

УДК 606:604.6

## Геномное редактирование: современное состояние исследований и применение в животноводстве

© 2018 Н.А. ЗИНОВЬЕВА\*, Н.А. ВОЛКОВА, В.А. БАГИРОВ

ФГБНУ Федеральный научный центр животноводства – ВИЖ им. акад. Л.К. Эрнста, п. Дубровицы, Московская обл., 142132

\*e-mail: n\_zinovieva@mail.ru

Поступила 01.04.2018 г.

Принята в печать 20.04.2018 г.

Создание и развитие технологий геномного редактирования (GE) открывает новые возможности в генетической инженерии домашних млекопитающих и птиц. В настоящем обзоре дана краткая характеристика GE-систем на основе ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9 и направлений их совершенствования с целью дальнейшего использования для улучшения свойств сельскохозяйственных животных. Описаны области применения GE-технологий в животноводстве и птицеводстве, дискутируются направления и перспективы их дальнейшего развития.

*Ключевые слова:* геномное редактирование, CRISPR/Cas9, домашние животные.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-3-9-22

Изменение признаков и свойств домашних животных методами геномной инженерии привлекает внимание исследователей во всем мире, начиная с середины 80-х годов прошлого века, когда две группы в США и Германии экспериментально показали возможность получения трансгенных сельскохозяйственных животных [1, 2]. За более чем 30-летний период было проведено несколько сотен различных типов генетических модификаций домашних животных; при этом было установлено, что основными лимитирующими факторами развития генно-инженерных технологий в животноводстве являются высокие трудовые и материальные затраты. Это, в свою очередь, обусловило постоянный поиск новых, более совершенных методов генетической модификации с точки зрения технической доступности и эффективности [3].

Доминирующим методом переноса ДНК в генеративные клетки сельскохозяйственных животных до середины 90-х годов XX века являлся метод микроинъекции линейных молекул ДНК в пронуклеус зигот [4]. Однако вследствие низкой эффективности (число полученных трансгенных животных варьировало от 0,5–1,0% от числа пересаженных эмбрионов у крупного рогатого скота, овец, коз и свиней и до 1,0–2,0% у кроликов) он был практически полностью вытеснен пересадкой ядер соматических клеток (SCNT) [5], генетически трансформированных *in vitro*.

Дальнейший прогресс в области геномной инженерии домашних животных связывают с развитием технологий так называемого активного трансгеноза, которые посредством экзогенных ферментов или кодирующих их ДНК обеспечивают

*Список сокращений:* Cas9 – CRISPR-ассоциированный белок 9; Cas9n – Cas9-никаза; CRISPR – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами; DSB – двухцепочечные разрывы; FDA – управление по контролю за продуктами и лекарствами, США; GD – генный драйв; GE – геномное редактирование; GGTA1 –  $\alpha$ -1,3-галактозилтрансфераза; HDR – гомологичная репарация; HR – гомологичная рекомбинация; indels – инсерции/делеции; iPSC – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; LGB – бета-лактоглобулин; MCR – мутагенная цепная реакция; MSTN – миостатин; NE – нуклеотидное редактирование; NHEJ – нехомологичное соединение концов; off-target-эффект – нецелевое воздействие; OV – овальбумин; OVM – овомукоид; PAGE – продвижение аллелей посредством геномного редактирования; PERV – эндогенные ретровирусы свиней; PRRS – репродуктивно-респираторный синдром свиней; SCNT – пересадка ядер соматических клеток; Sg – сперматогонии; TALEN – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции; ZFN – нуклеазы «цинковых пальцев».

возможность направленных (сайт-специфических) модификаций в геноме [6]. В качестве инструмента для реализации данных технологий применяют системы ДНК-транспозонов [7–11] и сайт-специфических нуклеаз; при этом последние получают все большее распространение при работе с домашними животными.

Использование сайт-специфических нуклеаз, таких как ZFN [12] и TALEN [13], и системы на основе CRISPR/Cas9 [14–16] делает возможным введение двухцепочечных разрывов (DSB) в целевой локус геномной ДНК. Известно, что сайт-специфические DSB могут примерно в 10000 раз более эффективно стимулировать процесс гомологичной рекомбинации (HR) [17, 18]. На этом свойстве и основано их использование в геномной инженерии. Прецизионный характер генерируемых изменений в последовательности ДНК позволяет осуществлять так называемое геномное редактирование (GE, genome editing) практически любых участков генома клеток. ZFN и TALEN состоят из химерных белков, которые содержат адаптируемый ДНК-связывающий домен, сшитый с нуклеазным доменом *FokI* (нуклеаза, выделенная из *Flavobacterium okeanokoites*). Эти ферменты индуцируют в целевых последовательностях генома мутации в форме инсерций или делеций (indels) небольшого размера посредством репарации разрывов ДНК путем негомологичного сшивания концов (NHEJ) или гомологичной репарации (HDR). ZFN и TALEN были с успехом использованы для редактирования геномов сельскохозяйственных животных главным образом на начальных этапах развития технологий, использующих сайт-специфические нуклеазы [19–22]. Однако вследствие высокой стоимости и значительной трудоемкости конструирования рекомбинантных векторов на фоне несущественных преимуществ перед традиционной технологией нокаута данные нуклеазы были практически полностью вытеснены системами на основе CRISPR/Cas9 [23, 24]. С применением последних связывают начало новой эры в области генетической инженерии млекопитающих [25].

Система CRISPR/Cas9 состоит из некодирующей короткой направляющей РНК (sgRNA, РНК-гид) длиной 20 нуклеотидов и нуклеазы Cas9, обнаруженной у *Streptococcus pyogenes*. РНК-гид узнает и комплементарно взаимодействует с целевой последовательностью, маркируя тем самым специфический участок геномной ДНК для последующего разрезания нуклеазой [26]. В отличие от ZFN и TALEN, сборка которых требует несколь-

ко последовательных шагов клонирования, в основе конструирования систем CRISPR/Cas9 лежит применение короткого олигомера. Благодаря своей высокой эффективности, а также простоте и малой трудоемкости использования система CRISPR/Cas9 находит более широкое распространение по сравнению с другими GE-технологиями. Кроме того, она может быть применена для одноступенчатой генерации мутаций в нескольких генах одновременно [27], чего невозможно добиться ни одним из ранее используемых методов. Высокая эффективность системы CRISPR/Cas9 позволяет получать колонии клеток, несущие множественные мутации генов, посредством прямого скрининга без использования селективных маркеров, что в дальнейшем исключает необходимость удаления последних посредством реклонирования или скрещивания [28]. Сравнение систем ZFN, TALEN и CRISPR/Cas9, а также настоящих и потенциальных областей их применения представлено в обзоре М.М. Harrison с соавт. [29]. Возможности конструирования, применения и анализ действия TALEN и CRISPR/Cas9 на примере различных модельных систем подробно описаны в обзоре А.А. Немудрого с соавт. [31]. Сравнение характеристик GE-систем на основе ZFN, TALEN и CRISPR-Cas9 приведено в таблице.

Как уже говорилось выше, индуцируемые нуклеазами сайт-специфические DSB эффективно стимулируют процесс гомологичной рекомбинации [17, 18]. Однако обычно используемый для репарации DSB конкурентный путь NHEJ зачастую приводит, особенно в клетках млекопитающих, к инсерциям небольшого размера или хромосомным перестройкам [15, 32]. Так, например, при использовании системы CRISPR/Cas9 для получения поросят с нокаутом гена *CD163* посредством инъекции соответствующих РНК в цитоплазму зигот свиней было получено четыре поросенка с нужной делецией; при этом у трех из них были выявлены дополнительные инсерции случайных нуклеотидов в сайтах разрезания [33]. В связи с этим целый ряд исследований направлен на совершенствование GE-технологий на основе CRISPR/Cas9 в целях повышения их эффективности, специфичности и универсальности [15, 34–36].

Так, Richardson с соавт. [37] оптимизировали генерацию единичных нуклеотидных замен посредством CRISPR/Cas9, эффективность которой в культуре клеток достигала 60% [38]. С этой целью для снижения повреждения ДНК в процессе GE и индукции прецизионных замен оснований без использования гомологичной репарации

**Сравнение систем геномного редактирования ZFN, TALEN и CRISPR-Cas9 [31]**

**Comparison of systems for genome editing ZFN, TALEN and CRISPR-Cas9 [31]**

Функции и свойства	ZFN	TALEN	SRISPR-Cas9
Узнавание ДНК в различных структурах	Протеин–ДНК	Протеин–ДНК	РНК–ДНК
Компоненты	ZFP– <i>FokI</i>	TALE– <i>FokI</i>	Cas9–sgRNA
Эффективность	Низкая и переменная	Высокая и переменная	Высокая и переменная
Эффект off-target	Сильный	Средний	Переменный
Редактирование нескольких локусов	Затруднено	Затруднено	Осуществляется
Сайт-мишень	Богатая гуанином	Без ограничений	PAM (NGG)
Работа в димерах/парах	Осуществляется	Осуществляется	Не осуществляется
Происхождение	Эукариоты	Растительный патоген	Прокариоты
Стоимость	Высокая	Средняя	Низкая
Конструирование вектора	Затруднено	Средняя трудоемкость	Легко выполнимо

донорской матрицы была разработана и применена на различных видах животных программируемая система нуклеотидного редактирования (NE). Система основана на использовании ферментов семейства AID/APOBEC группы цитидиндезаминаз, которые генерируют инсерции в ДНК/РНК путем дезаминирования цитидина до тимидина/уридина [39]. Для замены С на Т (или G на А) в сайте-мишени без DSB такие дезаминазы интегрируются в систему CRISPR/Cas9 [24, 40–42].

В дальнейшем был разработан целый ряд нуклеотидных редакторов с улучшенной эффективностью [31]. NE-системы несомненно станут значимым инструментом прецизионного геномного редактирования путем генерации целевых однонуклеотидных замен. Можно прогнозировать их широкое применение в отношении домашних животных, например, с целью создания животных-моделей или корректировки рецессивных наследственных дефектов.

Другим направлением совершенствования систем редактирования является снижение off-target-эффекта. С этой целью, Gao Y. с соавт. [36] выполнили модификацию системы CRISPR/Cas9, введя в нее Cas9-никазу (Cas9n). Используя в качестве клеток-мишеней фетальные фибробласты крупного рогатого скота, они показали возможность индукции одноцепочечного разрыва с последующей инсерцией гена в выбранный локус с заметным уменьшением off-target-эффекта.

Распространение «отредактированных» аллелей в популяциях животных требует прохождения нескольких циклов (генераций) размножения.

Однако во избежание инбридинга на начальных этапах разведения в качестве одного из родителей необходимо использовать интактных особей, что обуславливает сегрегацию исходных аллелей в популяции. В этой связи еще одним направлением совершенствования GE-технологий применительно к животным является развитие методов более быстрой фиксации «отредактированных» аллелей в популяциях. Одним из таких методов является так называемый генный драйв (GD).

Генный драйв – это природный феномен, который вызывает мутацию на одной хромосоме с последующим ее копированием на другой гомологичной хромосоме. В результате индивидум, имеющий в своем геноме два различных аллеля какого-либо гена, передает своему потомству только один из них. Процесс копирования обусловлен инициацией посредством GD двухцепочечных разрывов в ДНК на гомологичной хромосоме. Возникающие DSB репарируются клеткой с использованием механизма HR, при этом последовательность хромосомы, которая содержит GD-элементы, служит матрицей для репарации [43, 44]. Фактически внесение в один из вариантов гена целенаправленных разрывов активирует механизм HR, что приводит к замене одного из вариантов гена («запасного») на другой (тот, в котором произошел разрыв) и передаче этих изменений потомству. Вопреки законам расщепления Менделя, все потомство будет совершенно одинаковым по данному аллелю. Таким образом, GD – это всего лишь способ активировать природную систему репарации путем введения точечного разрыва

в ДНК [45]. Примером возникшего естественным путем GD является внедрение так называемого P-элемента в геном *Drosophila melanogaster*, обнаруженное в 1950-х г. и его распространение с тех пор по всему миру [46]. Использование системы CRISPR/Cas9 в сочетании с GD для модификации генеративных клеток родителей или родительских особей на стадии зиготы может обеспечить гомозиготность всех потомков по отредактированному аллелю. Концепция GD для распространения желательных аллелей в популяции была впервые предложена Burt в 2003 г. [47] и в дальнейшем эмпирически подтверждена с использованием модификации генома *D. melanogaster* системой CRISPR/Cas9, получившей название мутагенной цепной реакции (MCR) [48]. Созданная система CRISPR/Cas9 в сочетании с GD была использована для индукции изменения окраски дрозофил дикого типа на желтую посредством копирования гена *yellow*, сцепленного с GD, на гомологичной хромосоме потомства, унаследовавшего одну копию этого гена. Конверсия оказалась очень эффективной (> 98%), что свидетельствует о высоком потенциале данной технологии при распространении аллелей в популяциях [48].

Получение потомства млекопитающих с использованием GE-технологий требует проведения модификации на уровне генеративных клеток (яйцеклеток и сперматозоидов или их предшественников, зигот или эмбрионов на предимплантационных стадиях). Применяемые для этого методы должны быть интегрированы в современные репродуктивные технологии, разработанные для разных видов сельскохозяйственных животных. В настоящее время, как говорилось выше, наибольшее распространение получили два способа привнесения CRISPR/Cas9-обусловленных модификаций в генеративные клетки домашних животных: микроинъекция в зиготы или SCNT с использованием генетически модифицированных клеток. Применение метода микроинъекции требует получения ранних эмбрионов на стадии зиготы (оплодотворенной яйцеклетки). С этой целью осуществляют синхронизацию полового цикла потенциальных доноров, затем вызывают суперовуляцию для увеличения количества одновременно овулирующих яйцеклеток и проводят осеменение или спаривание животных. Зиготы получают через определенный период времени (в зависимости от вида животных), в большинстве случаев *post mortem*. У животных, для которых разработаны эффективные технологии экстракорпорального оплодотворе-

ния (крупный рогатый скот, овцы, козы, свиньи), возможно использование эмбрионов, полученных *in vitro*. Сопоставляя три способа микроинъекции в зиготы мышей – ДНК в пронуклеус, РНК в пронуклеус или РНК в цитоплазму – Ногги с соавт. [49] показали наибольшую эффективность последнего метода с точки зрения как выживаемости бластоцист и получения потомства, так и общей эффективности создания трансгенных животных. Показано, что цитоплазматическая инъекция Cas9 mRNA/sgRNA не оказывала существенного влияния на развитие эмбрионов свиней [50, 51]. Хотя проведение манипуляций непосредственно на зиготах имеет ряд преимуществ по сравнению с использованием предимплантационных эмбрионов (доступность данного вида генеративного материала, относительно невысокие материальные и трудовые затраты), указанная стратегия может приводить к гипоморфным мутациям, не передающимся потомству, или к появлению животных-мозаиков, требующих дополнительного цикла разведения с целью получения животных, несущих трансген во всех клетках организма. Таким образом, наличие мозаицизма с учетом относительно большого генерационного интервала у домашних животных приводит к увеличению периода от начала эксперимента до получения потомства, несущего изменения во всех клетках организма, на 1–3 года в зависимости от вида животных. Кроме того, информация о достижении запланированного типа изменений в геноме может быть получена только после рождения животных (срок беременности составляет около 115 дней у свиней, 145–150 дней у овец и коз и 9 мес. у крупного рогатого скота), т.е. через несколько месяцев после проведения экспериментов. Учитывая, что эффективность генерации запланированных изменений GE-методами может быть относительно невысокой (например, только 3,1% (1/32) от числа полученных поросят содержали корректную делецию гена *CD163*, ассоциированную с устойчивостью к PRRS [33]), использование метода микроинъекции связано с двойным риском – невыполнения поставленных задач или увеличения срока их решения.

Начиная с 90-х годов прошлого века, открытие возможности репрограммирования соматических клеток животных и их способности давать начало развитию эмбрионов сделало SCNT базовым методом для получения генетически модифицированных домашних животных [5]. Данный метод позволяет проводить отбор донорских клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на



животных и гарантировать получение потомства с запланированными модификациями генов. Однако вследствие ограниченной способности клеток домашних животных к пролиферации *in vitro* HR-активность таких клеток является очень низкой. Вместе с тем, еще до открытия сайт-специфических нуклеаз ряд лабораторий сообщили о получении домашних животных с нокаутированными (*knocked-out* и *knocked-in*) генами посредством HR-обусловленных сайт-специфических генетических модификаций соматических клеток [52–57]. Принимая во внимание, что технология SCNT является тривиальной процедурой в целом ряде лабораторий по всему миру, в том числе и в России [5], можно прогнозировать, что она станет базовой для проведения экспериментов по геномному редактированию домашних животных.

Следует, однако, отметить, что технологии SCNT на сегодняшний день разработаны далеко не для всех видов животных. Среди других клеток-мишеней для геномного редактирования домашних животных рассматриваются индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (iPSC). Показана возможность генерации iPSC из фибробластов крупного рогатого скота и успешного редактирования в них локуса *NANOG* с использованием CRISPR-Cas9 [58]. Потенциальными клетками-мишенями для GE являются также предшественники генеративных клеток самцов млекопитающих – сперматогонии (Sg) [59]. Экспериментально показана возможность поддержания в культуре и криоконсервации Sg разных видов сельскохозяйственных животных [60–62] и их способность дифференцироваться до спермиев после трансплантации в семенники реципиентов [63]. В этой связи интерес в качестве потенциальных реципиентов для трансплантации донорских Sg, генетически модифицированных *in vitro*, могут представлять самцы с выключенным собственным сперматогенезом. Так, например, Park и соотр. [64], используя систему CRISPR/Cas9, выполнили редактирование гена *NANOS2* в эмбрионах свиней. Было показано, что свиньи с диаллельным нокаутом *NANOS2* характеризуются отсутствием специфических для самцов генеративных клеток, в то время как другие аспекты их тестикулярного развития остаются в норме [64].

Если генетические модификации лабораторных животных ориентированы главным образом на решение фундаментальных задач, то в определении направлений использования GE-технологий у домашних животных значительную роль играет рынок, потенциальное развитие

существующих его сегментов или возникновение новых. В качестве перспективного направления рассматривается создание следующих типов животных: с измененными хозяйственно-полезными признаками; генетически устойчивых к наследственным и инфекционным заболеваниям; продуцентов биологически активных рекомбинантных белков; доноров внутренних органов для пересадки человеку (ксенотрансплантация) и животных-моделей [3]. В настоящее время имеется ряд примеров успешного применения GE-технологий в каждой из вышеперечисленных областей [65].

### Направленные изменения хозяйственно-полезных признаков домашних животных

Такие изменения являлись первой целью генетической модификации на начальных этапах развития технологий геномной инженерии в животноводстве [3]. Ожидалось, что они позволят значительно быстрее достигать запланированных селекционных эффектов, чем при использовании классических методов селекции; однако ни одна из ранних разработок в этом направлении не дошла до практического применения.

Большинство из указанных исследований затрагивают изменения простых признаков, контролируемых одним или несколькими так называемыми генами с сильным эффектом, или главными генами [66]. Ряд работ посвящен генерации биаллельного нокаута гена миостатина (*MSTN*), ассоциированного с повышенным наращиванием мышечной массы (фенотип «двойной обмускуленности»). С использованием ZFN и TALEN были получены особи крупного рогатого скота [67, 68], овцы [68] и свиньи [69, 70] с *MSTN*-нокаутом, проявляющие соответствующий фенотип. С. Cui с соотр. [71], применив TALEN, получили коз с нокаутом гена  $\beta$ -лактоглобулина (*LGB*) и дополнительной экспрессией лактоферрина человека. Ожидается, что молоко таких коз будет иметь пониженные аллергенные и усиленные бактерицидные свойства. W. Tan с соотр. [72] с помощью TALEN осуществили интродукцию комолости у молочного скота. У коров коммерчески привлекательной мишенью является ген *LGB*, нокаут которого способен сделать молоко коров более пригодным для питания детей. У овец потенциальными GE-мишенями могут стать гены семейства костных морфогенетических белков (*BMP*) и соответствующих рецепторов, ассоциированные с плодовитостью [73, 74]. Улучшение этой характеристики является актуальной задачей для мясных пород овец, подавляющее большинство которых

отличаются относительно низкой плодовитостью. Применение GE-технологий может решить задачу получения линяющих овец, коммерческая привлекательность которых обусловлена снижением потребности рынка в грубой шерсти. Такие животные могли бы с большей эффективностью использовать питательные вещества рациона вследствие снижения энергетических затрат на рост шерстных волокон; при их выращивании отпала бы необходимость в трудоемком процессе стрижки и последующей утилизации шерсти.

Следует, однако, отметить, что использование GE-технологий применительно к простым признакам позволит решать лишь ограниченный спектр задач, не затрагивающих основные составляющие эффективности сельскохозяйственного производства – повышение уровня продуктивности и качества продукции животноводства. Это связано с тем, что большинство хозяйственно-полезных признаков домашних животных являются количественными и, как правило, обусловлены активностью множества вариантов генов со слабым эффектом. Поэтому возможности улучшения этих характеристик посредством GE-технологий считались ограниченными. Однако недавние модельные исследования с использованием GE-стратегии, названной PAGE (Promotion of Alleles by Genome Editing), показали, что редактирование относительно небольшого числа из множества вариантов генов, контролирующих хозяйственно-полезные признаки, может удвоить степень как краткосрочного, так и долгосрочного генетического прогресса по сравнению с традиционной селекцией [75]. Дополнительной движущей силой в развитии GE-технологий улучшения количественных признаков домашних животных может стать использование генного драйва [47]. В модельных исследованиях было показано, что селекция в комбинации с GE и GD обеспечивает повышение степени генетического прогресса без увеличения инбридинга [66].

О потенциальных преимуществах, которые открывают GE-технологии в селекции, свидетельствует интерес ведущих племенных компаний к их разработке и внедрению. Так, институтом Roslin (Великобритания) в сотрудничестве с одной из ведущих британских племенных свиноводческих компаний Genus PIC реализуется проект «Геномное редактирование количественных признаков у сельскохозяйственных животных» (сроки выполнения – 2016–2019 г., бюджет – более 700 тыс. ф. ст., заказчик – BBSRC, <http://gtr.rcuk.ac.uk/projects?ref=BB%2FN015339%2F1>).

Авторы проекта считают возможным увеличение на 33% степени генетического прогресса в селекции по показателям здоровья и качества мяса посредством редактирования всего пяти вариантов генов. В рамках проекта будут разработаны технологии, позволяющие осуществлять множественное редактирование у одного индивидуума, и методы разведения, позволяющие выбирать лучшие GE-варианты и лучших животных для GE, а также оптимальные способы управления программой разведения.

### **Повышение генетической устойчивости животных к заболеваниям**

Решение данной проблемы является одной из приоритетных задач современного животноводства. Однако использование с этой целью технологий геномной инженерии сдерживается наличием лишь ограниченной информации о механизмах генетической устойчивости к подавляющему большинству патогенов. На наш взгляд, это стало основной причиной отсутствия каких-либо существенных результатов в повышении устойчивости животных к заболеваниям путем использования классических технологий трансгенеза [76, 77]. Увеличение эффективности и технической доступности геномной инженерии животных благодаря прогрессу GE-технологий стало новым импульсом в развитии данного направления. Так, Ikeda с сотр. [78], используя CRISPR/Cas9 в сочетании с методом SCNT, продемонстрировали успешное редактирование мутантного гена изойлейцил-тРНК-синтетазы (IARS), вызывающего рецессивное наследственное заболевание у японского черного скота (порода крупного рогатого скота) – IARS-синдром.

Имеется ряд примеров использования GE-технологий для повышения устойчивости животных к инфекционным заболеваниям. С целью усиления резистентности к маститам был выполнен опосредованный ZFN knock-in гена лизоцима в локус  $\beta$ -казеина молочного крупного рогатого скота [79, 80]. Gao с сотр. [36], используя CRISPR-Cas9n, осуществили инсерцию в геном телят гена природного ассоциированного с резистентностью макрофагового белка-1 (*NRAMP1*), обусловившего их повышенную устойчивость к туберкулезу. Whitworth и сотр. [51] получили трансгенных свиней с нокаутом *CD163* – гена фузионного рецептора для вируса PRRS – и гена Т-клеточного рецептора *CD1D*. В дальнейшем было показано, что свиньи с нокаутом *CD163* были устойчивы к хорошо охарактеризованному относительно

вирулентному изоляту NVSL 97-7895 вируса PRRS [81]. Burkard с сопр. [33], используя метод микроинъекции CRISPR/Cas9 в цитоплазму зигот, генерировали у свиней делецию домена *SRCR5* гена *CD163*, являющегося сайтом взаимодействия с вирусом PRRS *in vitro*. Данная делеция не оказала негативного действия на рост и состав крови животных. С использованием конфокальной микроскопии было показано отсутствие репликационных структур в макрофагах, делетированных по домену *SRCR5* гена *CD163*, что указывает на ингибирование инфекции на стадиях, предшествующих репликации [33]. Проводятся исследования по геномному редактированию потенциальных генов-мишеней, ассоциированных с устойчивостью к африканской чуме свиней [82]. Несмотря на отсутствие заметных успехов GE-технологий в обеспечении устойчивости к действию различных патогенов, получение животных с измененными вариантами потенциальных генов-мишеней могут расширить наше понимание молекулярных механизмов, лежащих в основе этиологии и патогенеза заболеваний.

### Создание животных-биореакторов

Данная область исследований стала самым бурно развивающимся направлением в генетической модификации домашних животных еще в догеномную эру [3, 4, 83] и единственным из рассматриваемых направлений генетической модификации, дошедшим до широкого практического применения. С одной стороны, это было вызвано необходимостью создания технологических платформ, способных эффективно производить рекомбинантные белки, мировая потребность в которых составляет 100 кг в год и более (данные FDA), а с другой стороны – способностью домашних животных эффективно синтезировать практически любые белки с сохранением их полной биологической функциональности. Первыми домашними животными-производителями стали овцы, синтезирующие с молоком человеческие факторы свертывания крови IX или  $\alpha_1$ -антитрипсин под контролем промотора гена *LGB* [84]. Первым лекарственным средством, разрешенным к использованию в Европе (2006 г.), а затем и в США (2009 г.), стал препарат ATryn (производства Ovation Pharm), действующее вещество которого – антитромбин III человека – получают из молока трансгенных коз [85]. В настоящее время еще два рекомбинантных белка, производимых трансгенными животными, разрешены FDA к использованию в США: это ингибитор эстеразы C1, получаемый из молока

трансгенных кроликов (2014 г., препарат Ruconest фирмы Salix Pharm) и лизосомная кислая липаза (LAL), получаемая из белка куриных яиц (2015 г., препарат Kanuma фирмы Alexion Pharm).

Преимуществом использования сайт-специфических нуклеаз для создания животных-производителей является возможность установления контроля интегрированных целевых генов со стороны эндогенных промоторов, что обеспечивает достижение высокого тканеспецифического уровня синтеза рекомбинантных белков. Успешным примером такого подхода является направленная экспрессия альбумина человека в крови крупного рогатого скота в результате TALEN-опосредованной замены кодирующей последовательности гена сывороточного альбумина крупного рогатого скота аналогичной последовательностью гена человека [86].

### Генетическая модификация животных с целью создания доноров для ксенотрансплантации

Данная проблема уже давно вызывает интерес у исследователей [87, 88]. Это обусловлено растущей потребностью во внутренних органах для пересадки, которая не может быть удовлетворена только за счет аллогенной трансплантации. Так, по состоянию на 1 января 2018 г., европейский лист ожидания органов для пересадки включает 14733 пациента (<https://www.eurotransplant.org/cms/>). Еще в начале века две лаборатории в США сообщили о создании линий так называемых GAL-КО-свиней с нокаутом гена  $\alpha$ -1,3-галактозилтрансферазы (*GGTA1*) – основного эпитопа, ответственного за сверхострую реакцию отторжения при пересадке органов свиней приматам [89, 90]. В дальнейшем GAL-КО-свиньи были использованы в качестве доноров клеток для проведения дополнительных генетических манипуляций и различных доклинических исследований [91, 92]. Потенциальная востребованность органов свиней для ксенотрансплантации на фоне недавнего прекращения действия патента, ограничивающего коммерческое использование GAL-КО-животных [93], обусловила активизацию работ по получению свиней с нокаутом *GGTA1* и других значимых для ксенотрансплантации генов с использованием различных GE-систем, включая ZNF [94, 95], TALEN [96, 97] и CRISPR/Cas9 [98]. Одним из ограничений при использовании свиней в качестве доноров является присутствие в их геноме эндогенных ретровирусов (PERV), которые могут активироваться в геноме других видов и представлять опасность

не только для пациента, но и для популяции человека в целом. Решением проблемы стало недавнее получение PERV-инактивированных свиней посредством CRISPR/Cas9-редактирования и SCNT [99]. Результаты лабораторных и доклинических исследований подтверждают перспективность дальнейшего развития GE-технологий применительно к ксенотрансплантации [100–102].

### Генетически модифицированные домашние животные-модели

Такие животные, в частности, свиньи и овцы, играют все возрастающую роль в трансляционных биомедицинских исследованиях [103]. С использованием классических технологий трансгенеза уже получены свиньи-модели для изучения цистического фиброза [104, 105], диабета [106] и макулярной дистрофии сетчатки Штаргардта [107], что вызывает огромный интерес у биомедицинского сообщества. Klymiuk и сотр. [108] создали свиней с индуцированной экспрессией трансгенов, основанной на бинарной tet-оп-системе, которые рассматриваются в качестве идеальных моделей для экспериментальной физиологии и трансляционной медицины. Уже существует один пример применения GE-технологий для создания животных-моделей. Используя метод микроинъекции системы CRISPR/Cas в зиготы, Hai с сотр. [50] получили трансгенных свиней с нокаутом гена *vWF*, являющегося причиной болезни Виллибранта у человека. Принимая во внимание возможность генерации целевых изменений в геноме посредством GE, следует уже в ближайшее время ожидать активизации работ по получению животных-моделей.

Наряду с созданием трансгенных млекопитающих (коров, коз, овец, свиней), не меньший интерес представляет и получение генетически модифицированных сельскохозяйственных птиц – кур, перепелов, уток, гусей, индеек. Однако трудности, связанные с точным определением времени овуляции, большим количеством желтка в яйцеклетке и сильным уплотнением цитоплазмы около пронуклеусов, не позволяют использовать классический метод микроинъекции для трансгенеза птиц. В качестве наиболее эффективного способа создания трансгенных птиц до недавнего времени рассматривалась трансформация бластодермальных клеток на стадии X с применением лентивирусных и ретровирусных векторов [3]. Однако использование векторов вирусной природы несет в себе опасность ограничения последующего практического использования

продуктов, получаемых от таких птиц. GE-технологии открывают возможности эффективного получения птиц с заданными изменениями в геноме путем использования в качестве мишеней примордиальных зародышевых клеток (PGC) или стволовых клеток семенников – сперматогоний (Sg). PGC – эмбриональные предшественники половых клеток – обладают свойством плюрипотентности, т. е. способностью дифференцироваться как в мужские, так и женские половые клетки. Sg представляют собой немногочисленную популяцию сперматогенных клеток, располагающихся на базальной мембране семенных канальцев. Они характеризуются способностью к самообновлению и дифференцировке с образованием зрелых половых клеток самцов – спермиев. В литературе имеется ряд примеров эффективного выделения и культивирования PGC кур [109] и перепелок [110, 111]. Показана возможность успешного поддержания в культуре Sg петухов [112, 113] и перепелов [114], а также способность донорских PGC и Sg принимать участие в формировании гонад после их трансплантации в эмбрионы реципиентов [115–118]. Данные свойства PGC и Sg открывают широкие возможности их применения в качестве клеток-мишеней для геномного редактирования с целью создания особей с заданными свойствами. До настоящего времени опубликовано лишь несколько сообщений об успешном получении GE-кур посредством TALEN [119, 120] или CRISPR/Cas9 [121–124]. С использованием PGC были получены куры с нокаутом гена овальбумина (*OV*) [119], которые рассматриваются в качестве новой продукционной платформы. Принимая во внимание, что на долю овальбумина приходится ~54% от общего содержания белка в яйце [125], использование кур с нокаутом *OV* позволит существенно облегчить процесс очистки рекомбинантных продуктов.

Oishi с сотр. [122], используя PGC в качестве клеток-мишеней, получили три линии GE-кур с нокаутом гена овомукоида (*ОМ*) – одного из основных аллергенов куриных яиц. Яйца, получаемые от таких кур, могут найти применение для производства вакцин и продуктов с пониженной аллергенностью. Принимая во внимание успешный выход на рынок рекомбинантной лекарственной субстанции, получаемой на основе белка куриных яиц [126], и преимущество птиц в качестве биореакторов перед млекопитающими [3], можно прогнозировать рост числа исследований в направлении получения птиц – продуцентов рекомбинантных белков. Возможности интродукции и



быстрого распространения желательных аллелей в популяциях птиц посредством GE-технологий позволяет ожидать дальнейшего улучшения существующих и привнесения новых хозяйственно-полезных признаков в коммерческие линии птиц. Например, одним из представляющих интерес признаков может стать отсутствие оперения. Потенциальными преимуществами таких так называемых «голых» кур являются более эффективное использование ими энергии корма, лучшие адаптационные способности в жарком климате и экологичность технологии (отсутствие необходимости переработки и утилизации пера). Хотя в литературе пока нет данных о получении GE-особей других видов птицы кроме кур, вышеназванные и другие открывающиеся возможности позволяют ожидать экспоненциального роста исследований в области геномного редактирования видов и пород сельскохозяйственной птицы.

Развитие технологий геномной инженерии применительно к сельскохозяйственным животным и птице до недавнего времени сдерживалось трудоемкостью и высокими материальными затратами, обусловленными, главным образом, относительно низкой эффективностью генерации целевых изменений в геноме. Создание и развитие новых систем геномного редактирования позволяют прогнозировать рост числа исследований в области геномной инженерии домашних животных.

Материал подготовлен в рамках выполнения задания Федерального агентства научных организаций (ФАНО) № АААА-А18-118021590132-9.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Brem G., Brenig B., Goodman H.M., et al. Production of transgenic mice, rabbits and pig by microinjection into pronuclei. *Zuchtkunde*, 1985, 20, 251–252.
2. Hammer R., Pursel V., Rexroad J., et al. Production of trans-genie rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, 1985, 315, 680–683.
3. Зиновьева Н.А., Волкова Н.А., Багиров В.А., Брем Г. Трансгенные сельскохозяйственные животные: современное состояние исследований и перспективы. *Экологическая генетика*, 2015, 13(2), 58–76.
4. Серов О.Л. Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*, 2013, 17 (4/2), 1055–1064.
5. Сингина Г.Н., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А. Криобанки соматических клеток как перспективный способ сохранения генетических ресурсов животных. *Сельскохозяйственная биология*, 2014,(6), 3–14. doi: 10.15389/agrobiology.2014.6.3rus
6. Bosch P., Forcato D.O., Alustiza F.E., et al. Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2015, 72, 1907–1929. doi: 10.1007/s00018-015-1842-1
7. Clark K.J., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C. Pigs taking wings with transposons and recombinases. *Genome Biol.*, 2007, 8 (Suppl 1), S13.
8. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S., et al. Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques*, 2009, 47, 959–968.
9. Garrels W., Mates L., Holler S., et al. Generation of transgenic pigs by the Sleeping Beauty transposition in zygotes. *Reprod. Dom. Anim.*, 2010, 45, 65.
10. Jacobsen J.C., Bawden C.S., Rudiger S.R., et al. An ovine transgenic Huntington’s disease model. *Hum. Mol. Genet.*, 2010, 19, 1873–1882.
11. Kues W.A., Niemann H. Advances in farm animal transgenesis. *Prev. Vet. Med.*, 2011, 102, 146–156. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.009
12. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93, 1156–1160.
13. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., et al. Targeting DNA Double-Strand Breaks with TAL Effector Nucleases. *Genetics*, 2010, 186(2), 757–761, doi: 0.1534/genetics.110.120717
14. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., et al. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nature Biotechnology*. 2014, 32(3), 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808
15. Hsu P.D., Scott D.A., Weinstein J.A., et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*, 2013. 31(9), 827–832. doi: 10.1038/nbt.2647
16. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 2012, 337(6096), 816–821, doi: 10.1126/science.1225829
17. Galli A., Schiestl R.H. Effects of DNA double-strand and single-strand breaks on intrachromosomal recombination events in cell-cycle-arrested yeast cells. *Genetics*, 1998, 149, 1235–1250.
18. Storici F., Durham C.L., Gordenin D.A., Resnick M.A. Chromosomal site-specific double-strand breaks are efficiently targeted for repair by oligonucleotides in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2003, 100, 14994–14999. doi:10.1073/pnas.2036296100
19. Porteus M.H., Carroll D. Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat. Biotechnol.*, 2005, 23, 967–973.
20. Miller J.C., Tan S., Qiao G., et al. A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(2), 143–148. doi: 10.1038/nbt.1755

21. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zincfinger nucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 108, 12013–12017.
22. Xin J., Yang H., Fan N., et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*, 2013, 8(12), e84250. doi: 10.1371/journal.pone.0084250
23. Cong L., Ran F.A., Cox D. et al. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science*, 2013, 339(6121), 819–823. doi: 10.1126/science.1231143
24. Mali P., Yang L., Esvelt K.M., et al. RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 2013, 339(6121), 823–826. doi: 10.1126/science.1232033
25. Salsman J., Deltore G. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochem. Cell Biol.*, 2017, 95(2), 87–201. doi: 10.1139/bcb-2016-0137
26. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature*, 2012, 482 (7385), 331–338. doi: 10.1038/nature10886
27. Wang Y., Zhao S., Bai L., et al. Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. *BioMed. Res. International*, 2013, 2013, Article ID 580463. doi: 10.1155/2013/580463
28. Wang S., Sun X., Ding F., et al. Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on re-cloned embryo development. *Theriogenology*, 2009, 72(4), 535–541. doi: 10.1016/j.theriogenology.2009.04.009
29. Harrison M.M., Jenkins B.V., O'Connor-Giles K.M., Wildonger J.A. CRISPR view of development. *Genes Dev.*, 2014, 28, 1859–1872. doi: 10.1101/gad.248252.114
30. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий. *Acta Naturae*, 2014, 6(3), 20–42.
31. Lee B.R., Choi H.J., Jung K.M., Han J.Y. Recent progress toward precise genome editing in animals. *J. Animal Breeding Genomics*, 2017, 1(2) 85–101. doi: 10.12972/jabng.20170010
32. Lieber M.R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Ann. Rev. Biochem.*, 2010, 79, 181–211. doi:10.1146/annurev.biochem.052308.093131
33. Burkard C., Lillico S.G., Reid E., et al. Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathogens*, 2017, 13(2), e1006206. doi: 10.1371/journal.ppat.1006206
34. Pattanayak V., Lin S., Guilinger J.P., et al. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity. *Nat. Biotechnol.*, 2013, 31, 839–843. doi:10.1038/nbt.2673
35. Cho S.W., Kim S., Kim Y., et al. Analysis of off-target effects of CRISPR/Cas-derived RNA-guided endonucleases and nickases. *Genome Res.*, 2014, 24, 132–141. doi:10.1101/gr.162339.113
36. Gao Y., Wu H., Wang Y., Liu X., et al. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knock-in cattle with reduced off-target effects. *Genome Biology*, 2017, 18, 13. doi: 10.1186/s13059-016-1144-4
37. Richardson C.D., Ray G.J., Bray N.L., Corn J.E. Non-homologous DNA increases gene disruption efficiency by altering DNA repair outcomes. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 12463. doi: 10.1038/ncomms12463
38. Hess G.T., Tycko J., Yao D., Bassik M.C. Methods and applications of CRISPR-Mediated base editing in eukaryotic genomes. *Mol. Cell*. 2017, 68(1), 26–43. doi: 10.1016/j.molcel.2017.09.029
39. Conticello S.G. The AID/APOBEC family of nucleic acid mutators. *Genome Biol.*. 2008, 9(6), 229. doi: 10.1186/gb-2008-9-6-229
40. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., et al. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*, 2013, 154(6), 1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021
41. Komor A.C., Kim Y.B., Packer M.S., et al. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*, 2016, 533(7603), 420–424. doi: 10.1038/nature17946
42. Ma Y., Zhang J., Yin W., et al. Targeted AID-mediated mutagenesis (TAM) enables efficient genomic diversification in mammalian cells. *Nat. Methods*, 2016, 13(12), 1029–1035. doi: 10.1038/nmeth.4027
43. Gould F. Broadening the application of evolutionarily based genetic pest management. *Evolution*, 2008, 62(2), 500–510.
44. Burt A., Trivers R. Genes in conflict: The biology of selfish genetic elements. Cambridge: Belknap Press. 2006.
45. Интернет-ресурс. URL: <https://nplus1.ru/material/2017/06/09/genedrive/>. Дата обращения: 15.03.2018 г.
46. Clark J.B., Kidwell M.G. A phylogenetic perspective on P transposable element evolution in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94(21), 11428–11433.
47. Burt A. Site-specific selfish genes as tools for the control and genetic engineering of natural populations. *Proc. Soc. Biol. Sci.*, 2003, 270 (1518), 921–928.
48. Gantz V.M., Bier E. The mutagenic chain reaction: a method for converting heterozygous to homozygous mutations. *Science*, 2015, 348 (6233), 442–444. doi: 10.1126/science.aaa5945
49. Horii T., Arai Y., Yamazaki M., et al. Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Rep.*, 2014, 4, 4513. doi: 10.1038/srep04513

50. Hai T., Teng F., Guo R., et al. One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Cell Res.*, 2014, 24(3), 372–375. doi: 10.1038/cr.2014.11
51. Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., et al. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from *in vitro*-derived oocytes and embryos. *Biol. Reproduction*, 2014, 91(3), 78–90. doi: 10.1095/biolreprod.114.121723
52. Kuroiwa Y., Kasinathan P., Matsushita H., et al. Sequential targeting of the genes encoding immunoglobulin mu and prion protein in cattle. *Nat. Genet.*, 2004, 36(7), 775–780.
53. Sendai Y., Sawada T., Urakawa M., et al. Alpha1,3-Galactosyltransferase gene knockout in cattle using a single targeting vector with loxP sequences and cre-expressing adenovirus. *Transplantation*, 2006, 81(5), 760–766.
54. Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N., et al. Production of cattle lacking prion protein. *Nat. Biotechnol.* 2007, 25(1), 132–138.
55. Robl J.M., Wang Z., Kasinathan P., Kuroiwa Y. Transgenic animal production and animal biotechnology. *Theriogenology*, 2007, 67(1), 127–133.
56. Wang S., Zhang K., Ding F., et al. A novel promoterless gene targeting vector to efficiently disrupt PRNP gene in cattle. *J. Biotechnol.*, 2013, 163(4), 377–385. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.10.018
57. Matsushita H., Sano A., Wu H., et al. Triple immunoglobulin gene knockout transchromosomal cattle: bovine lambda cluster deletion and its effect on fully human polyclonal antibody production. *PLoS One*, 2014, 9(3), e90383. doi: 10.1371/journal.pone.0090383
58. Heo Y.T., Quan X.Y., Xu Y.N., et al. CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine-induced pluripotent cells. *Stem. Cells Dev.*, 2015, 24(3), 393–402. doi: 10.1089/scd.2014.0278
59. Aponte P.M. Spermatogonial stem cells: Current biotechnological advances in reproduction and regenerative medicine. *World J. Stem. Cells.*, 2015, 7(4), 669–680. doi: 10.4252/wjsc.v7.i4.669
60. Cai H., Wu J.Y., An X.L., et al. Enrichment and culture of spermatogonia from cryopreserved adult bovine testis tissue. *Anim. Reprod. Sci.*, 2016, 166, 109–115. doi: 10.1016/j.anireprosci.2016.01.009
61. Lee Y.A., Kim Y.H., Ha S.J., et al. Cryopreservation of porcine spermatogonial stem cells by slow-freezing testis tissue in trehalose. *J. Anim. Sci.*, 2014, 92(3), 984–995. doi: 10.2527/jas.2013-6843
62. Costa G.M.J., Avelar G.F., Lacerda S.M.S.N., et al. Horse spermatogonial stem cell cryopreservation: feasible protocols and potential biotechnological applications. *Cell Tissue Res.*, 2017, 370(3), 489–500. doi: 10.1007/s00441-017-2673-1
63. Gonzalez R., Tang L., Dobrinski I. Application of spermatogonial transplantation in agricultural animals. In: Oatley J.M., Griswold M.D. *The Biology of Mammalian Spermatogonia*. Springer Science+Business Media LLC. 2017, 343–378.
64. Park K.E., Kaucher A.V., Powell A., et al. Generation of germline ablated male pigs by CRISPR/Cas9 editing of the NANOS2 gene. *Sci. Reports*, 2017, 7, 40176. doi: 10.1038/srep40176
65. Carroll D., Charo R.A., The societal opportunities and challenges of genome editing. *Genome Biol.*, 2015, 16, 242. doi: 10.1186/s13059-015-0812-0
66. Gonen S., Jenko J., Gorjanc G., et al. Potential of gene drives with genome editing to increase genetic gain in livestock breeding programs. *Genet. Sel. Evol.*, 2017, 49, 3. doi: 10.1186/s12711-016-0280-3
67. Luo J., Song Z., Yu S., et al. Efficient generation of myostatin (MSTN) biallelic mutations in cattle using zinc finger nucleases. *PLoS One*, 2014, 9(4), e95225. doi: 10.1371/journal.pone.0095225
68. Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., et al. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Res.*, 2014, 24(1), 147–153. doi: 10.1007/s11248-014-9832-x
69. Qian L., Tang M., Yang J., et al. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 14435. doi: 10.1038/srep14435
70. Cai C., Qian L., Jiang S., et al. Loss-of-function myostatin mutation increases insulin sensitivity and browning of white fat in Meishan pigs. *Oncotarget*, 2017, 8(21), 34911–34922. doi: 10.18632/oncotarget.16822
71. Cui C., Song Y., Liu J., et al. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci. Rep.*, 2015, 5, 10482. doi: 10.1038/srep10482
72. Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A., et al. Efficient non-meiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2013, 110(41), 16526–16531. doi: 10.1073/pnas.1310478110
73. Зиновьева Н.А., Гладырь Е.А., Коркина Е. ДНК-маркеры плодовитости овец. *Овцы, козы, шерстяное дело*, 2006, 3, 30–38.
74. Demars J., Fabre S., Sarry J., et al. Genome-wide association studies identify two novel BMP15 mutations responsible for an atypical hyperprolificacy phenotype in sheep. *PLoS Genet.*, 2013, 9(4), e1003482. doi: 10.1371/journal.pgen.1003482
75. Jenko J., Gorjanc G., Cleveland M.A., et al. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genet. Sel. Evol.*, 2015, 47, 55. doi: 10.1186/s12711-015-0135-3
76. Bagle T.R., Kunkulol R.R., Baig M.S., More S.Y. Transgenic animals and their application in medicine. *Int. J. Med. Res. Health Sci.*, 2013, 2(1), 107–116.



77. Lassnig C., Mueller M. Disease-Resistant Transgenic Animals. In: Sustainable food production. Eds: Christou P. et al. N.Y.: Springer Science+Business Media, 2013, 747–760. doi: 10.1007/978-1-4614-5797-8
78. Ikeda M., Matsuyama S., Akagi S., et al. Correction of a Disease Mutation using CRISPR/Cas9-assisted Genome Editing in Japanese Black Cattle. *Sci. Reports.*, 2017, 7, 17827. doi: 10.1038/s41598-017-17968-w
79. Liu X., Wang Y., Guo W., et al. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.* 2013, 4, 2565. doi: 10.1038/ncomms3565
80. Liu X., Wang Y., Tian Y., et al. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc. Biol. Sci.*, 2014, 281, 20133368. doi: 10.1098/rspb.2013.3368
81. Whitworth K.M., Rowland R.R.R., Ewen C.L., et al. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.*, 2016, 34(1), 20–22. doi: 10.1038/nbt.3434
82. Lillico S.G., Proudfoot C., King T.J., et al. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 21645. doi: 10.1038/srep21645
83. Houdebine L. Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 2009, 32(2), 107–121. doi: 10.1016/j.cimid.2007.11.005
84. Simons J., Wilmut I., Clark A., et al. Gene transfer into sheep. *Bio/Technol.*, 1988, 6, 179–183.
85. Jim K. First US approval for a transgenic animal drug. *Nat. Biotechnol.*, 2009, 27(4), 302–304. doi: 10.1038/nbt0409-302
86. Moghaddassi S., Eyestone W., Bishop C.E. TALEN-Mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *Plos One*, 2014, 9(2), e89631. doi: 10.1371/journal.pone.0089631
87. Luo Y., Lin L., Bolund L., et al. Genetically modified pigs for biomedical research. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2012, 35(4), 695–713. doi: 10.1007/s10545-012-9475-0
88. Зиновьева Н.А., Мелерзанов А.В., Петерсен Е.В. и др. Использование трансгенных GAL-KO свиней в ксенотрансплантации: проблемы и перспективы. *Сельскохозяйственная биология*, 2014, (2), 42–49. doi: 10.15389/agrobiology.2014.2.42rus
89. Dai Y., Vaught T.D., Boone J., et al. Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nat. Biotechnol.*, 2002, 20, 251–255.
90. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W., et al. Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*, 2002, 295 (5557), 1089–1092.
91. Weiner J., Yamada K., Ishikawa Y., et al. Prolonged survival of GalT-KO swine skin on baboons. *Xenotransplantation*, 2010, 17(2), 147–152. doi: 10.1111/j.1399-3089.2010.00576.x.
92. Iwase H., Liu H., Wijkstrom M., et al. Pig kidney graft survival in a baboon for 136 days: longest life-supporting organ graft survival to date. *Xenotransplantation*, 2015, 22(4), 302–309. doi: 10.1111/xen.12174
93. Gustafsson K.T., Sachs D.H.  $\alpha(1,3)$  galactosyltransferase negative porcine cells. Patent US6153428A. Priority date 1994-04-13.
94. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., et al. Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zinc-finger nucleases. *PNAS USA*, 2011, 108(29), 12013–12017. doi: 10.1073/pnas.1106422108
95. Lutz A.J., Li P., Estrada J.L., et al. Double knockout pigs deficient in N-glycolylneuraminic acid and galactose alpha-1,3-galactose reduce the humoral barrier to xenotransplantation. *Xenotransplantation*, 2013, 20(1), 2–35. doi: 10.1111/xen.12019
96. Xin J., Yang H., Fan N., et al. Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One*, 2013, 8(12), e84250. doi: 10.1371/journal.pone.0084250
97. Kang J.T., Kwon D.K., Park A.R., et al. Production of  $\alpha 1,3$ -galactosyltransferase targeted pigs using transcription activator-like effector nuclease-mediated genome editing technology. *J. Vet. Sci.*, 2016, 17(1), 89–96. doi: 10.4142/jvs.2016.17.1.89
98. Petersen B., Frenzel A., Lucas-Hahn A., et al. Efficient production of biallelic GGTA1 knockout pigs by cytoplasmic microinjection of CRISPR/Cas9 into zygotes. *Xenotransplantation*, 2016, 23(5), 338–346. doi: 10.1111/xen.12258
99. Niu D., Wei H.J., Lin L., et al. Inactivation of porcine endogenous retrovirus in pigs using CRISPR-Cas9. *Science*, 2017, 357(6357), 1303–1307. doi: 10.1126/science.aan4187
100. Wang Z.Y., Burlak C., Estrada J.L., et al. Erythrocytes from GGTA1/CMAH knockout pigs: implications for xenotransfusion and testing in non-human primates. *Xenotransplantation*. 2014, 21(4), 376–384. doi: 10.1111/xen.12106
101. Mohiuddin M.M., Singh A.K., Corcoran P.C., et al. Chimeric 2C10R4 anti-CD40 antibody therapy is critical for long-term survival of GTKO.hCD46.hTBM pig-to-primate cardiac xenograft. *Nat. Commun.*, 2016, 7, 11138. doi: 10.1038/ncomms11138
102. Liu Z., Hu W., He T., et al. Pig-to-primate islet xenotransplantation: past, present, and future. *Cell Transplant.* 2017, 26(6), 925–947. doi: 10.3727/096368917X694859
103. Aigner B., Renner S., Kessler B., et al. Transgenic pigs as models for translational biomedical research. *J. Mol. Med.* 2010, 88(7), 653–664. doi: 10.1007/s00109-010-0610-9
104. Rogers C.S., Stoltz D.A., Meyerholz D.K., et al. Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*, 2008, 321(5897), 1837–1841. doi: 10.1126/science.1163600



105. Wine J.J. The development of lung disease in cystic fibrosis pigs. *Sci. Transl. Med.*, 2010, 2(29), 29ps20. doi: 10.1126/scitranslmed.3001130
106. Renner S., Fehlings C., Herbach N., et al. Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabete*, 2010, 59(5), 1228–1238. doi: 10.2337/db09-0519
107. Sommer J.R., Estrada J.L., Collins E.B., et al. Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration. *Br. J. Ophthalmol*, 2011, 95(12), 1749–1754. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300417
108. Klymiuk N., Böcker W., Schönitzer V., et al. First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB J* 2012, 26(3), 1086–1099. doi: 10.1096/fj.11-185041
109. Pérez Sáez J.M., Bussmann L.E., Barañao J.L., Bussmann U.A. Improvement of chicken primordial germ cell maintenance *in vitro* by blockade of the aryl hydrocarbon receptor endogenous activity. *Cell Reprogram.*, 2016, 18(3), 154–161. doi: 10.1089/cell.2016.0015
110. Волкова Н.А., Багиров В.А., Томгорова Е.К., Ветох А.Н., Волкова Л.А., Зиновьева Н.А. Выделение, культивирование и характеристика примордиальных зародышевых клеток перепелов. *Сельскохозяйственная биология*, 2017, 52(2), 261–267. doi: 10.15389/agrobiol.2017.2.261rus .
111. Yakhkeshi S., Rahimi S., Sharafi M., et al. *In vitro* improvement of quail primordial germ cell expansion through activation of TGF-beta signaling pathway. *J. Cell Biochem.*, 2017, Dec 15. doi: 10.1002/jcb.26618
112. Choi J.W., Kim S., Kim T.M., et al. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2010, 5(9), e12968. doi: 10.1371/journal.pone.0012968
113. Волкова Н.А., Коржикова С.В., Котова Т.О. и др. Выделение, культивирование и характеристика сперматогониев петуха // *Сельскохозяйственная биология*, 2016, 51(4), 450–458. doi: 10.15389/agrobiol.2016.4.450eng
114. Pramod R.K., Lee B.R., Kim Y.M., et al. Isolation, characterization, and *in vitro* culturing of spermatogonial stem cells in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Stem. Cells Dev.*, 2017, 26(1), 60–70. doi: 10.1089/scd.2016.0129
115. Macdonald J., Glover J.D., Taylor L., et al. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2010, 5(11), e15518. doi:10.1371/journal.pone.0015518
116. Song Y., Duraisamy S., Ali J., et al. Characteristics of long-term cultures of avian primordial germ cells and gonocytes. *Biol. Reprod.*, 2014, 90(1), 15. doi: 10.1095/biolreprod.113.113381
117. Tonus C., Cloquette K., Ectors F., et al. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod. Fertil. Dev.*, 2016, 28(5), 628–639. doi: 10.1071/RD14194
118. Volkova N.A., Vetokh A.N., Kotova T.O., et al. Recovery of spermatogenesis in male chickens by transplantation of donor spermatogonia. *Reprod. Domestic Animals*, 2017, 52(S3), 141–142.
119. Park T.S., Lee H.J., Kim K.H., et al. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2014, 111(35), 12716–12721. doi: 10.1073/pnas.1410555111
120. Taylor L., Carlson D.F., Nandi S., et al. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development*, 2017, 144, 928934. doi: 10.1242/dev.145367
121. Dimitrov L., Pedersen D., Ching K.H., et al. Germline gene editing in chickens by efficient CRISPR-mediated homologous recombination in primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2016, 11(4), 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0154303
122. Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., et al. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 2016, 6, 23980. doi: 10.1038/srep23980
123. Cooper C.A., Challagulla A., Jenkins K.A., et al. Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Res.*, 2016, 26(3), 331347. doi: 10.1007/s11248-016-0003-0
124. Bai Y., He L., Li P., et al. Efficient genome editing in chicken DF-1 cells using the CRISPR/Cas9 system. *G3 (Bethesda)*, 2016, 6(4), 917–923. doi: 10.1534/g3.116.027706
125. Yamamoto T., Juneja L.R., Hatta H, Kim M. Hen Eggs: Their basic and applied science. Boca Raton: CRC Press, 1997, 13–24.
126. Sheridan C. FDA approves ‘farmaceutical’ drug from transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.*, 2016, 34(2), 117–119. doi: 10.1038/nbt0216-117

# Genome Editing: State of the Art and Application to Animal Husbandry

N.A. ZINOVIEVA\*, N.A. VOLKOVA, and V.A. BAGIROV

*Ernst Federal Science Center for Animal Husbandry, 142132, Dubrovitsy, Moskovskaya Oblast, Russia*

\**e-mail: n\_zinovieva@mail.ru*

Received April 1, 2018

Accepted April 20, 2018

**Abstract**—The creation and development of genome editing (GE) technologies open new opportunities in the genetic engineering of domestic mammals and poultry. In the present review, we have characterized the GE-systems based on ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas9 and the aims of their improvement in relation to farm animals. We described the application fields of the GE-technologies in animal husbandry and poultry farming and discussed the objectives and prospects of their further development.

*Key words:* genome editing, CRISPR/Cas9, domestic animals.

**Acknowledgements**—The material of the article was prepared within the framework of the task from the Federal Agency of Research Organizations (FANO) no. AAAA-A18-118021590132-9.

**doi:** 10.21519/0234-2758-2018-34-3-9-22