.2>
 29. Newmark P.A., Alvarado A.S. (2002) Not your father's planarian: a classic model enters the era of functional genomics. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 210–219.
<https://doi.org/10.1038/nrg759>
 30. Arnold C.P., Benham-Pyle B.W., Lange J.J., Wood C.J., Sánchez Alvarado A. (2019) Wnt and TGFβ coordinate growth and patterning to regulate size-dependent behaviour. *Nature.* **572**, 655–659.
<https://doi.org/10.1038/s41586-019-1478-7>
 31. Davies E.L., Lei K., Seidel C.W., Kroesen A.E., McKinney S.A., Guo L., Robb S.M.C., Ross E.J., Gotting K., Alvarado A.S. (2017) Embryonic origin of adult stem cells required for tissue homeostasis and regeneration. *Elife.* **6**, e21052.
<https://doi.org/10.7554/eLife.21052>
 32. England C., Emily E., Weibo C. (2016) NanoLuc: a small luciferase is brightening up the field of bioluminescence. *Physiol. Behav.* **27**, 1175–1187.
<https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00112>. NanoLuc
 33. Vara D.C., Leal-Zanchet A.M., Lizardo-Daudt H.M. (2008) Embryonic development of *Girardia tigrina* (Girard, 1850) (Platyhelminthes, Tricladida, Paludicola). *Brazilian J. Biol.* **68**, 889–895.
<https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000400027>

34. Grudniewska M., Mouton S., Simanov D., et al. (2016) Transcriptional signatures of somatic neoblasts and germline cells in *Macrostomum lignano*. *Elife*. **5**, e20607. <https://doi.org/10.7554/eLife.20607>
35. De Mulder K., Kuaes G., Pfister D., Egger B., Seppi T., Eichberger P., Borgonie G., Ladurner P. (2010) Potential of *Macrostomum lignano* to recover from γ -ray irradiation. *Cell Tissue Res*. **339**, 527–542. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0915-6>
36. Wudarski J., Ustyantsev K., Reinoite F., Berezikov E. (2022) Random integration transgenesis in a free-living regenerative flatworm *Macrostomum lignano*. In: *Whole-Body Regeneration: Methods and Protocols*. Eds. Blanchoud S., Galliot B. New York: Springer US, pp. 493–508.
37. Ustyantsev K., Wudarski J., Sukhikh I., Reinoite F., Mouton S., Berezikov E. (2021) Proof of principle for piggyBac-mediated transgenesis in the flatworm *Macrostomum lignano*. *Genetics*. **218**(3), iyab076. <https://doi.org/10.1093/GENETICS/IYAB076>
38. Wudarski J., Egger B., Ramm S.A., Schärer L., Ladurner P., Zadesenets K.S., Rubtsov N.B., Mouton S., Berezikov E. (2020) The free-living flatworm *Macrostomum lignano*. *Evodevo*. **11**, 5. <https://doi.org/10.1186/s13227-020-00150-1>
39. Mouton S., Wudarski J., Grudniewska M., Berezikov E. (2018) The regenerative flatworm *Macrostomum lignano*, a model organism with high experimental potential. *Int. J. Dev. Biol.* **62**, 551–558. <https://doi.org/10.1387/ijdb.180077eb>
40. Zadesenets K.S., Ershov N.I., Berezikov E., Rubtsov N.B. (2017) Chromosome evolution in the free-living flatworms: first evidence of intrachromosomal rearrangements in karyotype evolution of *Macrostomum lignano* (Platyhelminthes, Macrostomida). *Genes* (Basel). **8**(11), 298. <https://doi.org/10.3390/genes8110298>
41. Zadesenets K.S., Vizoso D.B., Schlatter A., Konopatskaia I.D., Berezikov E., Schärer L., Rubtsov N.B. (2016) Evidence for karyotype polymorphism in the free-living flatworm, *Macrostomum lignano*, a model organism for evolutionary and developmental biology. *PLoS One*. **11**(10), e0164915. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164915>

Transgenesis in Worms: Candidates for an Ideal Model

I. S. Sukhikh¹, *, M. Y. Biryukov¹, and A. G. Blinov¹, **

¹*Institute of Cytology and Genetics, Siberian Branch, Russian Academy of Sciences, Novosibirsk, 630090 Russia*

**e-mail: igor3419@gmail.com*

***e-mail: blinov@bionet.nsc.ru*

Transgenesis is an important and often irreplaceable method for studying of multiple processes of animal life. In order to create animal transgenic lines a fitting model organism, which would have necessary traits for effective and affordable transgenesis, is needed. This concise review is about characterization of existing model organisms of different taxa for which an effective method for transgenesis have been shown. Special attention is paid to flatworms, *Macrostomum lignano* in particular, as a promising model organism for studying aging, regeneration and cancerogenesis.

Keywords: flatworms, *Macrostomum lignano*, transgenesis, model organisms, transposons