

А. Ф. Яковлев

Редактирование генома сельскохозяйственных животных (обзор)

Аннотация. Эффективные инструменты редактирования генома ZFNs, Talens и CRISPR / Cas9 показали свою способность революционизировать молекулярно-биологические исследования с серьезными надеждами на прикладное продвижение результатов. CRISPR / Cas9, как эволюционно приобретенная иммунная система бактерий и архей, препятствующая вторжению вирусов или плазмид, была удачно адаптирована для редактирования генома эукариот. Системы CRISPR / Cas9 в настоящее время подразделяются на три основных типа: I, II и III, из которых тип II имеет относительно простые компоненты и наиболее часто используется для редактирования генома сельскохозяйственных животных. Эта технология была успешно применена на кроликах, свиньях, козах, овцах и крупном рогатом скоте с развитием множества приложений. В частности, редактирование генома у сельскохозяйственных животных может способствовать улучшению продуктивных генетических свойств, улучшению качества различных продуктов животного происхождения, обеспечению устойчивости к болезням или минимизации вредного воздействия на окружающую среду. Важно, что редактирование генома в животноводстве может быть использовано для увеличения частоты благоприятных аллелей с большим эффектом. Приводы или репрессии генов могут использоваться для увеличения скорости, с которой отредактированные аллели распространяются среди популяций скота. Успешное продвижение полезных аллелей в программах разведения животных требует открытия локусов количественных признаков через набор больших массивов данных о вкладе этих локусов в формирование фенотипических признаков.

Ключевые слова: редактирование генома, ДНК, РНК, гены, аллели, животные, нуклеазы, мутации, рекомбинации.

Автор:

Яковлев Александр Федорович — член-корреспондент РАН, руководитель отдела генетики и биотехнологии; Всероссийский научно-исследовательский институт генетики и разведения сельскохозяйственных животных — филиал Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный научный центр животноводства — ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста», 196601, Россия, г. Санкт-Петербург, г. Пушкин, Московское шоссе, 55 а.

Основы редактирования генома. В последнее десятилетие появился ряд эффективных целевых инструментов и приложений для редактирования генома. Новые программируемые ДНК-нуклеазы цинковых пальцев — ZFN [1], эффективные транскрипционные нуклеазы — TALENs [2] и кластеры регулярно промежуточных коротких палиндромных повторов CRISPR / Cas9, обладающие длинными сайтами распознавания и целевого разрезания ДНК [3–5], дают возможность получать целенаправленные генетические изменения путем повышения скорости мутаций ДНК в тысячи раз через индукцию двунитиевых разрывов в заданном геномном сайте. Успешное применение этих способов редактирования генома было показано

на различных видах организмов, включая насекомых, амфибий, растений, нематод, нескольких видов млекопитающих, включая человеческие клетки и эмбрионы. В отличие от всех других ДНК-нуклеаз, действие которых основано на связывании белка с ДНК, CRISPR / Cas9 использует специфическое связывание РНК и ДНК-нуклеазы. Это дало преимущество использования CRISPR / Cas9 для многих целей (выяснение и понимание сложных физиологических систем, продуцирование трансгенных животных). В данном обзоре дан анализ информации, в основном, о применении редактирования генома сельскохозяйственных животных. Геномные редакторы состоят из домена расщепления и ДНК-связывающего домена, ко-

торый может соединяться почти с любой известной последовательностью ДНК. Репарация ДНК в месте разрыва может привести либо к нокауту (выключению) гена, либо к целенаправленной инсерции генов, определенных нуклеотидных последовательностей или одиночного нуклеотидного полиморфизма (SNP).

Ранее было известно, что CRISPR / Cas9 является опосредованной РНК адаптивной иммунной системой, которая защищает бактерии и археи от вирусов или плазмид [6]. Для редактирования генома эукариот требуется индивидуально спроектированная направляющая РНК (single guide RNA — sgRNA), эндонуклеаза Cas9 и последовательности PAM (protospacer adjacent motif). PAM — это 2–6 оснований, локализованных сразу после последовательности ДНК, нацеленной нуклеазой Cas9 в выбранной области. Комплекс sgRNA-Cas9 связывается с целевой мишенью и создает двухцепочечный разрыв. Процесс нормальной репарации происходит, как правило, с помощью гомологичной (HDR — homology directed repair) [7] или негомологичной (NHEJ — non-homologous end joining) [8] рекомбинации. Однако, активность эндонуклеаз на месте разреза может приводить и к ошибкам — к делециям или инсерциям [9,10]. Технология системы CRISPR / Cas9 II типа была разработана как эффективный инструмент для редактирования генома эукариот [3]. Генетические изменения являются постоянными и наследуемыми, если они получены на зиготах или клетках зародышевой линии.

Система CRISPR / Cas9 эффективна в модификации генома очень ранних эмбрионов на стадии зиготы до того, как произошло первое деление эмбриона. Цитоплазматическая микроинъекция вектора CRISPR / Cas9 достаточна для того, чтобы привести к получению потомства [3]. Недавние достижения в области редактирования генома усилили интерес к использованию этой технологии для ускорения генетического прогресса в программах разведения сельскохозяйственных животных [11]. Открытие сайт-специфических эндонуклеаз предоставило прямой путь для получения целевого мутагенеза, так как эти ферменты позволяют регулировать удаление или введение специфических геномных последовательностей, непосредственно применяемых к зиготам [12, 13]. Эффективность репарации может быть повышена путем ускорения экспрессии гена *Rad52*, который участвует в процессе гомологичной рекомбинации [14]. Стандартные CRISPR-опосредованные стратегии инактивации гена основаны не только на формировании двунитиевых разрывов. Имеется возможность эффективно инактивировать гены

путем точного преобразования четырех кодонов (CAA, CAG, CGA и TGG) в STOP-кодона без образования двунитиевых разрывов [15]. Было исследовано влияние малых молекул Scr7, L755507 и ресвератрола на повышение эффективности гомологичной рекомбинации в фибробластах свиньи. Результаты анализа с помощью зеленого флуоресцентного белка eGFP показали, что эти небольшие молекулы могут повысить эффективность гомологичной рекомбинации в 2–3 раза [16]. Стратегии повышения эффективности инсерции нуклеотидных последовательностей включают использование ингибитора NHEJ SCR-7 [17] или активатора HR RS-1 [18].

Применение технологий редактирования генома животных. Проведено моделирование различных сценариев размножения с редактированием генома и приводами генов у крупного рогатого скота [19]. В модели отредактировано определенное число генов, отдельных нуклеотидов с количественной характеристикой признака — QTN (Quantitative Trait Nucleotide — нуклеотидная замена, влияющая на количественные признаки), с учетом скорости увеличения благоприятных частот аллелей и времени фиксации благоприятных аллелей. Показано, что редактирование генома в животноводстве приводит к краткосрочному, среднесрочному и долгосрочному увеличению генетической эффективности за счет увеличения частот благоприятных аллелей в популяции. Приводы генов ускоряют увеличение частот аллелей без влияния на инбридинг.

Первым и пока уникальным генетически модифицированным животным, одобренным для потребления человеком, является трансгенный лосось с перенесенным геном гормона роста, который показал более чем двукратное увеличение скорости роста [20]. Аналогичная цель была достигнута у млекопитающих за счет увеличения активности секретируемого белка миостатина, продукта одноименного гена *MSTN*, оказывающего отрицательное влияние на развитие мышечной массы. Несколько встречающихся в природе аллелей гена миостатина были отредактированы у животных разных видов: крупного рогатого скота, овец и свиней с использованием технологии TALEN [21, 22] и CRISPR — у свиней [23, 24], а также коз [25] и кроликов [26]. Модели домашнего скота с репрессией генов часто генерируются путем доставки компонентов CRISPR или TALEN в цитоплазму зиготы, что обеспечивает высокую эффективность редактирования генома свиней [27], овец [28], крупного рогатого скота [29] и кроликов [18]. CRISPR может быть также представлен в качестве рибонуклеопротеина [27], с тем преимуществом, что он действует быстрее, чем доставка

РНК, поскольку он не требует генерации белка Cas9 зиготой. Компоненты CRISPR могут также поставляться в виде плазмиды [30]. Однако, это самый медленный путь, так как Cas9 необходимо транскрибировать и переводить, и это влечет за собой длительное присутствие компонентов CRISPR, которые благоприятствуют появлению внецелевых эффектов. Путем совместной инъекции двух функциональных генов (*MSTN* и *FGF5* — фактор роста фибробластов-5) в одноклеточные эмбрионы с мРНК Cas9 и sgRNAs были созданы ген-модифицированные козы с разрушенным одним или обоими генами [31]. CRISPR-опосредованное нарушение *FGF5* у кашемировых коз улучшило производство кашемира [5]. Ряд исследований были проведены для получения животных, устойчивых к туберкулезу коров [32], к африканской чуме свиней [33] и к вирусу репродуктивного и респираторного синдрома свиней (PRRSV) [34, 35].

Хотя увеличение генетической эффективности от продвижения аллелей путем редактирования генома было впечатляющим, многие поколения с отредактированным геномом требовали фиксации благоприятных аллелей [11]. Это связано с тем, что неблагоприятные аллели не отредактированных родителей продолжают разделяться внутри каждого поколения. Методы, которые могут быстрее исправить благоприятные аллели, будут полезны в программах разведения. Одним из таких методов является редактирование генома с помощью генных приводов [18]. Генные приводы более надежно усиливают генетическую эффективность от редактирования генома, ускоряют увеличение частоты благоприятных аллелей и сокращают время, необходимое для их фиксации. Кроме того, они обеспечивают более быстрое нацеливание QTN на реализацию ожидаемых изменений в фенотипе и снижают уровень инбридинга при редактировании подмножества производителей. Привлекает внимание применение редактирования генома на основе изменения SNP, связанных с получением потомства только женского пола, что особенно важно для птицеводства и свиноводства [36].

Качество молока может быть модифицировано путем редактирования промоторов гена молочного белка [37]. Удалось интегрировать лизостафин в локус бета-казеина [38]. В качестве путей изменения состава молока и белка яйца представляет интерес попытка заблокировать гены бета-лактоглобулина у коз, генов овальбумина и овомукоидов в яйцах кур с целью возможности снижения аллергии у восприимчивых людей [39, 40]. Остается возможность использования животных и, в частности, коров в качестве биореакторов [41]. С использованием технологии TALENs по-

лучено потомство голштинского крупного рогатого скота без рогов [42]. В ряде исследований сообщалось о производстве генетически модифицированных свиней для различных биомедицинских целей с помощью редактирования генома [43].

Проблемы. Геномное редактирование скота быстро развивается как техническая область и может быть готова стать коммерческой реальностью. Тем не менее, остаются вопросы о надлежащем регулировании и потенциальном воздействии на промышленный сектор по общедоступной приемлемости продуктов геномного редактирования [44]. В течение всего процесса развития технологий редактирования генома были обнаружены разнообразные потенциальные ловушки, такие как характер активности Cas9, выбор целевого сайта и дизайн sgRNA, методы доставки конструкции и частота гомологичной репарации, которые могут повлиять на эффективность и специфичность системы CRISPR / Cas9 [45]. Для обеспечения более высокой эффективности резки Cas9 крайне необходима оптимизация дизайна sgRNA и осторожный выбор целевых сайтов. При улучшении скорости мутации, связанной с мишенью, а также активности Cas9, следует учитывать концентрации sgRNA и Cas9. Главной среди потенциальных ловушек систем CRISPR / Cas9 являются особенности характеристики конструкции sgRNA. Поскольку системы CRISPR / Cas9 являются высоко программируемыми, и комплексы Cas9 / sgRNA могут использоваться для редактирования генома или каталитически неактивных комплексов Cas9 (dCas9) / sgRNA. Для этих приложений требуется эффективная и специфичная разработка sgRNA. Можно сделать заключение, что рациональный дизайн sgRNA остается пока серьезной проблемой. Ранее предполагалось, что комплексы Cas9 / sgRNA могут расщеплять двухцепочечную ДНК в присутствии РАМ и соседней комплементарной последовательности-мишени. Однако многие эксперименты показали, что некоторые sgRNAs были менее эффективными или даже неактивными [46, 47]. Для CRISPR / Cas9-опосредованного редактирования генома 5'-конец sgRNAs, на который добавляют G (гуанин), например — GX19NGG, настоятельно необходим для запуска экспрессии [48]. Кроме того, G является предпочтительным в первом или втором положении, наиболее близком к РАМ, что может помочь загрузке Cas9, тогда как С (цитозин) сильно неблагоприятен в тех же положениях. В-третьих, поскольку множественные последовательности урацила в sgRNA вызывают низкую экспрессию sgRNA, Т (тимин) нежелателен в четырех нуклеотидных положениях, смежных с РАМ. Аденин

(А) является предпочтительным в середине sgRNA, а G является предпочтительным в PAM-дистальной области [43]. В целом, G-богатые и А-истощенные sgRNAs более стабильны и более эффективны. Более того, были обнаружены новые особенности PAM SpCas9, которые влияют на активность sgRNA. Расширенная последовательность PAM CGGH является оптимальной для использования SpCas9 для генерации DSB в клетках млекопитающих. И наоборот, TGGG показывает наименьшую активность. Тем не менее, ряд исследований продемонстрировали, что система CRISPR / Cas9 может вызывать значительное количество нецелевого мутагенеза [49]. Однако для биологических исследований моделей, например, генетических методов лечения, внецелевые явления генерируют нежелательные мутации в случайных местах, что оказывает влияние на точные модификации генов. Кроме того, некоторые фундаментальные атрибуты системы остаются неясными, включая каталитический механизм Cas9, механизмы идентификации локальных целевых объектов и основы для зависимости от PAM. Понимание этих аспектов поможет в усилиях, направленных на повышение каталитической эффективности, расширения нашего выбора целевых сайтов и создание высокоспециализированных средств, связанных с Cas9.

Перспективы. Учитывая выше приведенные результаты исследований можно ожидать еще много работ в новых моделях животных, которые приведут к значительному расширению технологических возможностей CRISPR / Cas9. Наиболее ожидаем прогресс в генетическом улучшении свиней, опосредованный редактированием генома, особенно те области, которые связаны с качеством мяса, репродукцией и антивирусной устойчивостью [50]. Поскольку данные секвенирования генома продолжают накапливаться и обнаруживаются конкретные роли отдельных нуклеотидных последовательностей [51], комбинации редактирования генома и геномных данных позволят быстро улучшать генетические признаки, включая конструирование биомолекулярных белков. Биофизические и биохимические исследования по CRISPRs еще больше помогли улучшить дизайн инструментов редактирования геномов сле-

дующего поколения, такие как HF-Cas или ECAS [52]. Другие члены семейства CRISPR / Cas9, такие как Cpf1, могут быть дополнительно модифицированы путем редактирования генома домашнего скота [53].

Заключение. Прорывы в программируемых нуклеазах сделали редактирование генома эффективным и доступным процессом. Система CRISPR / Cas9, которая использует направляющую РНК и нуклеазу Cas9 для идентификации и вырезания последовательностей ДНК-мишени, представляет собой надежную технологию, которая уже использована на различных видах сельскохозяйственных животных. Система CRISPR / Cas9 имеет больше целевых сайтов, чем ZFN и TALEN, а Cas9 имеет множество вариантов, которые могут использоваться в различных исследованиях. Наиболее эффективным методом пока остается микроинъекция реагентов CRISPR непосредственно в эмбрионы. Кроме того, система чрезвычайно проста в использовании и может быть выполнена в обычной молекулярно-генетической лаборатории.

Инструменты на основе Cas9 значительно повысили способность проводить систематический анализ функции генов. Геномная селекция с успехом используется в передовых программах по разведению животных для обеспечения генетического прогресса по количественным признакам. Поэтому возможности продвижения аллелей путем редактирования генома будут способствовать быстрому увеличению частоты благоприятных аллелей.

Наравне с наличием преимуществ этой системы, существуют некоторые проблемы с текущими инструментами на основе Cas9, такими как методы доставки, эффекты вне цели и баланс путей гомологичной и негомологичной рекомбинации. Кроме того, остаются неясными некоторые фундаментальные атрибуты системы, включая каталитический механизм Cas9, механизмы идентификации локальных целевых объектов и основы зависимости от PAM. Однако, несомненно, результаты проведенных исследований показывают, что перевод технологий CRISPR из фундаментальных исследований в селекционную практику остается не столь отдаленной перспективой.

Исследования проведены при поддержке ФАНО России, регистрационный номер темы № AAAA-A18-118021590138-1

Литература

1. Geurts A. M., Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases / A. M. Geurts, G. J. Cost, Y. Freyvert et al. // Science. — 2009. — V. 325. — P. 433. DOI : 10.1126/science.1172447.
2. Tesson L. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs / L. Tesson, C. Usal, S. Menoret et al. // Nature Biotechnology. — 2011. — V. 29. — P. 695–696. DOI: 10.1038/nbt.1940.
3. Petersen B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species / B. Petersen // Reprod. Domest. Anim. — 2017. — V. 52. — S. 3. — P. 4-13. DOI: 10.1111/rda.13012.

4. Shen B. Generation of gene-modified mice via Cas9 / RNA-mediated gene targeting / B. Shen, J. Zhang, H. Wu // *Cell Research*. — 2013. — V. 23. — P. 720–723. DOI: 10.1038/cr.2013.46.
5. Wang X. Disruption of FGF5 in cashmere goats using CRISPR / Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers / X. Wang, B. Cai, J. Zhou et al. // *PLoS One*, 2016. October 18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164640>.
6. Barrangou R. Crispr provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau et al. // *Science*. — 2007. — V. 315. — P. 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
7. Iliakis G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis, H. Wang, A.R. Perrault et al. // *Cytogenet. Genome Res.* — 2004. — V. 104. — P. 14–20. DOI: 10.1159/000077461.
8. Gu J. Mechanistic flexibility as a conserved theme across 3 billion years of nonhomologous DNA end-joining. *Genes* / J. Gu, M. R. Lieber // *Dev.* — 2008. — V. 22. — P. 411–415. DOI: 10.1101/gad.1646608).
9. Yudian Ding. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR / Cas9 / Yudian Ding, Hong Li, Ling-Ling Chen // *Front. Plant Sci.* 24 May 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00703>.
10. Moehle E. A. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases / E. A. Moehle, J. M. Rock, Y. L. Lee, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2007. — V. 104. — P. 3055–3060. DOI: 10.1073/PNAS.0611478104.
11. Jenko J. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs / J. Jenko, G. Gorjanc, M. A. Cleveland et al. // *Genet. Sel. Evol.* — 2015. — V. 47. — P. 47–55. doi:10.1186/s12711-015-0135-3.
12. Soo-Young Yum. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific / Soo-Young Yum, Ki-Young Youn, Woo-Jae Choi et al. // *Anim. Sci. Biotechnol.* — 2018. — V. 9. DOI: 10.1186 / s40104-018-0232-6.
13. Lamas-Toranzo I. CRISPR is knocking on barn door *Reprod. Domest.* / I Lamas-Toranzo, J Guerrero-Sánchez, H Miralles-Bover // *Animals*. — 2017. — V. 52. — Issue S4. — P. 39–47. DOI: 10.1111/rda.13047.
14. Shao S. Enhancing CRISPR / Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* / S. Shao , C. Ren , Z. Liu et.al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2017. — V. 18. — P. 43–52. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.09.012.
15. Billon P. CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons / P. Billon , E. E. Bryant , S. A. Joseph et al. // *Molecular cells*. — 2017. — V. 67. — P. 1068–1079. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.008>.
16. Li Guoling. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells / Guoling Li, Xianwei Zhang, Cuili Zhong et al. // *Sci. Rep.* — 2017. — V. 7. article number: 8943. DOI: 10.1038/s41598-017-09306-x.
17. Singh P. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications / P. Singh, J. C. Schimenti, E. Bolcun-Filas et al. // *Genetics*. — 2015. — V. 199. — P. 1–15. DOI: 10.1534/genetics.114.169771
18. Song J. RS-1 enhances CRISPR / Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. / J. Song, D. Yang, J. Xu, et al. // *Nature Communications*. — 2016. — V. 7. — article number: 10548. DOI: 10.1038/ncomms10548.
19. Gonen Serap . Potential of gene drives with genome editing to increase genetic gain in livestock breeding programs / Serap Gonen, Janez Jenko, Gregor Gorjanc et al. // *Genetics Selection Evolution*. — 2017. — V. 49. doi: 10.1186/s12711-016-0280-3.
20. Du S. J. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an «all fish» chimeric growth hormone gene construct. / S. J. Du, Z. Y. Gong, G. Fletcher et al. // *Biotechnology*. — 1992. — V. 10. — P. 176–181.
21. Qian L. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-musled phenotype in Meishan pigs / L. Qian, M. Tang, J. Yang, et al. *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5, article number: 14435. DOI:10.1038/srep14435.
22. Proudfoot C. Genome edited sheep and cattle / C. Proudfoot, D. Carlson, R. Huddart. *Transgenic Research*. — 2015. — V. 24. — P. 147–153. DOI: 10.1007/s11248-014-9832-x.
23. Wang K. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR / Cas9 system / K Wang, H. Ouyang, Z. Xie et al. // *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5, article number:16623. DOI: 10.1038/srep16623.
24. Wang K. CRISPR / Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs / K. Wang, Tang Xiaochun, Xie Zicong et al. // *Transgenic Res.* — 2017. — V. 9. — P. 1–7. DOI: 10.1007/s11248-017-0044-z.

25. Crispo M. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR / Cas9 technology and microinjection into zygotes / M. Crispo, A. P. Mulet L. Tesson et al. // PLoS One, 2015 V.10. DOI: 10.1371/journal.pone.0136690 .
26. Lv Q. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR / Cas9 / Q. Lv, L. Yuan, J. Deng // J. Scientific Reports. — 2016. — V. 6, article number: 25029. DOI: 10.1038/srep25029
27. Park K. E. Targeted gene knock-in by CRISPR / Cas ribonucleoproteins in porcine zygotes / K. Park, A. Powell, S. E. Sandmaier // Scientific Reports. — 2017. — V. 7. — article number:42458. DOI: 10.1038/srep42458.
28. Zhang X. Disruption of the sheep BMPR-IB gene by CRISPR / Cas9 in in vitro-produced embryos / X. Zhang , W. Li , Y. Wu // Theriogenology. — 2017. — V. 91. — P. 163-172. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2016.10.025.
29. Bevacqua R. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR / Cas9 system / R. J. Bevacqua, R. Fernandez-Martin, V. Savy // Theriogenology. — 2016. — V. 86. — P. 1886–1896. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.010.
30. Chin-kai Chuang. Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR / Cas9 plasmid vectors / Ching-Fu Tu, Chien-Hong Chen // Animal Biotechnology. — 2017. — V. 28. — P. 178–181. DOI: 10.21769/BioProtoc.2321.
31. Xiaolong Wang. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR / Cas9 system / Xiaolong Wang, Honghao Yu, Yulin Chen // Scientific Reports. — 2015. — V. 5. — article number: 13878. DOI:10.1038/srep13878.
32. Gao, Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects / Y. Gao, H. Wu, Y. Wang, et al. // Genome Biology. — 2017. — V. 18. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>.
33. Lillico S. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing / S. Lillico, C. Proudfoot T. J. King // Scientific Reports. — 2016. — V. 6. article number: 21645. doi:10.1038/srep21645.
34. Whitworth K. M. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. / K. M. Whitworth, R. Rowland R., S. Ewen et.al. // Nature Biotechnology. — 2016. — V. 34. P. 20–22. DOI: 10.1038/s41598-017-13794-2.
35. Burkard C. 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 / C. Burkard, S. Lillico G. E. Reid // PLoS Pathogens. — 2017. — V. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006206>.
36. Wells K. D. Genome-editing technologies to improve research, reproduction, and production in pigs / K. D. Wells, R. S. Prather // Molecular Reproduction and Development. — 2017. — V.84. — P. 1012–1017. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22812>.
37. Javed A. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of beta-lactoglobulin-free, high-casein milk / A. Javed, S. Wagner, J. McCracken et al. // Proc Natl. Acad. Sci. USA. — 2012. — V.109. — P.16811–16816. DOI: 10.1073/pnas.1210057109
38. Liu X. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows / X. Liu, Y. Wang, W. Guo et al. // Nat. Commun. — 2013. — V.4. DOI: 10.1038/ncomms3565
39. Song Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene / Y Song, C. Cui, H. Zhu et.al. // Protein Expression and Purification. — 2015. — V. 112. — P. 1–7. DOI: 10.1016/j.pep.2015.04.004.
40. Oishi I. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR / Cas9 system / I. Oishi, I. K. Yoshii, D. Miyahara et al. // Scientific Reports. — 2016. — V.6. DOI: 10.1038/srep23980.
41. Monzani P. S. Transgenic bovine as bioreactors: challenges and perspectives / P. S. Monzani, P. R. Adona, O. M. Ohashi et.al. // Bioengineered. — 2016. — V. 7. — P. 123–131. DOI: 10.1080/21655979.2016.1171429.
42. Carlson D. F Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines / D. F. Carlson, C. A. Lanco, B. Zang et.al. // Nature Biotechnology. — 2016. — V.34. P. — 479–481. DOI: 10.1038/nbt.3560
43. Flisikowska T. Genetically modified pigs to model human diseases / T. Flisikowska, A. Kind, A. Schnieke // A Journal of Applied Genetics. — 2014. — № 55. — P. 53–64. DOI: 10.1007/s13353-013-0182-9.
44. Bruce A. Genome edited animals: Learning from GM crops? / A. Bruce Transgenic Res. // 2017. V. 26. P. 385–398. DOI: 10.1007/s11248-017-0017-2.
45. Rongxue Peng. Potential pitfalls of CRISPR / Cas9-mediated genome editing / Peng Rongxue, Lin Guigao, Li Jinming // FEBS J. — 2016. — V. 283. — P. 1218–1231 DOI:10.1111/febs.13586.
46. Xu H. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design / H. Xu, T. Xiao, C. H. Chen et al. // Genome Res. — 2015. — V. 25. — P.1147–1157. DOI: 10.1101/gr.191452.115.
47. Moreno-Mateos M. A. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo / M. A. Moreno-Mateos, C. E. Vejnar, J. D. Beaudoin et al. Nat. Methods. — 2015. — V. 12. — P. 982–988. DOI: 10.1038/nmeth.3543.

48. Wang T. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. / T. Wang, J. J. Wei, D. M. Sabatini et al. // Science. — 2014. — V. 343. — P. 80–84. DOI: 10.1126/science.1246981.
49. Pattanayak V. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity / V. Pattanayak, S. Lin, J. P. Guilinger et al. // Nat. Biotechnol. — 2013. — V. 31. — P. 839–843.
50. Raschmanová H. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects / H. Raschmanova, A. Weninger, A. Glieder et al. // Biotechnology Advances. — 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>.
51. Daetwyler H. D. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle / Daetwyler H. D., Capitan A., Pausch H. et al. // Nat. Genet. — 2014. — V. 46. — P. 858–865. doi: 10.1038/ng.3034.
52. Kleinstiver B. P. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells / B. P. Kleinstiver, S. Q. Tsai, M. S. Prew et al. // Nature Biotechnology. — 2016. — V. 34. — P. 869–874. DOI: 10.1038/nbt.3620.
53. Zetsche B. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system / B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh et al. // Cell. — 2015. — V. 163. — P. 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.

Yakovlev A.

The genome editing of agricultural animals (review)

Abstract. *Effective genome editing tools (ZFNs, Talens and (CRISPR / Cas)) have shown their ability to revolutionize molecular biological research with the hopes of applied results promotion. CRISPR / Cas as an evolutionarily acquired immune system of bacteria and archaea that prevents the invasion of viruses or plasmids has been successfully adapted for editing the genome of eukaryotes. CRISPR / Cas systems are currently divided into three main types: I, II and III, of which type II has relatively simple components and is most often used for editing the genome. This technology has been successfully applied to rabbits, pigs, goats, sheep and large cattle with the development of a variety of applications. In particular, editing the genome in farm animals can help improve productive genetic properties, improve various products of animal origin, ensure resistance to disease or minimize harmful effects on the environment. It is important that editing the genome in livestock can be used to increase the frequency of favorable alleles with QTN with great effect. Gene drives or repressions can be used to increase the rate at which the edited alleles spread among livestock populations. Successful promotion of useful alleles in animal breeding programs requires the discovery of loci of quantitative traits through a set of large data sets on the contribution of these loci to the formation of phenotypic traits.*

Key words: genome editing, DNA, RNA, genes, alleles, animals, nuclease, mutations, recombinations.

Author:

A. Yakovlev — Doctor Habil. (Biol. Sci.), prof., head of the department of genetics and biotechnology, Russian Research Institute of farm animal Genetics and breeding-branch of the L. K. ERNST Federal Science Center for animal husbandry, 196601, Russia, St. Petersburg, Pushkin, Moscow Shosse 55a; e-mail: afyakov@mail.ru.

Supported by Federal Agency of Scientific Organizations, № AAAA-A18-118021590138-1

References

1. Geurts A. M., Knockout rats via embryo microinjection of zinc-finger nucleases / A. M. Geurts, G. J. Cost, Y. Freyvert et al. // Science. — 2009. — V. 325. — P. 433. DOI : 10.1126/science.1172447.
2. Tesson L. Knockout rats generated by embryo microinjection of TALENs / L. Tesson, C. Usal, S. Menoret et al. // Nature Biotechnology. — 2011. — V. 29. — P. 695–696. DOI: 10.1038/nbt.1940.
3. Petersen B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species / B. Petersen // Reprod. Domest. Anim. — 2017. — V. 52. — S. 3. — P. 4-13. DOI: 10.1111/rda.13012.
4. Shen B. Generation of gene-modified mice via Cas9 / RNA-mediated gene targeting / B. Shen, J. Zhang, H. Wu // Cell Research. — 2013. — V. 23. — P. 720–723. DOI: 10.1038/cr.2013.46.
5. Wang X. Disruption of FGF5 in cashmere goats using CRISPR / Cas9 results in more secondary hair follicles and longer fibers / X. Wang, B. Cai, J. Zhou et al. // PLoS One, 2016. October 18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164640>.

6. Barrangou R. Crispr provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. / R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau et al. // *Science*. — 2007. — V. 315. — P. 1709–1712. DOI: 10.1126/science.1138140.
7. Iliakis G. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation / G. Iliakis, H. Wang, A.R. Perrault et al. // *Cytogenet. Genome Res.* — 2004. — V. 104. — P. 14–20. DOI: 10.1159/000077461.
8. Gu J. Mechanistic flexibility as a conserved theme across 3 billion years of nonhomologous DNA end-joining. *Genes* / J. Gu, M. R. Lieber // *Dev.* — 2008. — V. 22. — P. 411–415. DOI: 10.1101/gad.1646608).
9. Yudian Ding. Recent Advances in Genome Editing Using CRISPR / Cas9 / Yudian Ding, Hong Li, Ling-Ling Chen // *Front. Plant Sci.* 24 May 2016. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00703>.
10. Moehle E. A. Targeted gene addition into a specified location in the human genome using designed zinc finger nucleases / E. A. Moehle, J. M. Rock, Y. L. Lee, et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. — 2007. — V. 104. — P. 3055–3060. DOI: 10.1073/PNAS.0611478104.
11. Jenko J. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs / J. Jenko, G. Gorjanc, M. A. Cleveland et al. // *Genet. Sel. Evol.* — 2015. — V. 47. — P. 47–55. doi:10.1186/s12711-015-0135-3.
12. Soo-Young Yum. Development of genome engineering technologies in cattle: from random to specific / Soo-Young Yum, Ki-Young Youn, Woo-Jae Choi et al. // *Anim. Sci. Biotechnol.* — 2018. — V. 9. DOI: 10.1186 / s40104-018-0232-6.
13. Lamas-Toranzo I. CRISPR is knocking on barn door *Reprod. Domest. / I Lamas-Toranzo, J Guerrero-Sánchez, H Miralles-Bover* // *Animals*. — 2017. — V. 52. — Issue S4. — P. 39–47. DOI: 10.1111/rda.13047.
14. Shao S. Enhancing CRISPR / Cas9-mediated homology-directed repair in mammalian cells by expressing *Saccharomyces cerevisiae* / S. Shao , C. Ren , Z. Liu et.al. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* — 2017. — V. 18. — P. 43–52. DOI: 10.1016/j.biocel.2017.09.012.
15. Billon P. CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons / P. Billon , E. E. Bryant , S. A. Joseph et al. // *Molecular cells*. — 2017. — V. 67. — P. 1068–1079. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.008>.
16. Li Guoling. Small molecules enhance CRISPR/Cas9-mediated homology-directed genome editing in primary cells / Guoling Li, Xianwei Zhang, Cuili Zhong et al. // *Sci. Rep.* — 2017. — V. 7. article number: 8943. DOI: 10.1038/s41598-017-09306-x.
17. Singh P. A mouse geneticist's practical guide to CRISPR applications / P. Singh, J. C. Schimenti, E. Bolcun-Filas et al. // *Genetics*. — 2015. — V. 199. — P. 1–15. DOI: 10.1534/genetics.114.169771
18. Song J. RS-1 enhances CRISPR / Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency. / J. Song, D. Yang, J. Xu, et al. // *Nature Communications*. — 2016. — V. 7. — article number: 10548. DOI: 10.1038/ncomms10548.
19. Gonen Serap . Potential of gene drives with genome editing to increase genetic gain in livestock breeding programs / Serap Gonen, Janez Jenko, Gregor Gorjanc et al. // *Genetics Selection Evolution*. — 2017. — V. 49. doi: 10.1186/s12711-016-0280-3.
20. Du S. J. Growth enhancement in transgenic Atlantic salmon by the use of an «all fish» chimeric growth hormone gene construct. / S. J. Du, Z. Y. Gong, G. Fletcher et al. // *Biotechnology*. — 1992. — V. 10. — P. 176–181.
21. Qian L. Targeted mutations in myostatin by zinc-finger nucleases result in double-muscling phenotype in Meishan pigs / L. Qian, M. Tang, J. Yang, et al. *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5, article number: 14435. DOI:10.1038/srep14435.
22. Proudfoot C. Genome edited sheep and cattle / C. Proudfoot, D. Carlson, R. Huddart. *Transgenic Research*. — 2015. — V. 24. — P. 147–153. DOI: 10.1007/s11248-014-9832-x.
23. Wang K. Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR / Cas9 system / K. Wang, H. Ouyang, Z. Xie et al. // *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5, article number:16623. DOI: 10.1038/srep16623.
24. Wang K. CRISPR / Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs / K. Wang, Tang Xiaochun, Xie Zicong et al. // *Transgenic Res.* — 2017. — V. 9. — P. 1–7. DOI: 10.1007/s11248-017-0044-z.
25. Crispo M. Efficient generation of myostatin knock-out sheep using CRISPR / Cas9 technology and microinjection into zygotes / M. Crispo, A. P. Mulet L. Tesson et all. // *PLoS One*, 2015 V.10. DOI: 10.1371/journal.pone.0136690 .
26. Lv Q. Efficient generation of myostatin gene mutated rabbit by CRISPR / Cas9 / Q. Lv, L. Yuan, J. Deng // *J. Scientific Reports*. — 2016. — V. 6, article number: 25029. DOI: 10.1038/srep25029
27. Park K. E. Targeted gene knock-in by CRISPR / Cas ribonucleoproteins in porcine zygotes / K. Park, A. Powell, S. E. Sandmaier // *Scientific Reports*. — 2017. — V. 7. — article number:42458. DOI: 10.1038/srep42458.
28. Zhang X. Disruption of the sheep BMPR-IB gene by CRISPR / Cas9 in in vitro-produced embryos / X. Zhang , W. Li , Y. Wu // *Theriogenology*. — 2017. — V. 91. — P. 163-172. DOI: 10.1016 / j.theriogenology.2016.10.025.
29. Bevacqua R. Efficient edition of the bovine PRNP prion gene in somatic cells and IVF embryos using the CRISPR / Cas9 system / R. J. Bevacqua, R. Fernandez-Martin, V. Savy // *Theriogenology*. — 2016. — V. 86. — P. 1886–1896. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.06.010.

30. Chin-kai Chuang. Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR / Cas9 plasmid vectors / Ching-Fu Tu, Chien-Hong Chen // *Animal Biotechnology*. — 2017. — V. 28. — P. 178–181. DOI: 10.21769/BioProtoc.2321.
31. Xiaolong Wang. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR / Cas9 system / Xiaolong Wang, Honghao Yu, Yulin Chen // *Scientific Reports*. — 2015. — V. 5. — article number: 13878. DOI:10.1038/srep13878.
32. Gao, Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects / Y. Gao, H. Wu, Y. Wang, et al. // *Genome Biology*. — 2017. — V. 18. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1144-4>.
33. Lillico S. Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing / S. Lillico, C. Proudfoot T. J. King // *Scientific Reports*. — 2016. — V. 6. article number: 21645. doi:10.1038/srep21645.
34. Whitworth K. M. Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. / K. M. Whitworth, R. Rowland R., S. Ewen et.al. // *Nature Biotechnology*. — 2016. — V. 34. P. 20–22. DOI: 10.1038/s41598-017-13794-2.
35. Burkard C. 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 / C. Burkard, S. Lillico G. E. Reid // *PLoS Pathogens*. — 2017. — V. 13. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006206>.
36. Wells K. D. Genome-editing technologies to improve research, reproduction, and production in pigs / K. D. Wells, R. S. Prather // *Molecular Reproduction and Development*. — 2017. — V.84. — P. 1012–1017. DOI: <https://doi.org/10.1002/mrd.22812>.
37. Javed A. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of beta-lactoglobulin-free, high-casein milk / A. Javed, S. Wagner, J. McCracken et al. // *Proc Natl. Acad. Sci. USA*. — 2012. — V.109. — P.16811–16816. DOI: 10.1073/pnas.1210057109
38. Liu X. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows / X. Liu, Y. Wang, W. Guo et al. // *Nat. Commun*. — 2013. — V.4. DOI: 10.1038/ncomms3565
39. Song Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene / Y Song, C. Cui, H. Zhu et.al. // *Protein Expression and Purification*. — 2015. — V. 112. — P. 1–7. DOI: 10.1016/j.pep.2015.04.004.
40. Oishi I. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR / Cas9 system / I. Oishi, I. K. Yoshii, D. Miyahara et al. // *Scientific Reports*. — 2016. — V.6. DOI: 10.1038/srep23980.
41. Monzani P. S. Transgenic bovine as bioreactors: challenges and perspectives / P. S. Monzani, P. R. Adona, O. M. Ohashi et.al. // *Bioengineered*. — 2016. — V. 7. — P. 123–131. DOI: 10.1080/21655979.2016.1171429.
42. Carlson D. F Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines / D. F. Carlson, C. A. Lanceto, B. Zang et.al. // *Nature Biotechnology*. — 2016. — V.34. P. — 479–481. DOI: 10.1038/nbt.3560
43. Flisikowska T. Genetically modified pigs to model human diseases / T. Flisikowska, A. Kind, A. Schnieke // *A Journal of Applied Genetics*. — 2014. — № 55. — P. 53–64. DOI: 10.1007/s13353-013-0182-9.
44. Bruce A. Genome edited animals: Learning from GM crops? / A. Bruce *Transgenic Res*. // 2017. V. 26. P. 385–398. DOI: 10.1007/s11248-017-0017-2.
45. Rongxue Peng. Potential pitfalls of CRISPR / Cas9-mediated genome editing / Peng Rongxue, Lin Guigao, Li Jinming // *FEBS J*. — 2016. — V. 283. — P. 1218–1231 DOI:10.1111/febs.13586.
46. Xu H. Sequence determinants of improved CRISPR sgRNA design / H. Xu, T. Xiao, C. H. Chen et al. // *Genome Res*. — 2015. — V. 25. — P.1147–1157. DOI: 10.1101/gr.191452.115.
47. Moreno-Mateos M. A. CRISPRscan: designing highly efficient sgRNAs for CRISPR-Cas9 targeting in vivo / M. A. Moreno-Mateos, C. E. Vejnar, J. D. Beaudoin et al. *Nat. Methods*. — 2015. — V. 12. — P. 982–988. DOI: 10.1038/nmeth.3543.
48. Wang T. Genetic screens in human cells using the CRISPR-Cas9 system. / T. Wang, J. J. Wei, D. M. Sabatini et al. // *Science*. — 2014. — V. 343. — P. 80–84. DOI: 10.1126/science.1246981.
49. Pattanayak V. High-throughput profiling of off-target DNA cleavage reveals RNA-programmed Cas9 nuclease specificity / V. Pattanayak, S. Lin, J. P. Guilinger et al. // *Nat. Biotechnol*. — 2013. — V. 31. — P. 839–843.
50. Raschmanová H. Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects / H. Raschmanova, A. Weninger, A. Glieder et al. // *Biotechnology Advances*. — 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>.
51. Daetwyler H. D. Whole-genome sequencing of 234 bulls facilitates mapping of monogenic and complex traits in cattle / Daetwyler H. D., Capitan A., Pausch H. et al. // *Nat. Genet*. — 2014. — V. 46. — P. 858–865. doi: 10.1038/ng.3034.
52. Kleinstiver B. P. Genome-wide specificities of CRISPR-Cas Cpf1 nucleases in human cells / B. P. Kleinstiver, S. Q. Tsai, M. S. Prew et al. // *Nature Biotechnology*. — 2016. — V. 34. — P. 869–874. DOI: 10.1038/nbt.3620.
53. Zetsche B. Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system / B. Zetsche, J. S. Gootenberg, O. O. Abudayyeh et al. // *Cell*. — 2015. — V. 163. — P. 759–771. DOI: 10.1016/j.cell.2015.09.038.