



# **Достижения в редактировании генома крупного и мелкого рогатого скота для коррекции состава молока**

**Езерский В.А., Колоскова Е.М.**

*Всероссийский научно-исследовательский институт  
физиологии, биохимии и питания животных – филиал  
ФГБНУ «Федеральный научный центр животноводства –  
ВИЖ имени академика Л. К. Эрнста».*

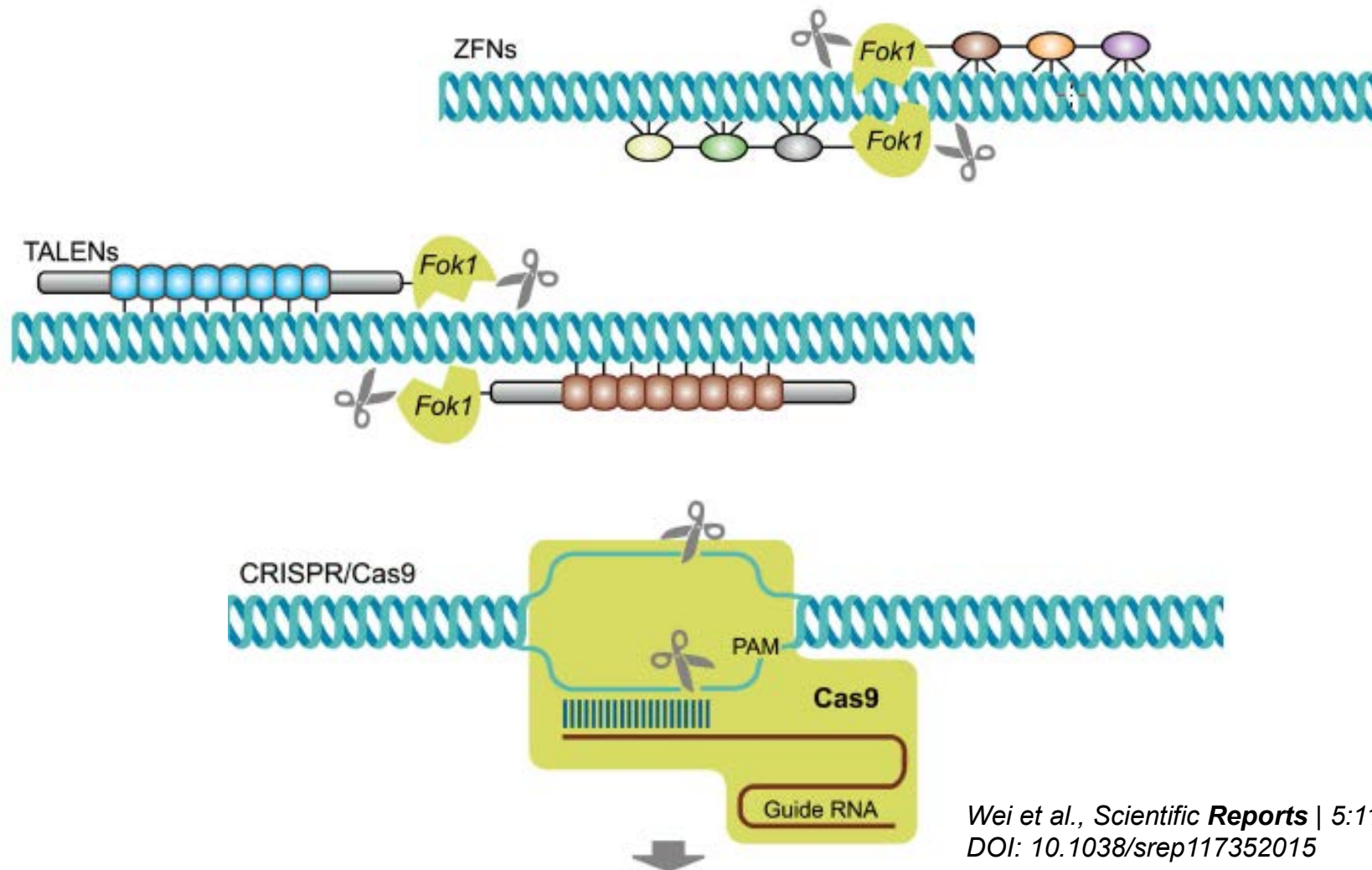


Двухцепочечные разрывы ДНК, индуцируемые ионизирующей радиацией, радиоактивным распадом, ультрафиолетовым излучением, вызывают первичное повреждение ДНК и являются наиболее опасными для клетки повреждениями.

Клеточные системы репарации ДНК распознают и повторно соединяют разорванную ДНК как механизмом **негомологического соединения концов**, так и **гомологичной рекомбинацией** с использованием сестринской хромосомы. В первом случае, как правило, нарушается функция гена с негативным влиянием на организм в целом, во втором повреждение ДНК устраняется без последствий.

Инженерные эндонуклеазы, используемые в новых технологиях редактирования генома, могут обеспечить репарацию ДНК в целевом участке генома, в том числе для эффективного внедрения представляющих интерес генетических вариаций.

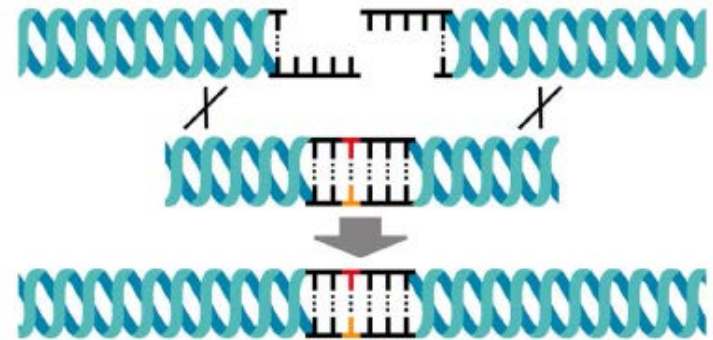
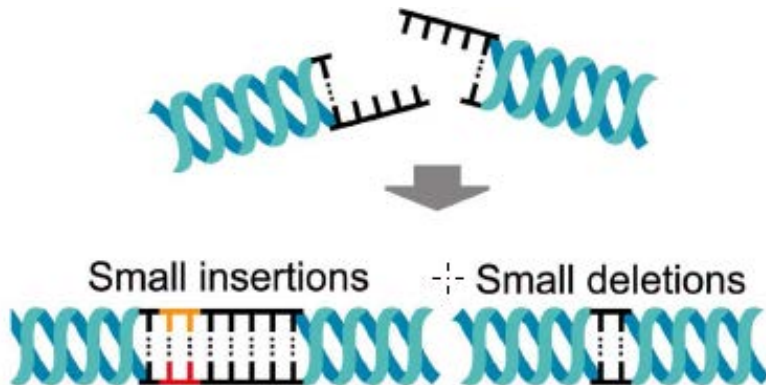
Рисунок 1. Схема работы наиболее часто используемых редакторов генома (ZFNs, TALENs, CRISPR) для введения целевых модификаций в геномы животных.





Non homologous end joining

Homology directed repair



**Трудности**, связанные с редактированием генома домашнего скота:

- сбор и созревание гамет,
- введение реагентов редактирования,
- клонирование и перенос эмбрионов синхронизированным суррогатным матерям.
- мозаичное потомство с последующим разведением для получения ГМ животных - длительный и дорогостоящий процесс.

**Цели редактирования генома:**

- выяснение функции генов и выявление причинно-следственных связей основных продуктивных показателей,
- точное введение полезной генетической модификации в программах разведения поголовья скота с заданными характеристиками:
  - исправление генетических дефектов,
  - инактивация нежелательных генов,
  - перенос полезных аллелей генов между породами.

Редактирование генов может стать полезным инструментом в **эволюции селекции животных** за счет уменьшения интервалов генерации необходимых мутаций в гаметах in vitro

Разведение КРС ведется в трех направлениях – мясное, молочно-мясное и молочное с целью получения продукции нужной категории.

За последние 30 лет были созданы трансгенные коровы для таких целей как

- экспрессия фармацевтических белков,
- увеличение доли бета- и каппа-казеина в молоке,
- повышение устойчивости к болезням,
- увеличение мясной продуктивности.

Коровье молоко - наиболее распространенный пищевой аллерген. Аллергия к молоку выявляется:

17,5 % детей младшего возраста,

13,5 % – детей в возрасте от 5 до 16 лет,

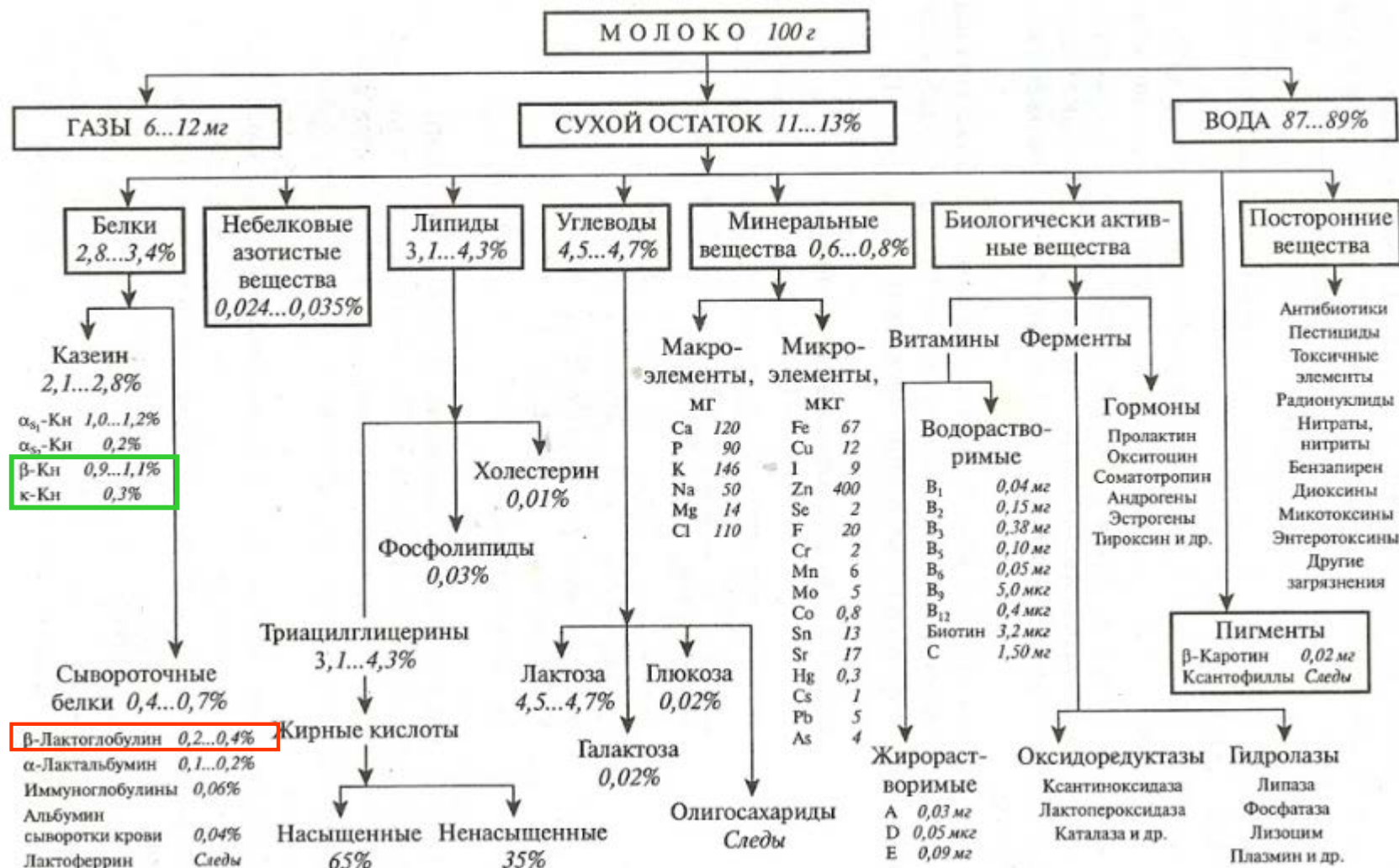
4 % – взрослого населения [*Fiocchi et al.*, 2010].

Сенсибилизация к белкам молока является началом формирования ряда патологических процессов, таких как бронхиальная астма, крапивница, атопический дерматит, дисфункции желудочно-кишечного тракта. Пищевая аллергия в ряде случаев предшествует развитию выраженной пыльцевой аллергии [*Restani et al.*, 2009].

Основной молочный аллерген - белок молочной сыворотки **β-лактоглобулин (БЛГ)**.

Нокаут гена БЛГ с помощью технологий генного редактирования полностью решает проблему создания гипоаллергенных молочных продуктов.

# Химический состав коровьего молока

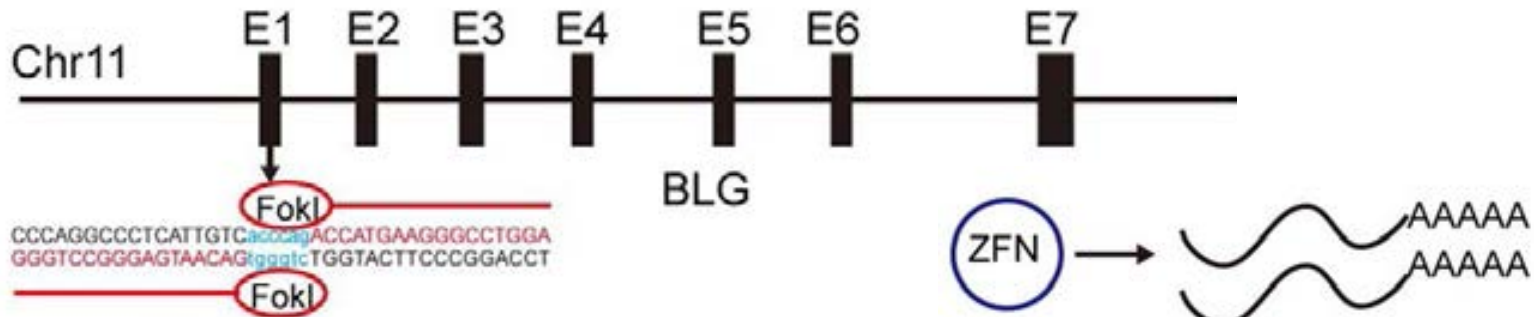


**Таблица 1 – Работы по модификации гена бета-лактоглобулина КРС и коз, завершившиеся получением редактированного потомства**

| Вид  | Тип клеток      | Метод | Модификация/<br>механизм (ДНК матрица                      | Редактор     | Ссылка            |
|------|-----------------|-------|------------------------------------------------------------|--------------|-------------------|
| КРС  | ФФБ, SCNT       | НФ    | KO/ NHEJ                                                   | ZFN          | Yu et al., 2011   |
|      | ФФБ, SCNT       | НФ    | KO/ NHEJ                                                   | ZFN          | Sun et al., 2018  |
|      | зиготы          | ЦПИ   | KO/ HDR ssODN                                              | TALEN        | Wei et al., 2018  |
| Козы | ФФБ, SCNT       | ЭП    | KI, KO/ HDR (ген лактоферрина человека в локус BLG)        | TALEN        | Cui et al., 2015  |
|      | ФФБ, SCNT       | ЭП    | KI, KO/ HDR (ген лактоферрина человека в локус BLG)        | TALEN        | Song et al., 2016 |
|      | УФБ и ФФБ, SCNT | ЭП    | KI, KO/ HDR (ген альфа лактальбумина человека в локус BLG) | TALEN        | Zhu et al., 2016  |
|      | зиготы          | ЦПИ   | KO/ NHEJ                                                   | CRISPR/ Cas9 | Zhou et al., 2017 |

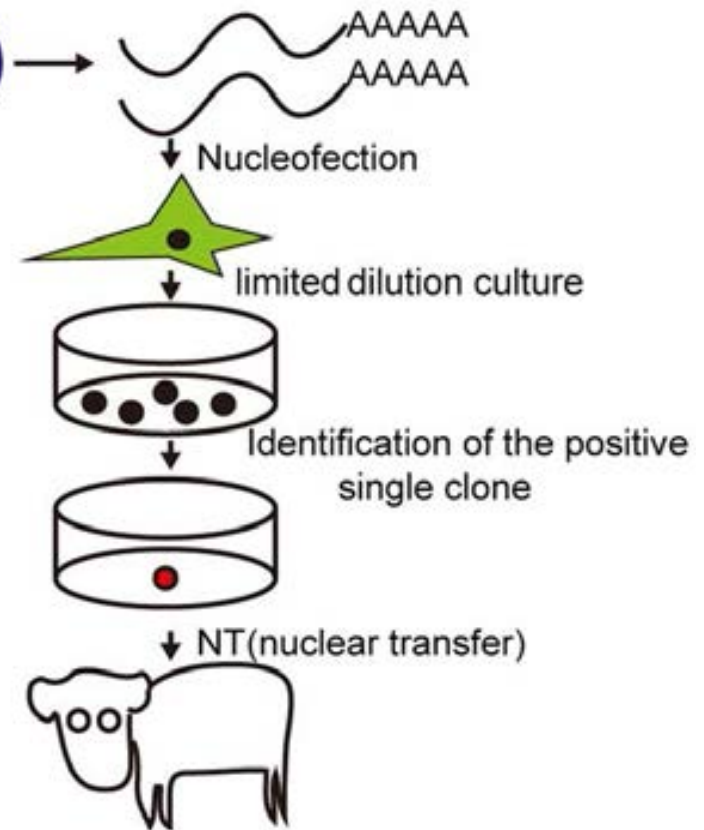
**Примечание.** ФФБ - фетальные фибробласты; УФБ – ушные фибробласты; SCNT (Somatic cell nuclear transfer) - перенос ядра соматической клетки; НФ – нуклеофекция; ЭП – электропорация; ЦПМИ – цитоплазматическая инъекция; NHEJ (non-homologous end joining) – негомологичное соединение концов; HDR (Homology directed repair) – гомологией направленная репарация; ssODN – одноцепочечный олигонуклеотид; KO (knockout) – нокаут; KI (knock-in) – введение генов; ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9 – эндонуклеазные методы редактирования генов.

## Схема ZFN-модификации гена BLG KPC

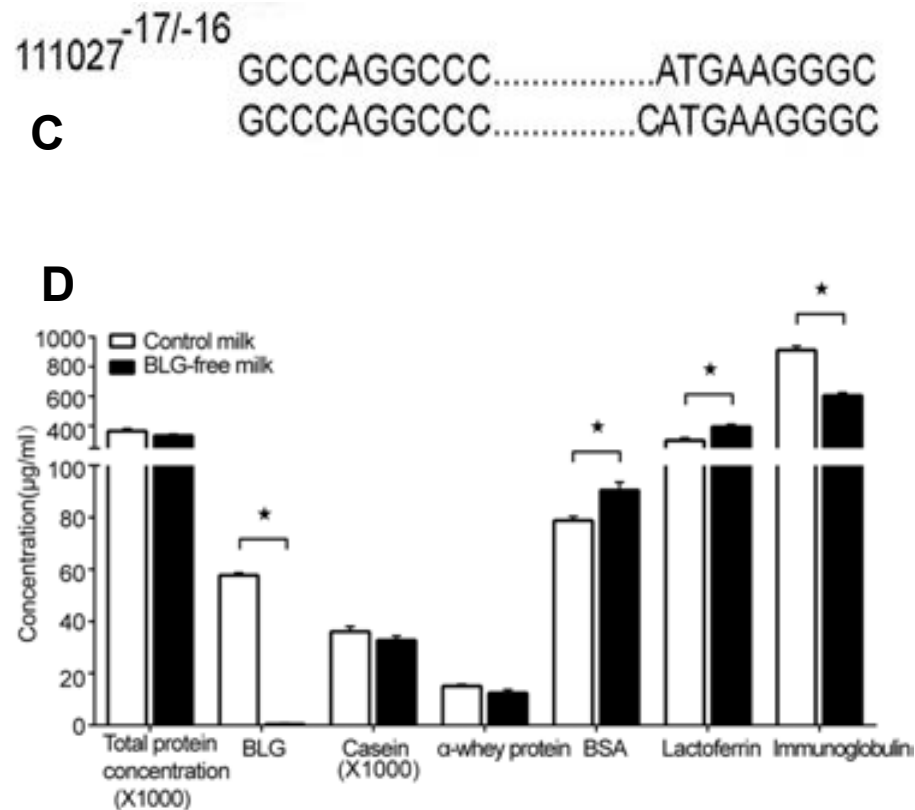
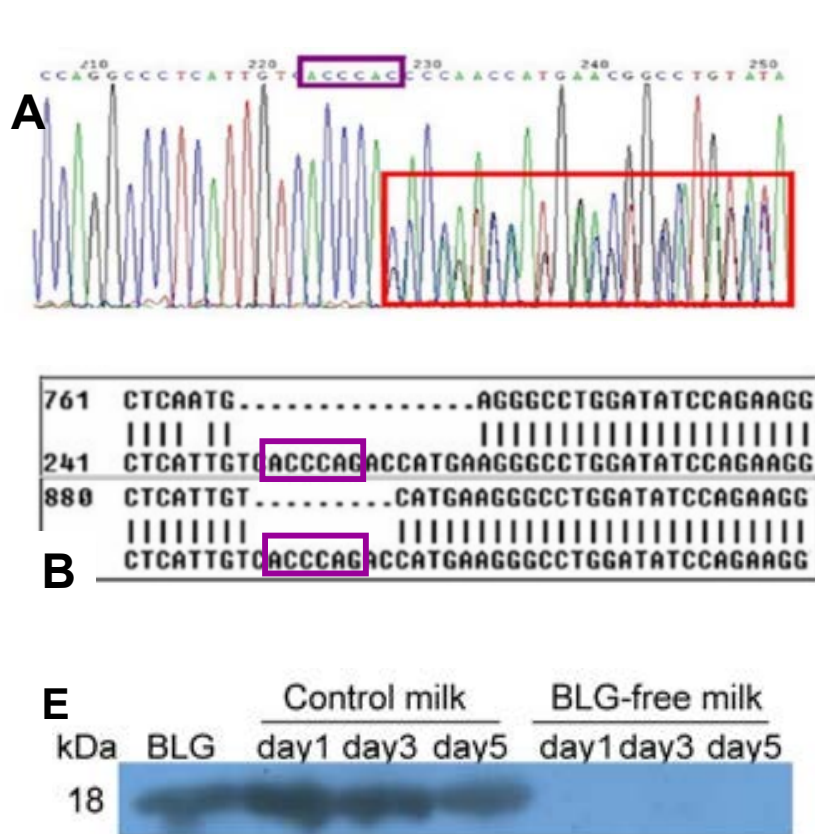


Справа: Методология получения KPC KO-геном с помощью мРНК ZFNs и SCNT.

- Полученный из плазмиды BLG-ZFNs мРНК-транскрипт, *In vitro*.
- Клеточная линия 46-дневных фетальных фибробластов теленка (BFF).
- Клетки BFF трансфицированы мРНК BLG-ZFNs – нуклеофекция.
- Через 24-48 ч разведенную культуру высевали для образования одноклеточных колоний (около 500 клеток/10 см<sup>2</sup>).
- Одноклеточные колонии после культивирования 7-10 дней.
- Скрининг одноклеточных колоний секвенированием.
- Для нуклеотрансфекции и для генерации биаллельного KO BLG KPC выбирали соответствующий клон.



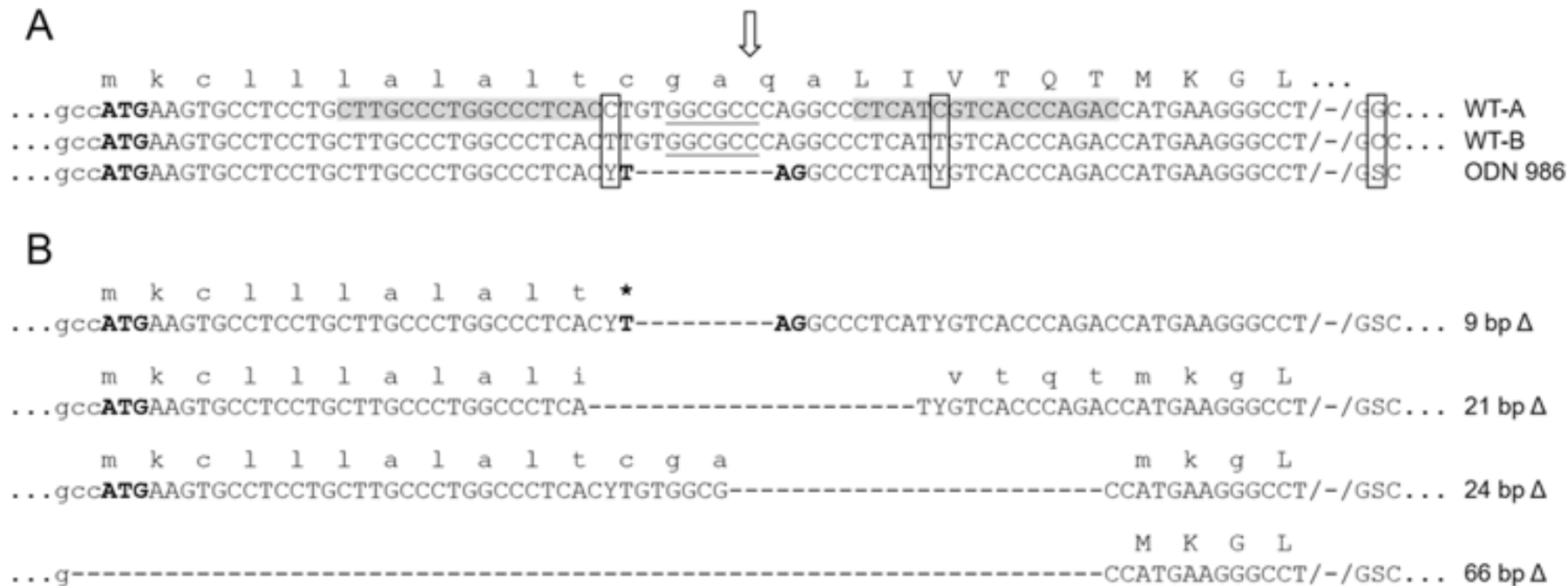
[Yu et al., 2011; Sun et al., 2018]



А) Пример сиквенса ПЦР-амплификата одноклеточной колонии. У мутантной колонии в области мишени ZFNs (выделено фиолетовым) появляются двойные пики (красная рамка). В) сиквенс ДНК клонированного бычка: би-аллельный мутант в локусе BLG – делеции 9 и 15 п.н.. С) сиквенс ДНК клонированной телочки: би-аллельный мутант в локусе BLG – делеции 17 и 16 п.н.. Д) Концентрация основных белков в молоке контрольных животных и в молоке KO BLG коровы. Е) Вестерн-блотт образцов молока.

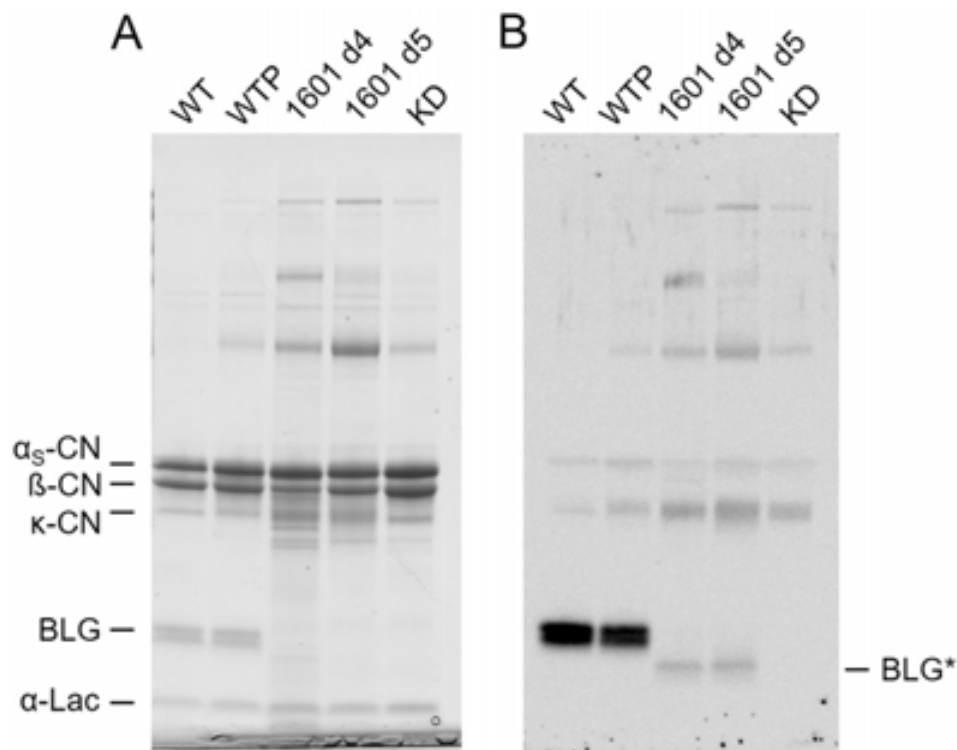
[Yu et al., 2011; Sun et al., 2018]

# TALEN-модификация гена BLG



A) Последовательности гена BLG основных полиморфов: A (WT-A) и B (WT-B) с сайтами связывания TALEN (серые прямоугольники) и местом расщепления (стрелка). Вывороченная HDR-матрица (ODN 986) содержит два Y-и один S-нуклеотид в трех сайтах полиморфизма. Подчеркнут сайт распознавания рестриктазы SfoI. Начало и стоп-кодны выделены жирным шрифтом.

B) Вывороченные последовательности отредактированных аллелей, показывающие конечные точки четырех идентифицированных делеций (9, 21, 24 и 66Δ). Сверху - соответствующие аминокислотные последовательности в однобуквенном коде. Строчными буквами - аминокислоты сигнального пептида, прописными - аминокислоты зрелого белка.



Содержание BLG в молоке КО BLG телочки №1601. А) SDS-ПААГ-электрофорез, окраска Кумасси; В) вестерн-блотт анализ SDS-ПААГразных проб молока. WT – молоко от одной коровы дикого типа; WTP - объединенная проба молока от нескольких коров дикого типа; 1601 d4 и d5: образец молока от 1601 года на четвертый и пятый день индуцированной лактации; KD - молоко трансгенной линии КО BLG КРС. Наблюдаются все основные молочные белки и укороченные формы BLG (BLG\*).

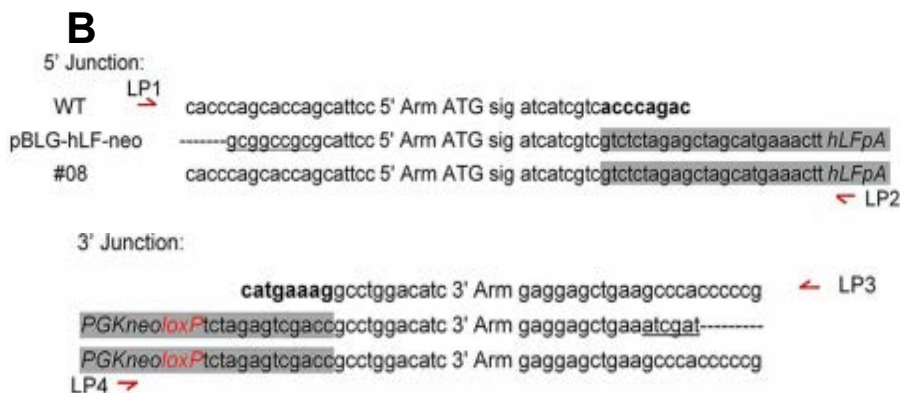
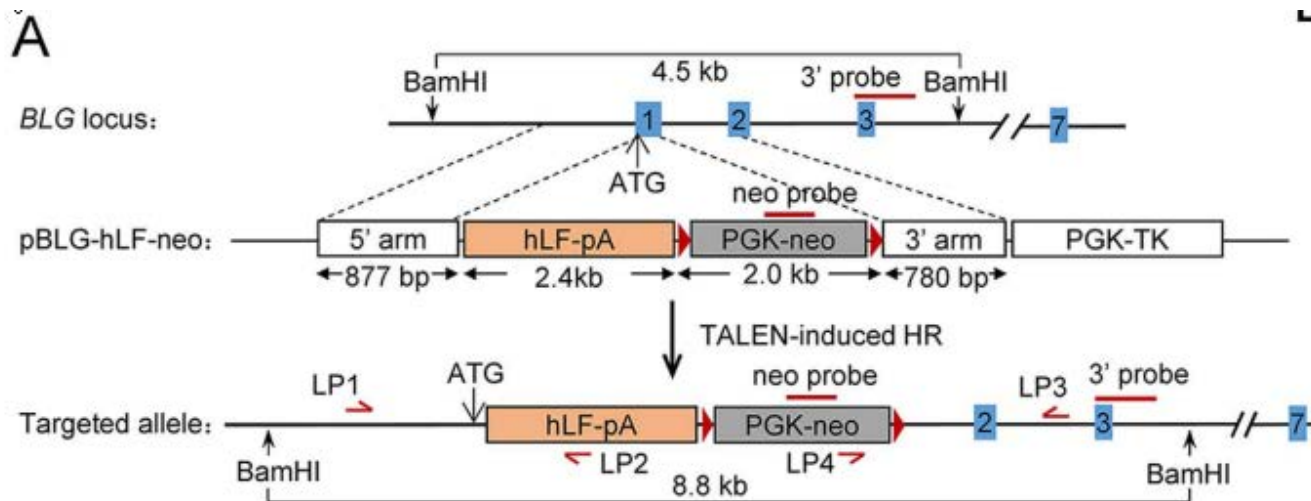
Телочка 1601 в возрасте 19 месяцев, полученная TALEN технологией редактирования, методом цитоплазматической микроинъекции зигот (кроме нее получен бычок 1602).



1601

[Wei J. et al., 2018]

## Целевая интеграция гена hLF в локус гена BLG в фетальных фибробластах козы.



А) ПЦР-анализ для скрининга модификаций с использованием донорной плазмиды pBLG-hLF-neo. Анализ неомицин устойчивых клонов - ПЦР с праймерами LP3 и LP4 (1,9 тпн). Анализ ПЦР-hLF положительных клонов - с праймерами LP1 и LP2 (2,7 тпн).

(В) сравнение последовательностей 5' и 3' соединений между геномной ДНК дикого типа и донорной ДНК (BLG+ / hLF коза #08). Места несовпадений 5' и 3' концов донорной ДНК с геномной ДНК подчеркнуты. 5' и 3' концы кассеты экспрессии (hLF-pA/PGK-Neo) окрашены в серый цвет; участки loxP – красные треугольники. Жирным шрифтом - 16 нуклеотидов гена BLG, замененные hLF-pA/PGK-Neo. "sig" - сигнальная пептидная последовательность гена BLG.

# Получение генно-модифицированных коз (ген BLG) с помощью микроинъекции **CRISPR/Cas9** компонентов

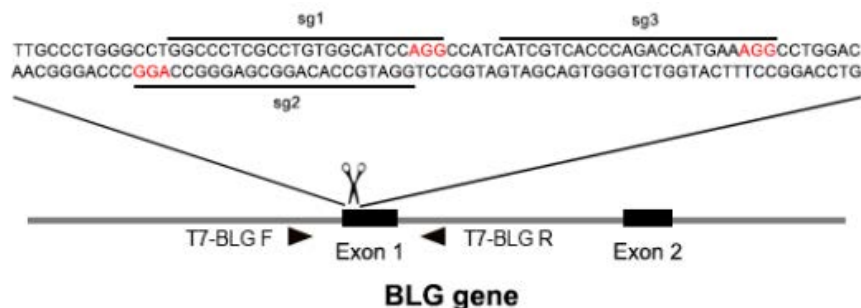
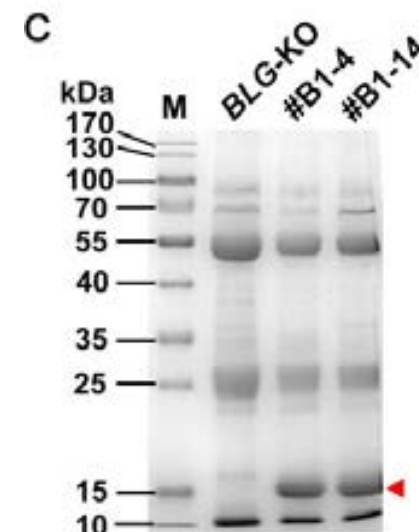
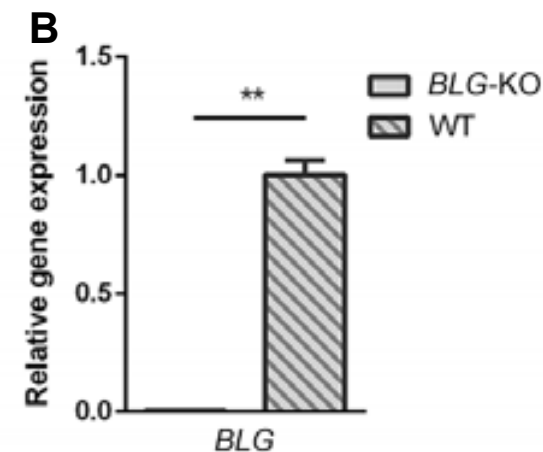
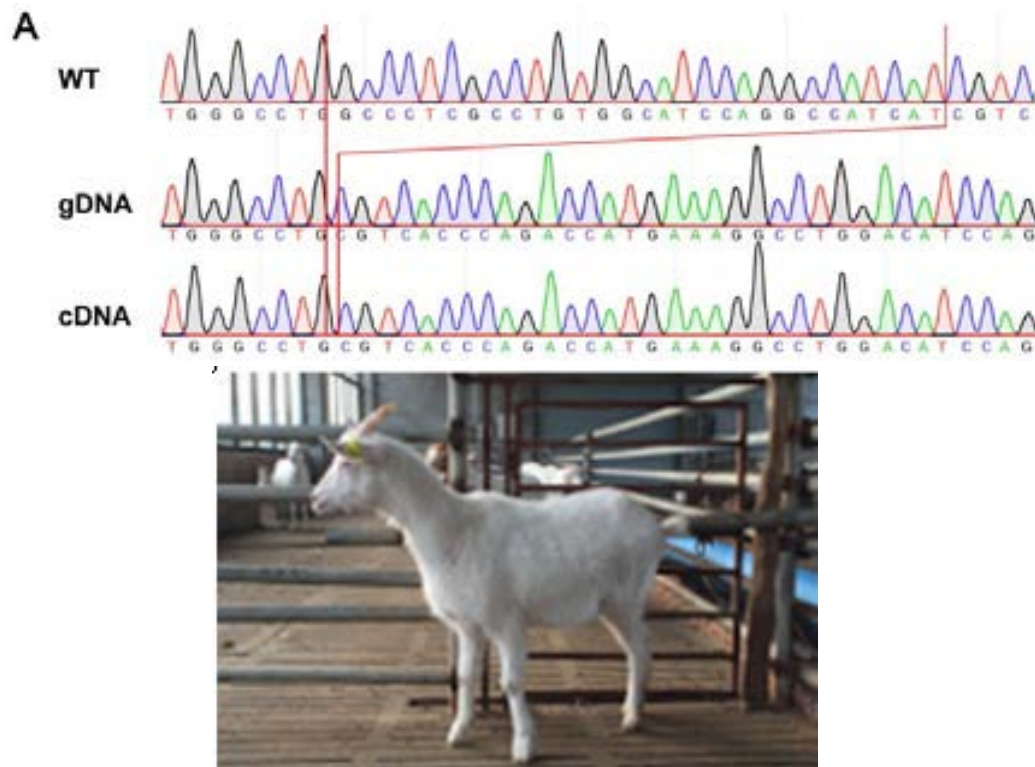


Схема конструкция sgRNA для локуса BLG козы.

| sgRNA(ng/μL)     | Cas9 mRNA (ng/μL) | Injected embryos/<br>Transferred embryos | Recipients/ Pregnancies | Newborns | Targeted (%) |
|------------------|-------------------|------------------------------------------|-------------------------|----------|--------------|
| sg1(10)          | 20                | 36/27                                    | 10/5                    | 8        | 1 (12.5%)    |
| sg2(10)          |                   | 48/29                                    | 10/5                    | 7        | 0 (0%)       |
| sg2+sg3 (25+25)  | 100               | 59/15                                    | 15/3                    | 4        | 1 (25.0%)    |
| sg2+sg3* (50+50) | 200               | 50/32                                    | 32/5                    | 7        | 2 (28.6%)    |

## Результаты секвенирования BLG-модифицированных козлят

|                                  |                       |                                                                                                                                                 |                                         |
|----------------------------------|-----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|
| Cas9: 20ng/μL<br>sgRNA: 10ng/μL  | #B1-2<br><b>ВЫЖИЛ</b> | GCCCTGGGCCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA<br>GCCCTGGGCCTG-----CGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA                            | WT<br>-29bp, 12/12                      |
| Cas9: 100ng/μL<br>sgRNA: 25ng/μL | #B2-10                | GCCCTGGGCCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA<br>GCCCTGGGCCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCA-----GCCTGGA<br>GG CCACCACCCTC     | WT<br>+2bp, -24bp, +11bp, 4/12          |
| Cas9: 200ng/μL<br>sgRNA: 50ng/μL | #B2-4                 | GCCCTGGGCCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA<br>-----TGTTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA<br>GC-----<br>TTG | WT<br>-49bp, 4/13<br>-138bp, +3bp, 2/13 |
|                                  | #B2-6                 | GCCCTGGGCCTGGCCCTCGCCTGTGGCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA<br>GCCCTGGCCTG-----TGTCATCCAGGCCATCATCGTCACCCAGACCATGAAAGGCCTGGA           | WT<br>-11bp, 2PM, 5/15                  |



### Анализ генотипа и экспрессии BLG в молоке и молочной железе.

А) сравнение целевой области gDNA в молочных железах коз BLG KO (#B1-2) и WT, а также кДНК BLG KO. Красные линии указывают на делецию 29 пн в локусе BLG.

В) анализ экспрессии BLG при индуцированной лактации.

С) анализ сывороточного белка из гормонально индуцированного козьего молока. Красный треугольник - WT BLG.

## Цель наших исследований:

Создать генетическую конструкцию, содержащую ген GFP под CMV промотором для интеграции гомологичной рекомбинацией в локус **гена BLG KPC** при совместной микроинъекции с сайт-специфичными компонентами системы CRISPR/Cas9.

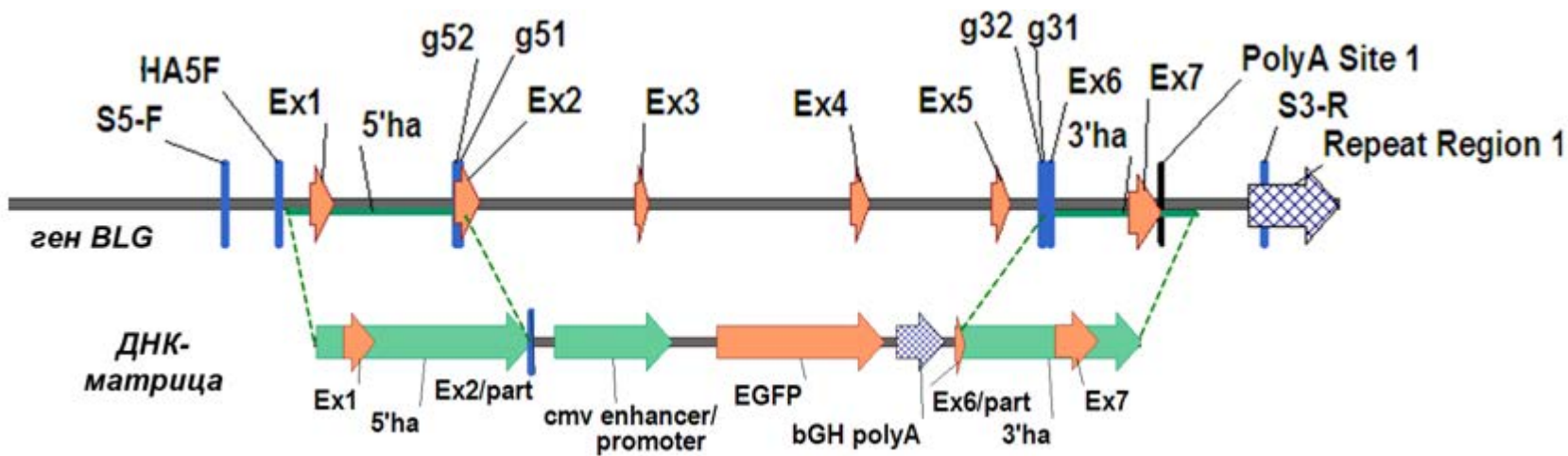


Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции BLGcmvEGFP с геном BLG в результате работы CRISPR/Cas9 системы. Показаны: g51, g52, g31, g32 – мишени для gRNAs; плечи гомологии 5'ha и 3'ha; структурные элементы гена и конструкции; праймеры.

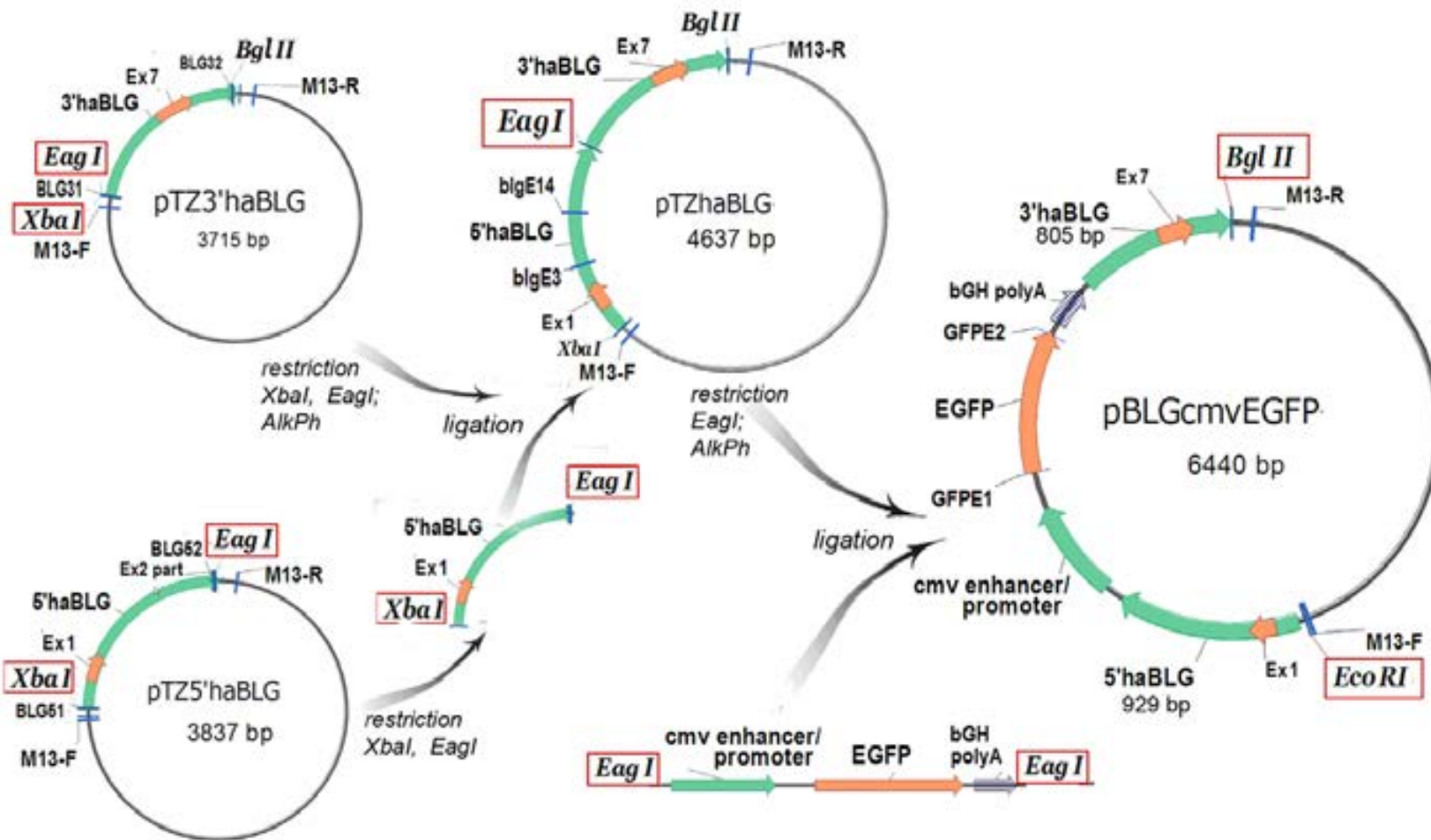


Схема получения плазмид pTZHABLG и pBLGcmvEGFP, содержащих 5' и 3' плечи гомологии к гену BLG *rbWAP*. Указаны основные сайты рестрикции (в рамках) и связывания используемых праймеров.

**ПЦР-анализ модификаций гена *BLG*, полученных с использованием компонентов *CRISPR/Cas9* системы и *HDR*-матрицы**

| A pair of primers | Amplification product size, bp |                                              | Detection             |
|-------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|-----------------------|
|                   | WT animal                      | Genetically modified animal                  |                       |
| <b>T5L / T5R</b>  | 490                            | < 490 ( $\Delta$ G51/G52)                    | Small deletions, PAAG |
| <b>T3L / T3R</b>  | 397                            | < 397 ( $\Delta$ G31/G33)                    |                       |
| <b>T5L / T3R</b>  | 3598                           | $\approx$ 320 for $\Delta$ G51(G52)/G31(G32) |                       |
| <b>HA5F/ HA3R</b> | 3621                           | $\approx$ 350 for $\Delta$ G51(G52)/G31(G32) |                       |
| <b>HA5F /HA5R</b> | -                              | 1179 (5'HA for HDR )                         | Large deletions, AG   |
| <b>HA3F/ HA3R</b> | -                              | 972 (3'HA for HDR)                           |                       |

## Результаты

1. Разработана стратегия модификации гена  $\beta LG$  КРС с использованием технологии CRISPR/Cas9 для нокаута выбранных генов и сайт-специфической интеграции гена маркерного белка.
2. Разработана стратегия анализа возможных генетических модификаций эмбрионов, возникших в результате работы микроинъектированных компонентов системы CRISPR/Cas9 и ГИК (NHEJ, HDR).

Получены генетические конструкции:

- **$\beta LG_{cmv}EGFP$**  для направленной интеграции рекомбинантного гена EGFP под контролем CMV промотора в геном КРС под контроль промотора гена бета-лактоглобулина ( $\beta LG$ ).
- компоненты системы CRISPR/Cas9 **в плазмидной форме** на основе рХ330, кодирующей Cas9 и гРНК для гена  $\beta LG$  КРС (по две плазмиды к 5'- и 3'- областям фрагментов гена  $\beta LG$  КРС. На основе этих плазмид могут быть созданы компоненты CRISPR/Cas9 в РНК форме.

## Цитированная литература

1. *Fiocchi A., Brozek J., Schunemann H. et al. World Allergy Organization (WAO) diagnosis and rationale for action against cow's milk allergy (DRACMA) guidelines // Pediatr. Allergy Immunol. – 2010 Suppl. 21 – P. 57–161.*
2. *Restani P., Ballabio C., Di Lorenzo C. et al. Molecular aspects of milk allergens and their role in clinical events // Anal. Bioanal. Chem. – 2009 Vol. 395 – P. 47–56.*
3. *Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // Cell Res. 2011. Vol.21. P.1638-1164. doi:10.1038/cr.2011.153*
4. *Sun Z., Wang M., Han S., Ma S., Zou Z., Ding F., Li X., Li L., Tang B., Wang H., Li N., Che H., Dai Y. Production of hypoallergenic milk from DNA-free beta-lactoglobulin (BLG) gene knockout cow using zinc-finger nucleases mRNA // Sci. Rep. 2018. Vol.18. No.8 (1):15430. doi: 10.1038/s41598-018-32024-x.*
5. *Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin // Sci. Rep. 2018. Vol.8. P.7661. doi:10.1038/s41598-018-25654-8*
6. *Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu H., Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of  $\beta$ -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk // Sci.Rep. 2015. Vol.5. P.10482. doi:10.1038/srep10482*
7. *Song S., Zhu M., Yuan Y., Rong Y., Xu S., Chen S., Mei J., Cheng, Y. [BLG gene knockout and hLF gene knock-in at BLG locus in goat by TALENs]. Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao. 2016. Vol.32. P.329-338. [in Chinese]*
8. *Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human  $\alpha$ -lactalbumin gene insertion into the goat  $\beta$ -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination// PLoS ONE. 2016. Vol.11. e0156636. doi:10.1371/journal.pone.0156636*
9. *Zhou W., Wan Y., Guo R., Deng M., Deng K., Wang Z., Zhang Y., Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9 // PLoS One. 2017. Vol.12. No.10. e0186056. DOI: 10.1371 / journal.pone.0186056*

- 
- Спасаю
  - за внимание!