

ПОДХОДЫ К РЕДАКТИРОВАНИЮ ГЕНОМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Донник И.М., Макутина В.А., Кривоногова А.С., (✉)Исаева А.Г., Дейкин А.В., Кощаев А.Г.

Уральский федеральный аграрный научно-исследовательский центр

Уральского отделения Российской академии наук

Екатеринбург, Россия

(✉)e-mail: isaeva.05@bk.ru

Представлены результаты исследования генетических методов создания сельскохозяйственных животных с улучшенными характеристиками. В настоящее время получено значительное количество животных с отредактированным геномом. Методы модификации генома у крупного рогатого скота (КРС) постоянно совершенствуются. Изучены подходы генного редактирования эмбрионов крупного рогатого скота, доставки отредактированных конструкций, повышения выживаемости эмбрионов после внесения систем редактирования. Исследования проводили на эмбрионах КРС. Разработаны и апробированы системы редактирования генов BLG и СД209. Изучены варианты доставки системы редактирования в клетки КРС: микроинъекция в зиготу плазмидной ДНК с закодированной последовательностью с CRISPR/Cas9 с sgRNA, способ вирусных векторов (аденоассоциированные вирусы AAV, серотипы AAV1, AAV2, AAV6, AAV9, AAVDJ), совместное введение плазмидной ДНК и сперматозоида в ооцит на стадии МII, а также микроинъекции РНК Cas9 и гидовых РНК. Исследованы и усовершенствованы различные методики выполнения микроинъекций и опробованы различные варианты приготовления смеси РНК Cas9 и гидовых РНК. На основе полученных результатов оптимизирован протокол выполнения микроинъекции системы редактирования и проведен модельный эксперимент на 160 ооцитах, по 80 клеток на каждую конструкцию. В результате установили, что эффективность редактирования в целом повысилась. При инъекции гидовой РНК против гена BLG и мРНК spCas9 дробление начали 84% выживших клеток, бластуляция составила 20%, оказались с нокаутом по BLG – 69,2%. При инъекции против гена CD209 и мРНК spCas9 дробление начали 44,4% выживших эмбрионов, бластуляция составила 16,7%, с нокаутом по CD209 – 44,4%. Новизна работы заключается в получении данных о разработке систем редактирования с определенными генами-мишениями, в усовершенствовании системы доставки и культивирования эмбрионов КРС.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, доставка систем редактирования, вирусный вектор, микроинъекции РНК, доимплантационные эмбрионы КРС

APPROACHES TO GENOME EDITING IN AGRICULTURAL ANIMALS

Donnik I.M., Makutina V.A., Krivonogova A.S., (✉)Isaeva A.G., Deikin A.V., Kostschaev A.G.

Ural Federal Agrarian Scientific Research Centre, Ural Branch of the Russian Academy of Sciences

Ekaterinburg, Russia

(✉)e-mail: isaeva.05@bk.ru

The results of research into genetic methods of breeding agricultural animals with improved characteristics are presented. By now a significant number of animals with an edited genome have been selected. Methods of genome modification in cattle are constantly improving. The approaches of gene editing of bovine embryos, delivery of edited constructs and improvement of embryo survival after introduction of editing systems have been studied. The studies were performed on cattle embryos. BLG and SD209 gene editing systems were developed and validated. Delivery options of the editing system into cattle cells were studied: microinjection into the zygote of plasmid DNA encoded sequence with CRISPR/Cas9 c sgRNA, the method of viral vectors (adeno-associated AAV viruses, serotypes AAV1, AAV2, AAV6, AAV9, AAVDJ), co-injection of plasmid DNA and sperm into the oocyte at the MII stage, and microinjection of Cas9 and guide RNAs. Different techniques for performing microinjections have been investigated and refined, and different preparation of Cas9 RNA and guide RNA mixtures have been tested. Based on these results, the protocol for performing microinjection of the

editing system was optimized and a model experiment was performed on 160 oocytes, with 80 cells per each construction. The findings have shown that the efficiency of editing has generally improved. When injected with guide RNA against BLG gene and spCas9 mRNA, 84% of the surviving cells initiated cleavage, blastulation was 20%, and BLG knockout was 69.2%. When injected against the CD209 gene and spCas9 mRNA, 44.4% of the surviving embryos started cleavage, blastulation was 16.7%, with CD209 knockout at 44.4%. The novelty of the work lies in obtaining data on the development of editing systems with specific target genes, in improving the delivery system and cultivation of bovine embryos.

Keywords: CRISPR/Cas9, delivery of editing systems, virus vector, microinjections of RNA, pre-implantation bovine embryos

Для цитирования: Донник И.М., Макутина В.А., Кривоногова А.С., Исаева А.Г., Дейкин А.В., Кощаев А.Г. Подходы к редактированию генома сельскохозяйственных животных // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. Т. 53. № 9. С. 101–110. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-9-12>

For citation: Donnik I.M., Makutina V.A., Krivonogova A.S., Isaeva A.G., Deykin A.V., Kostschaev A.G. Approaches to genome editing in agricultural animals. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki = Siberian Herald of Agricultural Science*, 2023, vol. 53, no. 9, pp. 101–110. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-9-12>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Благодарность

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 19-76-10022).

Acknowledgements

The research was supported by the Russian Science Foundation Grant (project № 19-76-10022).

ВВЕДЕНИЕ

Методы редактирования генов позволяют вносить точные и заданные модификации в геном домашнего скота. Редактирование генома у коз и свиней в настоящее время достаточно эффективно производится с использованием SCNT (перенос ядра соматической клетки) через CRISPR/Cas9-отредактированные клетки [1, 2]. Эффективность геномного редактирования при этом около 60% [1, 3]. У мышей, обезьян, собак и кроликов чаще используется другой метод, заключающийся в прямой инъекции системы редактирования в цитоплазму эмбрионов на стадии одноклеточной зиготы [4, 5]. Показано, что введение конструкций CRISPR/Cas9 непосредственно в зиготы может приводить к получению потомства с заданными признаками. Однако серьезной проблемой при использовании та-

кого подхода является генетический мозаицизм, возникающий у потомства [6]. Одним из предлагаемых способов устранения мозаичизма является раннее введение системы CRISPR/Cas9 на стадии метафазы II ооцита или на стадии ранней зиготы сразу после формирования пронуклеусов [7].

Сообщалось об эффективной микроинъекции генов гормона роста и инсулиноподобного фактора роста I в зиготы свиней. Позже две линии трансгенных свиней, экспрессирующих гормон роста, набрали на 11,1 и 13,7% больше массы, чем контрольные свиньи^{1,2}.

Также целью исследований является ген белка миостатина. Обнаружено, что снижение экспрессии гена миостатина (также известного как GDF8 или фактор дифференцировки роста 8) приводит к усилению роста мышц. Даже одноклеточные по-

¹Pursel V.G., Bolt D.J., Miller K.F., Pinkert C.A., Hammer R.E., Palmiter R.D., Brinster R.L. Expression of Growth Hormone Transgenes in Swine. J. Reprod. Fertil. 1990. Vol. 40. P. 235–245.

²Pursel V.G., Wall R.J., Mitchell A.D., Elsasser T.H., Solomon M.B., Coleman M.E., DeMayo F., Schwartz R.J. Transgenic Animals in Agriculture. U.S. Department of Agriculture; Washington, DC, USA. Expression of insulin-like growth factor-I in skeletal muscle of transgenic swine. 1999.

лимorfизмы в гене миостатина запускают значительные изменения³. В настоящее время получено большое количество животных с отредактированным геномом, в том числе свиньи с отредактированным геном MSTN (миостатина), свиньи с отредактированным геном анти-PRRS (репродуктивно-респираторным синдромом свиней) и устойчивы к туберкулезу трансгенный крупный рогатый скот⁴⁻⁶. Эти генетически модифицированные/ отредактированные сельскохозяйственные животные продемонстрировали улучшение в наборе веса или устойчивости к болезням и другие полезные качества.

Методы модификации генома (особенно ZFN и TALEN) у КРС постоянно совершенствуются⁷. Технология TALEN использовалась, например, для вставки гена SP110 в геном КРС, в результате чего был получен трансгенный скот, устойчивый к туберкулезу⁸.

Кроме того, с использованием подходов ZFN и TALEN изменен с хорошей эффективностью ген β-лактоглобулина (LGB) у эмбрионов крупного рогатого скота⁹. С использованием TALEN был создан крупный рогатый скот с нокаутом гена MSTN. TALEN также использовали для элиминации аллели POLLED у голштинского скота и получения безрогого молочного скота¹⁰.

Значительная доля работ по модификации генома выполнена на культурах клеток, в частности, включение NRAMP1 с помощью CRISPR/Cas9 в фибробласты плода для создания устойчивого к туберкулезу генетически модифицированного крупного рогатого скота¹¹. В другом исследовании выполнен нокаут гена PRNP, который кодирует инфекционный белок PrPSc, вызывающий заболевания у КРС и человека (губчатая энцефалопатия КРС, болезнь Крейтцфельдта-Якоба и хроническое истощение у оленей) в фибробластах плода и в ранних эмбрионах. При бруцеллезе проведена трансдукция инфицированных клеток лентивирусными векторами, содержащими систему редактирования генов CRISPR/Cas9, для инактивации гена, участвующего в репликации бруцелл в клетках-хозяевах, получено достоверное повышение устойчивости клеток культуры к инфицированию бруцеллезом¹² [8].

В настоящее время достигнут значительный прогресс в методологии редактирования генома с использованием ДНК-нуклеаз. Существует четыре основных типа технологий на основе запрограммированных нуклеаз: мегануклеазы, нуклеазы «цинковые пальцы» (ZFN), эндонуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN), и кластеризованные

³Grobet L., Martin L.J.R., Poncelet D., Pirottin D., Brouwers B., Riquet J., Schoeberlein A., Dunner S., Ménis-sier F., Massabanda J. et al. A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscled phenotype in cattle // Nat. Genet. 1997. Vol. 17. P. 71–74. DOI: 10.1038/ng0997-71.

⁴Burkard C., Lillico S.G., Reid E., Jackson B., Mileham A.J., Ait-Ali T., Whitelaw C.B.A., Archibald A.L. Pre-cision 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 Pathog. 2017. Vol. 13. P. e1006206. DOI: 10.1371/journal.ppat.1006206.

⁵Gao Y., Wu H., Wang Y., Liu X., Chen L., Li Q., Cui C., Liu X., Zhang J., Zhang Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. Genome Biol. 2017. Vol. 18. P. 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.

⁶Wang K., Ouyang H., Xie Z., Yao C., Guo N., Li M., Jiao H., Pang D. Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System. Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 1–11. DOI: 10.1038/srep16623.

⁷Liu Z., Foot R.H. Development of bovine embryos in KSMO with added superoxide dismutase and taurine and with five and twenty percent O2. Biol Reprod. 1995. Vol. 56. P. 786–790.

⁸Wu Y., Zhou H., Fan X. et al. Correction of a genetic disease by CRISPR-Cas9-mediated gene editing in mouse spermatogonial stem cells // Cell Res. 2015. Vol. 25. P. 67–79.

⁹Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 1–12. DOI: 10.1038/srep11735.

¹⁰Carlson D.F., Lancto C.A., Zang B., Kim E., Walton M., Oldeschulte D., Seabury C., Sonstegard T.S., Fahrenkrug S.C. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. Nat. Biotechnol. 2016. Vol. 34. P. 479–481.

¹¹Gao Y., Wu H., Wang Y., Liu X., Chen L., Li Q., Cui C., Liu X., Zhang J., Zhang Y. Single Cas9 nickase induced generation of NRAMP1 knockin cattle with reduced off-target effects. Genome Biol. 2017. Vol. 18. P. 13. DOI: 10.1186/s13059-016-1144-4.

¹²Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., Zhang Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to β-casein locus using zinc-finger nucleases // Proc. Biol. Sci. 2014. Vol. 281. P. 2013368.

регулярно расположенные короткие палиндромные повторы Cas9 (CRISPR/Cas9). Эти инструменты редактирования генома способны точно разрезать ДНК в заданной последовательности нуклеотидов¹³.

Система CRISPR/Cas9 наиболее привлекательна для использования в первую очередь потому, что она является относительно простым, эффективным и экономически наиболее дешевым методом редактирования генома. Поэтому использование технологии CRISPR/Cas9 сделало генное редактирование сельскохозяйственных животных более доступным, приблизило его к применению в практическом животноводстве.

Однако некоторые эксперты утверждают, что изменение геномов сельскохозяйственных животных для повышения эффективности производства может привести к вторичным последствиям. Так, ускоренный рост мышц при мутации гена миостатина может привести к большему количеству кесаревых сечений, патологиям конечностей и дыхательной системы¹⁴. Наконец, редактирование генома методом переноса ядра соматической клетки может негативно сказаться на благополучии животных: увеличении эмбриональной гибели, постнатальной смертности и врожденных нарушений [9]. Кроме того, редактирование генома может привести к нецелевым мутациям или непредвиденным последствиям, которые будут накапливаться и проявляться в последующих поколениях¹⁵. Однако учитывая многочисленные преимущества технологии, редактирование генома с помощью CRISPR возможно использовать для улучшения пород сельскохозяйственных животных. Изучение и совершенствование любой новой технологии требует времени, но технология CRISPR уже зарекомендовала себя как эффективный исследовательский

инструмент научной деятельности, требующий дальнейшего совершенствования, особенно у продуктивных животных.

Для осуществления доставки системы CRISPR/Cas9 в клетку применяются трансфекция разными способами, трансдукция с помощью вирусов, постоянно изучаются и используются в экспериментальных работах сочетания и модификации различных методов. Для эффективного редактирования генов белковые комплексы CRISPR/Cas9 должны пересекать как клеточную, так и ядерную мембранны. Доставка системы CRISPR/Cas9 внутрь эукариотической клетки может осуществляться посредством вирусных или невирусных векторов и физических манипуляций. Наиболее распространенными методами физической доставки являются трансфекция липосомами и микрочастицами, микроинъекция и электропорация, другие способы: гидродинамическая доставка, генная пушка, импальфекция – в настоящее время активно изучаются и совершенствуются на стадии изучения.

Микроинъекция считается «золотым стандартом» для введения компонентов CRISPR в клетки. Она лучше всего подходит для работы *in vitro* с эмбрионами или культурами клеток. Существует три основных метода микроинъекции: введение ДНК непосредственно в ядро клетки, введение в ядро молекул мРНК, транскрибированных *in vitro*, и введение мРНК в цитоплазму. Эти различные методы имеют преимущества и недостатки (в том числе значительные нецелевые эффекты)¹⁶. Несмотря на травматичность микроинъекций, в ряде случаев с их помощью удалось добиться высокой эффективности редактирования, например одновременного нокаута четырех генов с помощью одной инъекции в зиготы крыс¹⁷. За небольшими исключениями микроинъекция компонентов

¹³Cox D.B.T., Platt R.J., Zhang F. Therapeutic genome editing: prospects and challenges. *Nature Medicine*, 2015. Vol. 21 (2). P. 121–131.

¹⁴Schultz-Bergin M. Is CRISPR an ethical game changer. *J. Agric. Environ. Ethics*, 2018. Vol. 31. P. 219. DOI: 10.1007/s10806-018-9721-z.

¹⁵Rodriguez E. Ethical issues in genome editing for non-human organisms using CRISPR/Cas9 system. *J. Clin. Res. Bioeth.*, 2017. Vol. 8. P. 10. DOI: 10.4172/2155-9627.1000300.

¹⁶URL: <https://gmf.fas.harvard.edu/talen-or-crispr-microinjection>.

¹⁷Ma Y, Shen B, Zhang X, et al. Heritable multiplex genetic engineering in rats using CRISPR/Cas9 // *PLoS One*. 2014. Vol. 9. P. e89413.

РНК CRISPR/Cas9 в клетки приводит к конечной продолжительности действия системы редактирования из-за естественного распада мРНК внутри эукариотических клеток. Микроинъекция является хорошо зарекомендовавшей себя технологией, и ее использование широко распространено [10].

Одним из физических методов доставки генов в популяцию клеток является электропорация. В этом методе используются импульсные электрические токи высокого напряжения для временного открытия пор нанометрового размера в клеточной мембране клеток, взвешенных в буфере, что позволяет компонентам диаметром в десятки нанометров проникать в клетку¹⁸.

Разработан способ доставки системы редактирования с помощью аденоассоциированного вируса (AAV), относящегося к роду *Dependovirus* и семейству *Parvoviridae*. Он представляет использующийся для генной терапии вирус с одноцепочечной ДНК. Вирус способен эффективно инфицировать клетки, практически не вызывая врожденный или адаптивный иммунный ответ или связанную с ним токсичность, по крайней мере при первом использовании данного серотипа [11]. Искусственное удаление из генома вируса последовательностей, ассоциированных с факторами патогенности, а также размеры вирусной ДНК позволяют использовать AAV как контейнер для атравматической доставки системы редактирования в ядро клеток-мишеней. Благодаря множеству серотипов вируса с широким тропизмом часто удается обойти проблему иммунного ответа на него. Вирусные частицы AAV могут использоваться *in vitro*, *ex vivo* и *in vivo*, что делает их универсальными средствами доставки.

Цель исследования – изучение генетических методов создания сельскохозяйственных животных с улучшенными характеристиками.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В работе использовали комплекс лабораторно-клинических методов подготовки

донорского биоматериала, искусственно-го дозревания и оплодотворения ооцитов, культивирования ранних доимплантационных эмбрионов млекопитающих, криоконсервацию-оттаивание ооцитов и эмбрионов, микроманипуляции на ооцитах, зиготах и ранних эмбрионах животных, а также молекулярно-биологические методы разработки и тестирования эффективности систем редактирования.

Яичники коров отбирали постмортально и транспортировали в лабораторию в контролируемой среде (температура +37,5 °C или +4 °C) в течение 3–4 ч после получения. Аспирацию фолликулов и всю дальнейшую работу с яйцеклетками и эмбрионами проводили в стерильных условиях «чистой зоны» в ламинарных боксах с подогреваемой поверхностью. Для дозревания ооцит-кумлюсных комплексов использовали коммерческие среды. Среда для IVM представляла собой среду промышленного производства для культивирования эмбрионов человека Continuous Single Culture Complete (CSCC, Irvine Scientific, США), разработанную для процедур экстракорпорального оплодотворения человека, с добавлением 50 мкг/мл ХГЧ (Хорионический гонадотропин человека, РФ) и 0,5 мкг/мл ФСГ (Гонал, Serono). Для криоконсервирования клеток и эмбрионов КРС использовали наборы Vitrification Media (Kitazato, Япония) и соломины Сгутоп (Kitazato, Япония). Микроманипуляции, в том числе инъекции мРНК в цитоплазму ооцитов проводили на микроманипуляционной установке Narishige (Япония). Визуальный анализ выполняли на инвертированных микроскопах Nikon (Nikon Eclipse Ti-U, Япония) и Leica (DMI3000 B, Германия), программное обеспечение OCTAX (OCTAX EyeWare with ICSI Guard, Германия).

Рекомбинантные AAV для трансдукции получены методом тройной трансфекции [11]. Дизайн и синтез гидовых РНК (SgRNA) для микроинъекции осуществляли с помощью онлайн-алгоритма CRISPOR, критериями от-

¹⁸Lino C.A., Harper J.C., Carney J.P., Timlin J.A. Delivering CRISPR: a review of the challenges and approaches Drug Deliv. 2018. Vol. 25 (1). P. 1234–1257. DOI: 10.1080/10717544.2018.1474964.

бора гидов были высокий МИТ с наименьшим количеством нецелевых сайтов и отсутствие самокомплементарных участков. В качестве мишней выбраны второй экзон гена CD209 и промотор гена BLG (на сам ген BLG подобрать качественную SgRNA не удалось)^{19, 20}. Анализ эффективности CRISPR проводили поиском разрезов в генах интереса в бластоцистах методом секвенирования по Сэнгеру.

Статистический анализ полученных данных проводили в программах MS Excel и Statistica 10,0 параметрическими и непараметрическими методами. При нормальном распределении использовали *t*-критерий Стьюдента, в остальных случаях при анализе независимых выборок – *U*-критерий (Манна – Уитни), при анализе зависимых выборок – *W*-критерий (Вилкоксона).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Генетическая модификация – это современный подход, который позволяет получать организмы с заданными характеристиками. Однако при работе с крупными сельскохозяйственными животными возможность выявить последствия редактирования генома ограничена тем, что суммарный срокпренатального развития, наступления репродуктивного возраста и последующей беременности у коров превышает 2 года. Кроме того, большинство экономически важных признаков скота носят количественный характер (контролируются многими генами), и, следовательно, улучшение КРС с помощью генетических манипуляций почти всегда требует редактирования генома в нескольких местах. Введение CRISPR/Cas9-ассоциированной РНК в зиготы часто приводит к возникновению мозаичизма^{21–23}. В целом, можно заметить, что у

крупного рогатого скота успешных попыток модификаций генома, давших низкую степень мозаичизма, очень мало.

Нами исследовано несколько вариантов доставки системы редактирования в клетки КРС, включая микроинъекцию в зиготу плазмидной ДНК с закодированной последовательностью с CRISPR/Cas9 с sgRNA, способ вирусных векторов (аденоассоциированные вирусы AAV), совместное введение плазмидной ДНК и сперматозоида в ооцит на стадии МП, а также микроинъекции РНК Cas9 и гибридных РНК.

Видовые особенности строения цитоплазмы ооцита крупного рогатого скота – большое количество липидных включений – значительно затрудняют визуализацию пронуклеусов, поэтому первый способ введения системы редактирования непосредственно в пронуклеус зиготы не дал положительных результатов. Способ доставки с помощью вирусных векторов оказался более эффективным. Предварительно протестировали пять различных серотипов рекомбинантного AAV, в последовательность которых был закодирован ген зеленого флуоресцентного белка (GFP). Затем серотипы AAV1, AAV2, AAV6, AAV9, AAVDJ использовали для получения GFP-положительных эмбрионов КРС.

Всего для этих экспериментов использовали 116 эмбрионов, полученных после оплодотворения ооцитов от 114 коров. Для каждой группы серотипов инфицированных AAV эмбрионов проводили по три независимых эксперимента [12]. Установили, что серотип AAV9 продемонстрировал минимальную эффективность (38,10%) в качестве инструмента переноса генетического материала. Четыре других серотипа AAV (AAV1, AAV2,

¹⁹ Deykin A.V., Kubekina M.V., Silaeva Y.Y., Krivonogova A.S., Isaeva A.G. Using CRISPR/Cas9 for generation the cd209 knock-out is a way to get cattle breeds resistant to the Bovine leukemia virus (BLV) E3S Web of Conferences. 2020. Vol. 176. P. 01007.

²⁰ Silaeva Y.Y., Kubekina M.V., Bruter A.V., Isaeva A.G., Koshchaev, A.G. Gene editing CRISPR/Cas9 system for producing cows with hypoallergenic milk on the background of a beta-lactoglobulin gene knockout E3S Web of Conferences. 2020. Vol. 176. P. 01006.

²¹ Mashiko D., Young S.A., Muto M., Kato H., Nozawa K., Ogawa M., Noda T., Kim Y.J., Satoh Y., Fujihara Y., et al. Feasibility for a large scale mouse mutagenesis by injecting CRISPR/Cas plasmid into zygotes // Dev. Growth Differ. 2014. Vol. 56. P. 122–129. DOI: 10.1111/dgd.12113.

²² Wang X., Yu H., Lei A., Zhou J., Zeng W., Zhu H., Dong Z., Niu Y., Shi B., Cai B., et al. Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 13878. DOI: 10.1038/srep13878.

²³ Wang K., Ouyang H., Xie Z., Yao C., Guo N., Li M., Jiao H., Pang D. Efficient Generation of Myostatin Mutations in Pigs Using the CRISPR/Cas9 System // Sci. Rep. 2015. Vol. 5. P. 1–11. DOI: 10.1038/srep16623.

AAV6 и AAVDJ) показали очень близкую эффективность трансдукции (52,94–58,33%). По итогам экспериментов выбрали серотип AAV2 для нокаута гена, ассоцииированного с рецептором CD209. CD209 представляет собой receptor лектина C-типа, располагается на поверхности макрофагов и дендритных клеток и распознает широкий спектр патогенов, в том числе вирус лейкоза крупного рогатого скота. Потенциально нокаут этого гена может позволить животным стать устойчивыми к различным инфекциям. После редактирования экспериментальных зигот КРС с доставкой системы аденоассоциированным вирусом (серотип AAV2) полученные blastоциты были проанализированы секвенированием по Сэнгеру: в 3 из 22 случаев отмечали мозаичные сдвиги рамки считывания области CD209 [12].

В проведенных нами экспериментах наиболее результативным методом генного редактирования у крупного рогатого скота стало использование системы редактирования на основе РНК spCas9 и гидовых РНК, доставлявшихся в клетку с помощью усовершенствованного и адаптированного с учетом видовой специфиности способа микроинъекции (см. сноски 19, 20). На время инъекции зиготы помещали в буфер G-MOPS (Vitrolife, Швеция). Для инъекции использовали только ооциты, выбросившие первое и второе поллярное тело после оплодотворения *in vitro*. Инъекцию проводили с помощью удерживающей пипетки (Cooper Surgical, США) и иглы для микроинъекций. Для каждой системы редактирования проводили по два независимых эксперимента, всего было проинъектировано 200 клеток. В процессе манипуляций погибло около 10% клеток, что, по нашему мнению, связано с высокой травматичностью микроинъекций как таковых. Начали дробление 98 клеток, из них восемьклеточной стадии достигли 67,6%, а 11 эмбрионов достигли стадии blastоциты, что составило 5,5% всех использованных клеток. У 32,3% зигот арест наступил вскоре после начала дробления. Секвенирование биопсийного материала от эмбрионов показало наличие характерных изменений в генах интереса.

На полученных хроматограммах отдельных проб эмбрионов после микроинъекций генетических конструкций для внесения разреза в гены BLG и CD209 отмечен основной признак наличия генетической модификации – двоение сиквенса. Разрезы обнаружены в 5 из 17 эмбрионов (29,4%) после микроинъекций гидовой РНК против гена BLG и мРНК spCas9 и в 2 из 9 эмбрионов (22,2%) после микроинъекций гидовой РНК против гена CD209 и мРНК spCas9. Таким образом, уровень нокаутов в группе экспериментальных клеток не превышал 30%, при этом стадии blastоциты достигало около 5,5% эмбрионов, что, предположительно, обусловлено высокой травматичностью микроинъекции и гибелю значительного количества ранних эмбрионов на начальных этапах дробления. Несмотря на это, в целом полученные нами данные свидетельствовали об успешности и эффективности работы этой системы доставки, однако требовалось дальнейшее совершенствование техники выполнения для повышения выживаемости эмбрионов после манипуляций.

Ключевым критерием было достижение минимально возможной травматичности микроинъекций. Нами исследованы различные способы выполнения микроинъекций, изучено влияние формы иглы на эффективность манипуляций, опробованы различные варианты приготовления смеси РНК Cas9 и гидовых РНК, отличающихся вязкостью и концентрацией компонентов. Было испытано два вида игл: имеющие изгиб под углом 45°, аналогичные инструментам для проведения ИКСИ (интрацитоплазматической инъекции сперматозоида), и прямые, обычно применяемые для микроинъекций у мелких лабораторных животных. Разработаны технические решения, позволившие проводить микроинъекции прямой иглой с использованием удерживающей присоски с изгибом под углом 45°, стандартной для ИКСИ, в «половуткрытой» камере для микроинъекций в горизонтальной плоскости. Также определена оптимальная концентрация РНК Cas9 и гидовых РНК в смеси для микроинъекций. В результате исследований разработана методика пост-

пенного снижения концентрации смеси – до получения раствора оптимальной вязкости и текучести, соответствующей параметрам заполнения иглы: 50 нг/мкл РНК Cas9 и 15 нг/мкл гидовой РНК.

На основе полученных результатов оптимизирован протокол выполнения микроинъекции системы редактирования и проведен модельный эксперимент на 160 ооцитах, по 80 клеток на каждую конструкцию. В результате установили, что, несмотря на повышенную начальную гибель клеток, эффективность самого редактирования была выше. При инъекции гидовой РНК против гена BLG и мРНК spCas9 гибель клеток составила 68,8%, дробление начали 84% выживших клеток, соотношение между начавшими бластуляцию и арестованными зиготами составляло 20 к 80%. При инъекции системы редактирования против гена CD209 гибель клеток составила 66,3%, дробление начали 44,4% выживших эмбрионов, бластуляция составила 16,7%. Все остановившиеся в развитии эмбрионы отправлены на сиквенс: 13 и 10 (один – брак) в двух группах, соответственно. В результате установлено, что из 13 эмбрионов оказалось 9 с нокаутом по BLG (69,2%), и из 9 эмбрионов – 4 с нокаутом по CD209 (44,4%).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По данным исследований [8], эффективность нокаута гена β -лактоглобулина на отредактированных 1511 зиготах КРС имеет следующие показатели: уровень дорастания до бластоцисты – 15%, количество несущих делецию эмбрионов – 21%. В настоящих исследованиях с применением системы CRISPR/Cas9 достигнуты схожие результаты: 20–30%-й уровень нокаута и 16%-й уровень бластуляции. При этом частота формирования бластоцист была сопоставима с контрольной (интактной) группой. Принимая во внимание то, что ооциты КРС получены после убоя животных, выбракованных из фермерских хозяйств в силу возрастных изменений и низкой удойности, и без предварительной гормональной подготовки, низкий уровень компетенции к развитию таких ооцитов вполне объясним.

Наши результаты показали, что доставка системы редактирования методом микроинъекций смеси РНК spCas9 и гидовых РНК является достаточно эффективной и может применяться для получения нокаутов по генам интереса. Однако возникает проблема снижения уровня мозаичности после редактирования эмбрионов. В связи с этим перспективным будет введение реагентов для редактирования как можно раньше (в ооциты МII) до начала синтеза ДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Fei Hao, Wei Yan, Xiaocong Li, Hui Wang, Yingmin Wang, Xiao Hu, Xu Liu, Hao Liang, Dongjun Liu.* Generation of Cashmere Goats Carrying an EDAR Gene Mutant Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing // International Journal of Biological Sciences. 2018. Vol. 14 (4). P. 427–436. DOI: 10.7150/ijbs.23890.
2. *Jenny-Helena Söllner, Hendrik Johannes Sake, Antje Frenzel, Rita Lechler, Doris Herrmann, Walter Fuchs, Björn Petersen.* In vitro genome editing activity of Cas9 in somatic cells after random and transposon-based genomic Cas9 integration // PLoS One. 2022. Vol. 17 (12). P. 0279123. DOI: 10.1371/journal.pone.0279123.
3. *Honghui Li, Wenmin Cheng, Bowei Chen, Shaoxia Pu, Ninglin Fan, Xiaolin Zhang, Deling Jiao, Dejia Shi, Jianxiong Guo, Zhuo Li, Yubo Qing, Baoyu Jia, Hong-Ye Zhao, Hong-Jiang Wei.* Efficient Generation of P53 Biallelic Mutations in Diannan Miniature Pigs Using RNA-Guided Base Editing // Life (Basel). 2021. Vol. 11 (12). P. 1417. DOI: 10.3390/life11121417.
4. *Haokun Zhang, Ruilin Sun, Jian Fei, Hongyan Chen, Daru Lu.* Correction of Beta-Thalassemia IVS-II-654 Mutation in a Mouse Model Using Prime Editing // International Journal of Molecular Sciences. 2022. Vol. 23 (11). P. 5948. DOI: 10.3390/ijms23115948.
5. *Ryu J., Statz J.P., Chan W., Burch F.C., Brigande J.V., Kempton B., Porsov E.V., Renner L., McGill T., Burwitz B.J., Hanna C.B., Neuringer M., Hennebold J.D.* CRISPR/Cas9 editing of the MYO7A gene in rhesus macaque embryos to generate a primate model of Usher syndrome type 1B // Scientific Reports. 2022. Vol. 1. P. 10036. DOI: 10.1038/s41598-022-13689-x.
6. *Lin Y., Li J., Li C., Tu Z., Li S., Li X.J., Yan S.* Application of CRISPR/Cas9 System in Es-

- tablishing Large Animal Models // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*. 2022. Vol. 10. P. 919155. DOI: 10.3389/fcell.2022.919155.
7. Menchaca A., Dos Santos-Neto P.C., Souza-Neves M., Cuadro F., Mulet A.P., Tesson L., Chenouard V., Guiffès A., Heslan J.M., Gantier M., Anegón I., Crispo M. Otoferlin Gene Editing in Sheep via CRISPR-Assisted ssODN-Mediated Homology Directed Repair // *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10 (1). P. 5995. DOI: 10.1038/s41598-020-62879-y.
8. Karponi G., Kritas S.K., Papadopoulou G., Akrioti E.K., Papanikolaou E., Petridou E. Development of a CRISPR/Cas9 system against ruminant animal brucellosis // *BMC Veterinary Research*. 2019. Vol. 15. P. 422. DOI: 10.1186/s12917-019-2179-z.
9. De Graeff N., Jongsma K.R., Johnston J., Hartley S., Bredenoord A.L. The ethics of genome editing in non-human animals: A systematic review of reasons reported in the academic literature // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019. Vol. 374. P. 20180106. DOI: 10.1098/rstb.2018.0106.
10. Yang H., Wang H., Shivalila C.S. et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering // *Cell*. 2013. Vol. 154. P. 1370–1379.
11. Danilov K.A., Vassilieva S.G., Polikarpova A.V., Starikova A.V., Shmidt A.A., Galkin I.I., Tsigrina A.A., Egorova T.V., Orlov S.N., Kotelevtsev Y.V. In vitro assay for the efficacy assessment of AAV vectors expressing microdystrophin // *Experimental Cell Research*. 2020. Vol. 392. P. 112033. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112033.
12. Krivonogova A.S., Bruter A.V., Makutina V.A., Okulova Y.D., Ilchuk L.A., Kubekina M.V., Khamatova A.Y., Egorova T.V., Mymrin V.S., Silaeva Y.Y., Deykin A.V., Filatov M.A., Isaeva A.G. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing // *The riogenology*. 2022. Vol. 193. P. 77–86.
2. Jenny-Helena Söllner, Hendrik Johannes Sake, Antje Frenzel, Rita Lechler, Doris Herrmann, Walter Fuchs, Björn Petersen. In vitro genome editing activity of Cas9 in somatic cells after random and transposon-based genomic Cas9 integration. *PLoS One*, 2022, vol. 17 (12), p. 0279123. DOI: 10.1371/journal.pone.0279123.
3. Honghui Li, Wenmin Cheng, Bowei Chen, Shaoxia Pu, Ninglin Fan, Xiaolin Zhang, Deling Jiao, Dejia Shi, Jianxiong Guo, Zhuo Li, Yubo Qing, Baoyu Jia, Hong-Ye Zhao, Hong-Jiang Wei. Efficient Generation of P53 Biallelic Mutations in Diannan Miniature Pigs Using RNA-Guided Base Editing. *Life (Basel)*, 2021, vol. 11 (12), p. 1417. DOI: 10.3390/life11121417.
4. Haokun Zhang, Ruilin Sun, Jian Fei, Hongyan Chen, Daru Lu. Correction of Beta-Thalassemia IVS-II-654 Mutation in a Mouse Model Using Prime Editing. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, vol. 23 (11), p. 5948. DOI: 10.3390/ijms23115948.
5. Ryu J., Statz J.P., Chan W., Burch F.C., Brigande J.V., Kempton B., Porsov E.V., Renner L., McGill T., Burwitz B.J., Hanna C.B., Neuringer M., Hennebold J.D. CRISPR/Cas9 editing of the MYO7A gene in rhesus macaque embryos to generate a primate model of Usher syndrome type 1B. *Scientific Reports*, 2022, vol. 1, p. 10036. DOI: 10.1038/s41598-022-13689-x.
6. Lin Y., Li J., Li C., Tu Z., Li S., Li X.J., Yan S. Application of CRISPR/Cas9 System in Establishing Large Animal Models. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2022, vol. 10, p. 919155. DOI: 10.3389/fcell.2022.919155.
7. Menchaca A., Dos Santos-Neto P.C., Souza-Neves M., Cuadro F., Mulet A.P., Tesson L., Chenouard V., Guiffès A., Heslan J.M., Gantier M., Anegón I., Crispo M. Otoferlin Gene Editing in Sheep via CRISPR-Assisted ssODN-Mediated Homology Directed Repair. *Scientific Reports*, 2020, vol. 10 (1), p. 5995. DOI: 10.1038/s41598-020-62879-y.
8. Karponi G., Kritas S.K., Papadopoulou G., Akrioti E.K., Papanikolaou E., Petridou E. Development of a CRISPR/Cas9 system against ruminant animal brucellosis. *BMC Veterinary Research*, 2019, vol. 15, p. 422. DOI: 10.1186/s12917-019-2179-z.
9. De Graeff N., Jongsma K.R., Johnston J., Hartley S., Bredenoord A.L. The ethics of genome editing in non-human animals: A systematic review of reasons reported in the academic literature // *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019. Vol. 374. P. 20180106. DOI: 10.1098/rstb.2018.0106.

REFERENCES

1. Fei Hao, Wei Yan, Xiaocong Li, Hui Wang, Yingmin Wang, Xiao Hu, Xu Liu, Hao Liang, Dongjun Liu. Generation of Cashmere Goats Carrying an EDAR Gene Mutant Using CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing. *International Journal of Biological Sciences*, 2018, vol. 14 (4), pp. 427–436. DOI: 10.7150/ijbs.23890.

- ature. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 2019, vol. 374, p. 20180106. DOI: 10.1098/rstb.2018.0106.
10. Yang H., Wang H., Shivalila C.S. et al. One-step generation of mice carrying reporter and conditional alleles by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Cell*, 2013, vol. 154, pp. 1370–1379.
11. Danilov K.A., Vassilieva S.G., Polikarpova A.V., Starikova A.V., Shmidt A.A., Galkin I.I., Tsitrina A.A., Egorova T.V., Orlov S.N., Kotelevtsev Y.V. In vitro assay for the efficacy assessment of AAV vectors expressing microdystrophin. *Experimental Cell Research*, 2020, vol. 392, p. 112033. DOI: 10.1016/j.yexcr.2020.112033.
12. Krivonogova A.S., Bruter A.V., Makutina V.A., Okulova Y.D., Ilchuk L.A., Kubekina M.V., Khamatova A.Y., Egorova T.V., Myrrin V.S., Silaeva Y.Y., Deykin A.V., Filatov M.A., Isaeva A.G. AAV infection of bovine embryos: Novel, simple and effective tool for genome editing. *Theriogenology*, 2022, vol. 193, pp. 77–86.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

Донник И.М., доктор биологических наук, профессор, академик РАН, главный научный сотрудник

Макутина В.А., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Кривоногова А.С., доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник

(✉) **Исаева А.Г.**, доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 620142, г. Екатеринбург, ул. Белинского, 112а; e-mail: isaeva.05@bk.ru

Дейкин А.В., кандидат биологических наук, старший научный сотрудник

Костшев А.Г., доктор биологических наук, профессор, старший научный сотрудник

AUTHOR INFORMATION

Irina M. Donnik, Doctor of Science in Biology, Professor, Academician RAS, Head Researcher

Valerija A. Makutina, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher

Anna S. Krivonogova, Doctor of Science in Biology, Associate Professor, Lead Researcher

(✉) **Albina G. Isaeva**, Doctor of Science in Biology, Associate Professor, Lead Researcher; **address:** 112a, Belinskogo St., Ekaterinburg, 620142, Russia; e-mail: isaeva.05@bk.ru

Alexey V. Deikin, Candidate of Science in Biology, Senior Researcher

Andrey G. Kostschaev, Doctor of Science in Biology, Professor, Senior Researcher

Дата поступления статьи / Received by the editors 07.07.2023

Дата принятия к публикации / Accepted for publication 25.07.2023

Дата публикации / Published 20.10.2023