

УДК 577

## ПРОБЛЕМЫ ТЕХНОЛОГИЙ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ И ТРАНСГЕНЕЗА

© 2021 г. А. П. Большаков\*

*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук, Москва, Россия*

Поступила в редакцию 20.05.2021 г.

После доработки 23.05.2021 г.

Принята к публикации 24.05.2021 г.

В работе коротко суммированы проблемы, возникающие при работе с системами трансгеноза на основе рекомбиназ, а также CRISPR/Cas9. Освещены ряд недавних результатов, касающихся возможных эффектов, индуцируемых тамоксифеном и доксициклином — агентами, которые широко используются для регуляции экспрессии генов в трансгенных животных с индуцибельной экспрессией генов. Согласно этим данным, всегда существует вероятность эктопической тамоксифен-независимой экспрессии трансгена и в настоящее время не всегда можно предсказать, где она будет наблюдаться и насколько это может повлиять на финальную картину экспрессии генов. Схожая картина наблюдается с использованием доксициклин-зависимых систем, когда “неспецифические” эффекты доксициклина просто игнорируются. В работе поднимается вопрос о необходимости проведения контрольных экспериментов, учитывающих развитие возможных сторонних эффектов, связанных как с использованием модуляторов экспрессии генов, так и самих систем, изменяющих геном, либо разработке альтернативных подходов.

*Ключевые слова:* рекомбиназа, CRISPR/Cas9, тамоксифен, доксициклин

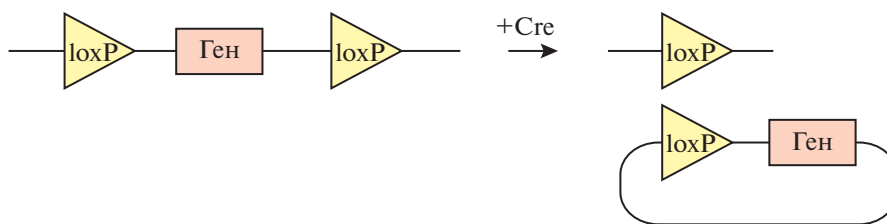
**DOI:** 10.31857/S1027813321040038

Технологии редактирования генома (ТРГ) получили активное развитие в последние десятилетия благодаря применению CRISPR/Cas9 системы для редактирования генома. Важность внедрения данной системы была подчеркнута вручением Дж. Дудна и Э. Шарпантье Нобелевской премии по химии в 2020 году. Однако, несмотря на безусловную значимость созданной технологии, геномное редактирование с самого начала вызывало серьезные вопросы, как у исследователей и разработчиков технологий, так и у обывателей. Одной из сложнейших разрешимых проблем, касающихся ТРГ, остается проблема, связанная с отсутствием нашего четкого понимания последствий применения ТРГ, а также того, в каких случаях необходимо использование ТРГ при работе с животными и, особенно, человеком. Эта проблема порождает еще одну — тесно связанную с ней — отсутствие четкой методологической базы, обосновывающей то, как, с какой целью и с использованием каких контролей должно проводиться исследование, в котором применяются ТРГ.

Создание нокаутной мыши в 1990 году [1, 2] породило бум использования трансгенных животных (преимущественно мышей) в исследова-

тельских целях, и сейчас практически невозможно встретить научные работы по физиологии и биохимии в высокорейтинговых журналах без использования трансгенных животных. Изначально идея нокаута гена предполагала, что удаление гена целиком или его части или его замена на другой ген (например, ген резистентности к эукариотическому антибиотику) поможет понять функцию, выполняемую нокаутируемым геном. Однако дальнейшие исследования показали, что подобный подход дает результаты, которые не всегда можно легко интерпретировать. Во-первых, нокаут гена может оказаться летальным уже на стадии эмбриогенеза. Во-вторых, один и тот же ген может быть вовлечен во множество процессов в разных клеточных субпопуляциях, и не всегда очевидно, нокаут в какой из субпопуляций оказал наиболее существенный физиологический эффект. В этом случае оказывается важной именно “прицельность” нокаута, когда нокаут производится именно в целевой субпопуляции клеток в желаемом органе, а не во всем геноме животного в целом. В-третьих, замена гена или удаление гена может иметь свои плохо предсказуемые последствия, поскольку это будет изменять укладку хроматина в районе целевого гена и, как следствие, изменять регуляцию соседних генов [3]. В-четвертых, удаленный ген мог экспрессироваться

\* Адресат для корреспонденции: 117485 Россия, Москва, ул. Бутлерова 5а, e-mail: ocrachek@yahoo.com.



**Рис. 1.** Схема функционирования Cre рекомбиназы при удалении фрагмента генома. Фрагмент гена фланкирован loxP последовательностями. Экспрессия Cre рекомбиназы под специфическим промотором в целевой клеточной субпопуляции приводит к рекомбинации и удалению из генома последовательности, фланкированной loxP сайтами.

в различных клеточных субпопуляциях на разных стадиях онтогенеза, что также может порождать неопределенность в интерпретации получаемых данных.

Все или, по крайней мере, большинство этих проблем “удалось преодолеть” с использованием условного нокаута (conditional knockout), когда происходит изменение целевого участка ДНК животного только в целевой субпопуляции клеток в желаемый промежуток времени. Однако создание условного нокаута, как таковое, в большинстве случаев является результатом скрещивания трансгенных животных, несущих некоторые целевые мутации (рекомбиназы под целевым промотором или сайты рекомбинации) или введения вирусов, несущих рекомбиназу, трансгенным животным, имеющим сайты рекомбинации в целевых местах генома (рис. 1). Независимо от подхода, для того чтобы предотвратить преждевременную и неселективную экспрессию рекомбиназы, эта экспрессия делается зависимой от дополнительных веществ. Зачастую создание условного нокаута основано на использовании трансгенных животных, у которых в геном вставлен ген рекомбиназы (из бактериофагов или дрожжей). Экспрессия этого гена регулируется либо антибиотиком доксициклином (за счет наличия сайта посадки тетрациклинового активатора либо репрессора в промоторе рекомбиназы), либо тамоксифеном (модулятор эстрогеновых рецепторов, связывающийся с мутантным эстрогеновым рецептором), в отсутствие которого рекомбиназа не может попасть ядро клетки и запустить рекомбинацию. Важно отметить, что использование систем на основе рекомбиназ позволяет выполнять не только нокаут генов, но и нок-ин за счет двойного фланкирования целевой последовательности гена разными loxP последовательностями.

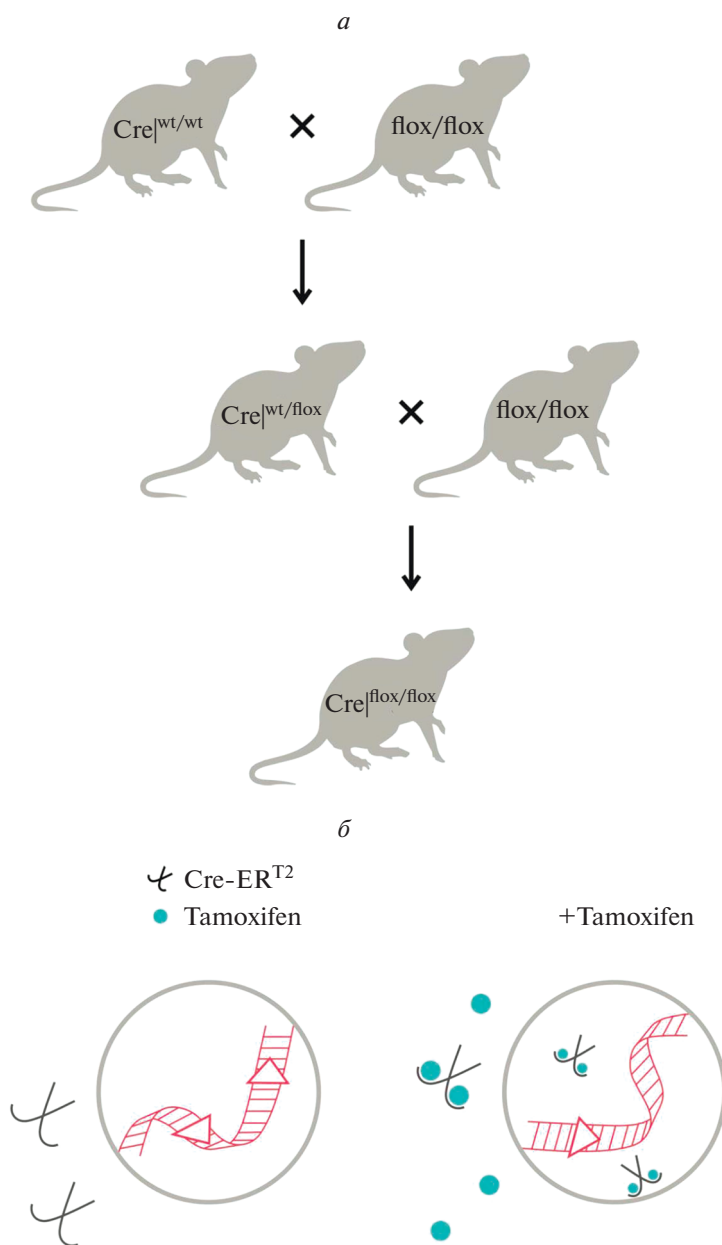
### ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМ НА ОСНОВЕ РЕКОМБИНАЗ

Несмотря на возможность использования животных с условным трансгенезом, большой популярностью также пользуются животные, у которых экспрессия/локализация рекомбиназы не регу-

лируется дополнительными агентами. Широко используются животные селективно экспрессирующие Cre или Flp рекомбиназы в некоторых субпопуляциях клеток либо за счет экспрессии рекомбиназы под соответствующим промотором либо за счет добавления в маркерный ген клеточной субпопуляции последовательности несущей IRES (internal ribosome entry site) и ген рекомбиназы (см. детали [4]). Известно, что для получения целевого нокаута необходимо провести последовательное скрещивание животных, несущих рекомбиназу (например, Cre|wt/wt), с животными, у которых целевой ген на обоих гомологичных хромосомах фланкирован loxP сайтами<sup>1</sup> (flox/flox). В результате первого скрещивания будет получен частичный нокаут (Cre|wt/flox), который после скрещивания с flox/flox животными даст потомство, у которого произойдет желаемый нокаут целевого фрагмента генома в обеих хромосомах (Cre|flox/flox) (рис. 2a). Коротко отметим здесь, что в ряде случаев рекомбинация может произойти у Cre|wt/flox животных в гаметях, несмотря на наличие специфического промотора [4], и, в результате, нокауту гена на одной хромосоме не только в целевых клетках, но во всех клетках организма. Как видно из описанной схемы, получение нокаута вовлекает использование ряда трансгенных животных, что усложняет не только получение трансгенных животных с нокаутом в целевых клетках, но и интерпретацию полученных на этих животных данных.

Важно отметить, что внесение рекомбиназы в геном не всегда столь безобидно, как может показаться на первый взгляд. Для ряда линий, несущих Cre показано, что фенотип таких животных может существенно меняться, приводя к изменениям в гормональном фоне, способности к обучению и т.д. [5–8]. Несмотря на это, в некоторых исследованиях такие линии продолжают использоваться, при этом в ряде случаев в качестве контроля берут не животных, несущих ген рекомбиназы без удаления целевого гена, но животных, несущих фланкированную loxP сайтами последовательность, хотя необходимость подобного кон-

<sup>1</sup> В случае Flp рекомбиназы должны присутствовать frt сайты.



**Рис. 2.** Получение нокаутов в животных, экспрессирующих Cre-рекомбиназу. (а) Получение нокаута целевого гена, фланкированного loxP сайтами (flox/flox) предполагает последовательное скрещивание трансгенных животных, несущих Cre рекомбиназу под промотором целевой клеточной субпопуляции и целевой ген дикого типа на обеих хромосомах (wt/wt) и животных, не экспрессирующих Cre рекомбиназу, но целевой ген (или его фрагмент) в которых фланкирован loxP сайтами. Часть их потомства будет иметь генотип Cre|wt/flox, который при последующем скрещивании с flox/flox животными даст желаемый генотип Cre|flox/flox с нокаутом в целевой клеточной субпопуляции. (б) Тамоксифен-зависимая система рекомбинации (Cre-ER<sup>T2</sup>) включает в себя экспрессионную кассету с Cre-рекомбиназой под промотором, активным в целевой клеточной субпопуляции, фланкированной мутантным эстрогеновым рецептором, чувствительным к тамоксифену. В отсутствие тамоксифена Cre рекомбиназа не может попасть в ядро (слева); при добавлении тамоксифена происходит связывание этого лиганда с эстрогеновыми рецепторами, связанными с рекомбиназой, после чего Cre может проникнуть в ядро и индуцировать нокаут целевой последовательности в геноме.

троля всегда подчеркивалась [9]. Получаемые результаты говорят о том, что фактически в настоящий момент мы не можем предсказать последствий внесения изменений в геном, даже когда вносятся, казалось бы, хорошо описанные генетические

инструменты, такие как рекомбиназы или loxP сайты, и необходимы дополнительные контроли для экспериментов, проводимых с их использованием. В настоящий момент, к сожалению, до конца не ясно, какие животные из указанного выше набора

(Cre|wt/wt, Cre|wt/flox, flox/flox, wt/wt) должны выступать в качестве контрольных для нокаута Cre|flox/flox, однако, во избежание ошибочной интерпретации результатов исследование должно включать всех указанных трансгенных животных.

### ПРОБЛЕМЫ С ТАМОКСИФЕН-ЗАВИСИМОЙ “ЦЕЛЕВОЙ” ЭКСПРЕССИЕЙ CRE-РЕКОМБИНАЗЫ

Внедрение новых подходов породило ряд новых проблем, которые начали проявляться только в последнее время за счет использования новых технологий. Изначально предполагалось, что использование тамоксифен-зависимой системы позволяет запускать экспрессию рекомбиназы тогда, когда это необходимо и, казалось бы, должно предотвратить эктопическую экспрессию, а короткое применение тамоксифена не будет иметь последствий, кроме активации экспрессии рекомбиназы (рис. 2б). Оказалось, что, несмотря на первичные данные об отсутствии значимого влияния тамоксифена [10, 11], его использование также оказывает дополнительные эффекты и необходимо их учитывать при интерпретации результатов, полученных на трансгенных животных [12]. Проблема также оказалась в том, что у мышей различных линий скорость метаболизма и выведения тамоксифена разная и зависит от возраста [13], что может влиять на эффективность тамоксифен-зависимой рекомбинации у мышей с разным генотипом, а также влиять на длительность побочных эффектов самого тамоксифена. Было показано, что тамоксифен может вызывать изменения в поведении мышей в разных поведенческих тестах [14]. Одним из возможных механизмов, лежащих в основе эффекта тамоксифена, могут быть изменения в Wnt-Dmtra2 сигнальном пути и, как следствие ослабление пролиферации нейрональных стволовых клеток и нейрогенеза в зубчатой фасции гиппокампа и субвентрикулярной зоне [15]. Проблема также заключается в том, что тамоксифен не обладает универсальным эффектом во всех тканях в том смысле, что во всех клетках он связывается с альфа и бета эстрогеновыми рецепторами и способен вытеснять естественные эстрогены, однако, в зависимости от типа клеток, он может, как активировать, так и ингибировать эстрогеновые рецепторы и, соответственно, либо активировать, либо подавлять экспрессию генов, если она регулируется эстрогеновыми рецепторами. Оба типа эстрогеновых рецепторов экспрессируются в клетках мозга [16, 17], однако, какие эффекты, связанные с модуляцией экспрессии генов, тамоксифен вызывает в разных типах клеток мозга остается по большому счету неизвестным. В то же время было показано, что тамоксифен способен модулировать глицинергическую передачу [18], увеличивать число

шипииков на пирамидных нейронах поля СА1 гиппокампа [19] и индуцировать переключение некоторых субпопуляций клеток мозга, включая нейроны зубчатой фасции гиппокампа, в стрессовое состояние [20].

Дополнительная проблема тамоксифен-зависимых Cre-систем была обнаружена сравнительно недавно и заключается она в том, что все линии мышей, несущих Cre рекомбиназу, фланкированную мутантным тамоксифен-активируемым эстрогеновым рецептором, экспрессируют Cre рекомбиназу на низком уровне не только в целевых клеточных субпопуляциях, что может приводить к эктопической рекомбинации [21–23]. В результате рекомбинация может происходить в нежелательной клеточной субпопуляции не только при добавлении тамоксифена, но и вообще тамоксифен-независимым образом. В условиях, когда уровень активности Cre рекомбиназы низок, большую роль начинает играть расстояние между LoxP сайтами (чем больше расстояние, тем меньше вероятность рекомбинации) и, возможно, состояние хроматина и геномный контекст, в котором расположена целевая последовательность для рекомбиназы, содержащая LoxP сайты [9]. В настоящее время абсолютно невозможно предсказать, у мышей каких линий и в каких условиях возможна эктопическая рекомбинация. Последнее говорит о том, что эктопическая рекомбинация может происходить абсолютно неконтролируемо в нежелательных клеточных субпопуляциях и вносить свой вклад в результаты, полученные с помощью “целевого” удаления некоторого гена. Казалось бы, достаточно иметь в качестве контроля мышей, которым не вводили тамоксифен, чтобы гарантировать отсутствие ошибки в интерпретации данных, полученных при введении тамоксифена. Однако именно в этом случае непредсказуемость эктопической рекомбинации может привести к неверной интерпретации результатов, когда эктопическая рекомбинация и целевая рекомбинация по-отдельности могут не индуцировать обнаруженного эффекта, а комбинация этих событий, возникающая в мозге животных после инъекции тамоксифена, может вызывать этот эффект. В этом случае упомянутый тамоксифен-независимый “контроль”, оказывается фактически не контролем, а дополнительным типом животных с измененным геномом в некотором типе клеток, и именно наличие этого специфического фона может обеспечивать возникновение физиологического эффекта “целевого” нокаута гена.

В заключении этой части хотелось бы отметить, что проблема использования систем на основе рекомбиназ и тамоксифена заключается не только в том, что исследователи используют эти системы регуляции экспрессии тех или иных генов, а в том, что зачастую в исследованиях мозга и поведения с использованием тамоксифен-зави-

симых систем не делается всех необходимых контрольных экспериментов по выявлению влияния тамоксифена на те параметры, которые изучаются, а также выявления того, в каких клеточных субпопуляциях реально происходят события рекомбинации.

Одним из возможных подходов, который может позволить избежать проблем, связанных с эктопической активностью рекомбиназы, а также упомянутой в предыдущем разделе проблемы, вышеупомянутой проблемы, касающейся последствий добавления гена рекомбиназы в геном, является подход, при котором животным с фланкированной loxP сайтами целевой последовательностью делают стереотаксическую инъекцию рекомбинантных вирусов (лентивирусов или аденоассоциированных), несущих ген рекомбиназы под промотором, характерным для целевой клеточной субпопуляции. Это позволяет избежать ряда вышеописанных неспецифических эффектов, однако, у этого подхода также есть ряд проблем: (1) не для всех клеточных субпопуляций мозга известны достаточно селективные промоторы, хотя их поиск продолжается; и (2) вирусы заражают не все типы клеток с одинаковой эффективностью (например, заражение микроглии до сих пор остается проблемой [24]).

#### ПРОБЛЕМЫ ТЕТРАЦИКЛИН-ЗАВИСИМЫХ СИСТЕМ

Схожая с тамоксифеном ситуация наблюдается при использовании доксициклина как регулятора тетрациклин-зависимой системы экспрессии генов. В зависимости от того, Tet-on или Tet-off система используется, а также в зависимости от дизайна эксперимента, животные могут получать доксициклин в течение периодов от нескольких дней до нескольких месяцев. Важно отметить, что доксициклин относится к ряду тетрациклиновых антибиотиков, основным механизмом действия которых является ингибирование синтеза белка бактерий за счет нарушения процессинга рибосомальной РНК и накопления в клетках недопроцессированной рРНК [25]. Проблема заключается не только в том, что длительное применение доксициклина будет приводить к сильным изменениям микрофлоры у животных и изменениям функционирования оси “микробиота—кишечник—мозг”, но и в том, что доксициклин может влиять на сборку митохондриальных рибосом и нарушать трансляцию РНК генов, кодируемых митохондриальным геномом [12]. Последнее, в свою очередь, будет сдвигать функционирование клеточной биоэнергетики по всему организму и оказывать влияние не только на те тетрациклин-зависимые системы, которые внесены при генной инженерии, но и буквально на все клетки организма. Однако, несмотря на наличие столь серьезных

дополнительных эффектов, доксициклин продолжает активно использоваться для активации/подавления экспрессии генов и выявления эффектов включения/выключения генов на биохимические и поведенческие показатели без проведения контрольных экспериментов по выявлению возможных эффектов доксициклина. Важно также отметить, что тетрациклин-зависимая система является одной из множества бактериальных систем регуляции транскрипции генов, в которых связывание транскрипционного фактора (репрессора или активатора) с некоторым агентом (тетрациклин, кумат, и т.п.) приводит либо к активации транскрипции целевого гена либо ее репрессии [26]. Поэтому наиболее вероятным решением проблемы, связанной с эффектами доксициклина, может быть создание систем, в которых регуляция транскрипции зависит от других агентов, проникаемых через ГЭБ и не обладающих столь широким спектром действия. Более того, разработка таких инструментов может дать дополнительный толчок к развитию более сложных инструментов для регуляции экспрессии генов, когда за счет внедрения в геном одного животного различных транскрипционных регуляторов можно будет активировать или подавлять экспрессию нескольких генов, вводя комбинации соответствующих агентов. Необходимо отметить, что вместо систем, взятых из бактерий, можно также использовать системы регуляции транскрипции из растений, которые регулируются химическими агентами, либо системы из грибов, активируемые светом [26]. Однако данные системы в настоящее время пока находятся в стадии разработки и пока неясно, насколько их можно будет применять для исследований функций ЦНС.

#### ПРОБЛЕМЫ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ CRISPR/Cas

Одной из систем редактирования генома, приобретшей большую популярность сегодня, является CRISPR/Cas9, которая может быть использована как для удаления фрагментов генома, так и для внесения мутаций. Однако ее использование в исследованиях ЦНС весьма ограничено в связи с тем, что разрывы и делеции, вносимые системой Cas9 плохо регулируются, что приводит к возникновению мозаицизма в клетках, где произошло редактирование генома, и формированию гетерогенной популяции клеток, имеющих по-разному измененный геном [27, 28]. В настоящее время тяжело предсказать, насколько возникновение мозаицизма существенно для последующего анализа эффектов, индуцированных редактированием генома. Кроме того, остается проблема нецелевых мутаций, вносимых CRISPR/Cas9 системой, что может быть актуально в условиях, когда экспрессия Cas9 происходит на протяжении

длительного срока после инъекции вирусов, кодирующих Cas9 и гидовые РНК, в мозг. Однако возможным решением последней проблемы может являться фланкирование промотора Cas9 последовательностью гидовой РНК целевого гена [29]; в этом случае синтез Cas9 будет приводить к инактивации целевого гена, а также вырезанию промотора у Cas9 и прекращению экспрессии фермента.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Внедрение технологий геномного редактирования в исследовательский процесс привело к появлению различных инструментов, с помощью которых оказывается возможным выявлять тонкую структуру молекулярных процессов, протекающих в клетках. Особенно актуальными эти технологии оказались для исследований центральной нервной системы, состоящей из гигантского числа различных клеточных субпопуляций. Однако использование сложных инструментов без должного понимания того, к каким последствиям приводит их использование, ведет к неверным интерпретациям получаемых результатов, и, как следствие, к искажению получаемой на основе этих результатов картины мира. Улучшение нашего понимания того, как работают ТРГ неминуемо приводит к необходимости проведения все большего числа контрольных экспериментов, что усложняет сам эксперимент и увеличивает его стоимость. В текущей ситуации, когда высокорейтинговые журналы фактически требуют набора определенного числа методов в статье (что, как следствие, приводит к увеличению стоимости всей научной работы и времени ее выполнения) применение ТРГ в этих работах становится нормой, но одновременно приводит к отсутствию грамотного рецензирования частей этих работ, связанных с ТРГ. С научной точки зрения, последнее фактически может обесценивать ту часть сложной и дорогостоящей работы с использованием ТРГ, которая выполнена без должных контрольных экспериментов. Безусловно, не имеет смысла отвергать использование ТРГ в биологических исследованиях, но остается важным тщательно продумывать и проводить все необходимые контрольные эксперименты, несмотря на удорожание исследовательской работы и кажущуюся бесполезность этих экспериментов. Важно также отметить, что разрабатываемые в настоящий момент альтернативные подходы, включающие не только вышеупомянутые, но и такие, как использование аптамеров, могут помочь обойти описанные в этой работе проблемы и углубить наше понимание молекулярных основ функции ЦНС.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Автор благодарен М.М. Михайловой за критические замечания, сделанные при подготовке работы, и Ю.С. Спивак за помощь с оформлением рисунков.

## ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства образования и науки Российской Федерации на 2021–2023 годы.

## СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ НОРМ

*Конфликт интересов.* Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Koller B.H., Marrack P., Kappler J.W., Smithies O. // *J. Immunol. Science.* 2010. V. 184. № 9. P. 1227–1230.
2. Zijlstra M., Bix M., Simister N.E., Loring J.M., Raulet D.H., Jaenisch R. // *Nature.* 1990. V. 344. № 6268. P. 742–746
3. Horn P.J., Peterson C.L. // *Science.* 2002. V. 297. № 5588. P. 1824–1827.
4. Song A.J., Palmiter R.D. // *Trends in Genetics.* 2018. V. 34. № 5. P. 333–340
5. Declercq J., Brouwers B., Pruniau V.P.E.G., Stijnen P., De Faudeur G., Tuand K., Meulemans S., Serneels L., Schraenen A., Schuit F., Creemers J.W.M. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. P. e0135502.
6. Giusti S.A., Vercelli C.A., Vogl A.M., Kolarz A.W., Pino N.S., Deussing J.M., Refojo D. // *J. Psychiatr. Res.* 2014. V. 55. № 1. P. 87–95.
7. Harno E., Cottrell E.C., White A. // *Cell Metabolism.* 2013. V. 18. № 1. P. 21–28.
8. Chen E., Lallai V., Sherafat Y., Grimes N.P., Pushkin A.N., Fowler J.P., Fowler C.D. // *J. Neurosci.* 2018. V. 38. № 9. P. 2177–2188.
9. Becher B., Waisman A., Lu L.F. // *Immunity.* 2018. V. 48. № 5. P. 835–836.
10. Vogt M.A., Chourbaji S., Brandwein C., Dormann C., Sprengel R., Gass P. // *Exp. Neurol.* 2008. V. 211. № 1. P. 25–33.
11. Rotheneichner P., Romanelli P., Bieler L., Pagitsch S., Zaubmair P., Kreutzer C., König R., Marschallinger J., Aigner L., Couillard-Després S. // *Front. Neurosci.* 2017. V. 11.
12. Wüst R.C.I., Houtkooper R.H., Auwerx J. // *J. Cell Biol.* 2020. V. 219. № 7.
13. Valny M., Honsa P., Kirdajova D., Kamenik Z., Anderova M. // *Front. Cell. Neurosci.* 2016. V. 10.
14. Li X., Du Z.J., Chen M.Q., Chen J.J., Liang Z.M., Ding X.T., Zhou M., Li S.J., Li X.W., Yang J.M., Gao T.M. // *Genes, Brain Behav.* 2020. V. 19. № 4.
15. Lee C.M., Zhou L., Liu J., Shi J., Geng Y., Liu M., Wang J., Su X., Barad N., Wang J., Sun Y.E., Lin Q. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2020. V. 117. № 32. P. 19578–19589.

16. Tasic B., Yao Z., Graybuck L.T., Smith K.A., Nguyen T.N., Bertagnonli D., Goldy J., Garren E., Economo M.N., Viswanathan S., Penn O., Bakken T., Menon V., Miller J., Fong O., Hirokawa K.E., Lathia K., Rimorin C., Tieu M., Larsen R., Casper T., Barkan E., Kroll M., Parry S., Shapovalova N.V., Hirschstein D., Pendergraft J., Sullivan H.A., Kim T.K., Szafer A., Dee N., Groblewski P., Wickersham I., Cetin A., Harris J.A., Levi B.P., Sunkin S.M., Madisen L., Daigle T.L., Looger L., Bernard A., Phillips J., Lein E., Hawrylycz M., Svoboda K., Jones A.R., Koch C., Zeng H. // *Nature*. 2018. V. 563. № 7729. P. 72–78.
17. Zeisel A., Hochgerner H., Lönnerberg P., Johnsson A., Memic F., van der Zwan J., Häring M., Braun E., Borm L.E., La Manno G., Codeluppi S., Furlan A., Lee K., Skene N., Harris K.D., Hjerling-Leffler J., Arenas E., Ernfors P., Marklund U., Linnarsson S. // *Cell*. 2018. V. 174. № 4. P. 999–1014. e22.
18. Chesnoy-Marchais D. // *Endocrinology*. 2005. V. 146. № 10. P. 4302–4311.
19. González-Burgos I., Rivera-Cervantes M.C., Velázquez-Zamora D.A., Fera-Velasco A., Garcia-Segura L.M. // *Neural Plast.* 2012. V. 2012.
20. Denk F., Ramer L.M., Erskine E.L.K.S., Nassar M.A., Bogdanov Y., Signore M., Wood J.N., McMahon S.B., Ramer M.S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2015. V. 3. P. 74.
21. Álvarez-Aznar A., Martínez-Corral I., Daubel N., Betsholtz C., Mäkinen T. and Gaengel K. // *Transgenic Res.* 2020. V. 29. № 1. P. 53–68.
22. Van Hove H., Antunes A.R.P., De Vlaminck K., Scheyltjens I., Van Ginderachter J.A., Movahedi K. // *European J. Immunology*. 2020. V. 50. № 3. P. 459–463.
23. Chappell-Maor L., Kolesnikov M., Kim J.S., Shemer A., Haimon Z., Grozovski J., Boura-Halfon S., Masuda T., Prinz M., Jung S. // *Eur. J. Immunol.* 2020. V. 50. № 3. P. 353–362.
24. Maes M.E., Colombo G., Schulz R., Siebert S. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 707. P. 134310.
25. Chukwudi C.U., Good L. // *J. Antibiot. (Tokyo)*. 2019. V. 72. № 4. P. 225–236.
26. Kallunki T., Barisic M., Jäättelä M., Liu B. // *Cells*. 2019. V. 8. № 8. P. 796.
27. Mehravar M., Shirazi A., Nazari M., Banan M. // *Developmental Biology*. 2019. V. 445. № 2. P. 156–162.
28. Yan S., Tu Z., Li S., Li X.J. // *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 2018. V. 81. P. 488–492.
29. Wang H., Lu H., Lei Y.S., Gong C.Y., Chen Z., Luan Y.Q., Li Q., Jian Y.Z., Wang H.Z., Wu F.L., Tao C.L., Shen H., Bo H.B., Shao H.W., Zhang W.F. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2020. V. 18. P. 390–401.

## Problems of Technologies of Genomic Editing and Transgenesis

A. P. Bolshakov

*Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia*

This study briefly summarizes the problems that arise when working with transgenesis systems based on recombinases and CRISPR/Cas9. A number of recent results are highlighted regarding the possible effects induced by tamoxifen and doxycycline, agents that are widely used to regulate gene expression in transgenic animals with inducible gene expression. According to these data, there is always a possibility of ectopic tamoxifen-independent expression of the transgene, and currently it is not always possible to predict where it will be observed and how this may affect the final picture of gene expression. A similar problem is present with the use of doxycycline-dependent systems, when the “nonspecific” effects of doxycycline are simply ignored. The work raises the problem of the need to conduct control experiments, taking into account the development of possible side effects associated with both the use of gene expression modulators and the systems that alter the genome, as well as the development of alternative approaches.

*Keywords:* recombinase, CRISPR/Cas9, tamoxifen, doxycycline