

Структура генома и геномные технологии

УДК 636.5:573.6.086.83:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1099rus

СОЗДАНИЕ СИСТЕМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА НА ОСНОВЕ CRISPR-CAS9 ДЛЯ НОКАУТА ГЕНОВ *FGF20* И *HR* В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ И ГЕНЕРАТИВНЫХ КЛЕТКАХ КУР И ПЕРЕПЕЛОВ*А.Н. ВЕТОХ¹ ✉, П.В. СЕРГИЕВ^{2, 3, 4}, М.П. РУБЦОВА^{2, 5}, Н.А. ВОЛКОВА¹,
Е.К. ТОМГОРОВА¹, Л.А. ВОЛКОВА¹, Н.А. ЗИНОВЬЕВА¹

Технологии геномного редактирования с применением сайт-специфических эндонуклеаз (ZNF, TALEN, CRISPR/Cas9) находят все более широкое применение в животноводстве, в том числе в птицеводстве. С их использованием связывают надежды не только на ускорение процесса создания пород с улучшенными хозяйственно полезными признаками, высокой устойчивостью к инфекционным заболеваниям, но и с созданием особей, несущих фенотипы, привнесение которых в популяции животных и птицы методами традиционной селекции невозможно или затруднено. Одним из направлений применения технологии геномного редактирования, представляющим интерес для промышленного птицеводства в рамках улучшения товарных качеств птицеводческой продукции, может быть создание особей, лишенных оперения. Для этого мы выбрали гены *FGF20* и *HR*, связанные с развитием и ростом волос у млекопитающих (F. Benavides с соавт., 2009) и перьев у птиц (K.L. Wells с соавт., 2012). Цель исследования заключалась в создании системы для нокаута генов *FGF20* и *HR* у кур и *FGF20* у перепелов с использованием методов редактирования генома. Инактивацию генов *FGF20* и *HR* проводили в области III экзона каждого гена с учетом анализа их структуры. С использованием биоинформатического инструментария и ресурсов (<https://zlab.bio/guide-design-resources>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) были подобраны оптимальные участки разрезания генов *FGF20* и *HR*, а также гидовые РНК и праймеры для амплификации выбранных участков этих генов. Для создания генетических конструкций, обеспечивающих разрезание в областях, кодирующих *FGF20* и *HR*, был выбран вектор рX458 (F.A. Rap с соавт., 2013). Для лигирования использовали гибридные олигонуклеотиды: 5'-CACCGAAAGATGGTACTCC-CAGAGA-3' и 3'-CTTCTACCATGAGGGTCTCAAA-5' (для гена *FGF20* кур), 5'-CACCGTCC-ATGTTTGTACACGTTGG-3' и 3'-CAGGTACAACATGTGCAACCCAAA-5' (для гена *FGF20* кур и перепелов); 5'-CACCGACGTGGCTGACGCGGCACT-3' и 3'-CTGCACCGACTGCGCCA-5' (для гена *HR* кур). Эффективность клонирования конструкций подтвердило секвенирование. Полученные плазмиды использовались для редактирования генома эмбриональных (фибробласты) и генеративных (примордиальные зародышевые клетки — ПЗК, сперматогонии) клеток кур и перепелов в экспериментах *in vitro*. Клетки-мишени трансфицировали посредством электропорации. Эффективность трансфекции оценивали на сортере клеток BD FACS Aria III («BD Biosciences», США) по экспрессии маркерного гена *eGFP*. Доля трансфицированных *in vitro* эмбриональных фибробластов, ПЗК и сперматогониев кур с нокаутом гена *FGF20* достигала соответственно 5,7; 0,9 и 1,2 %, с нокаутом гена *HR* — 7,4, 0,8 и 1,0 %. Процент эмбриональных фибробластов, ПЗК и сперматогониев перепелов с нокаутом гена *FGF20* составил соответственно 6,3; 0,9 и 1,1 %. Геномная ДНК была выделена из трансформированных клеток кур и перепелов и использована для амплификации и секвенирования участков генов *FGF20* и *HR*, в которые были внесены делеции. Показано наличие множественных мутаций в амплифицированных участках ДНК. Полученные данные свидетельствуют об успешности создания систем для нокаута генов *FGF20* и *HR* у кур и *FGF20* у перепелов с использованием генетических конструкций на основе вектора рX458.

Ключевые слова: редактирование генома, CRISPR/Cas9, куры, перепела, примордиальные зародышевые клетки, сперматогонии, *FGF20*, *HR*.

Развитие технологий геномного редактирования с применением сайт-специфических эндонуклеаз (ZNF, TALEN, CRISPR/Cas9) открыло новые возможности для введения направленных генетических изменений в эмбриональные линии животных и птицы (1, 2). Эти технологии находят все более широкое применение благодаря высокой эффективности и специфичности (3). В животноводстве, в том числе в птицеводстве, с геномным редактированием связывают не только надежды на ускорение получения

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант № 18-29-07079

пород с улучшенными хозяйственно полезными признаками (4, 5), повышенной устойчивостью к инфекционным заболеваниям (6, 7), но и создание особей, несущих фенотипы, привнесение которых в популяции животных и птицы методами традиционной селекции невозможно или затруднено (8, 9). Получение линий сельскохозяйственной птицы, передающих привнесенные генетические изменения по наследству, требует проведения манипуляций на уровне генеративных клеток. Однако особенности эмбрионального развития и репродуктивной физиологии птиц не позволяют использовать для генно-инженерных манипуляций методы, применяемые на млекопитающих, например микроинъекции и соматическое клонирование (10, 11). Вместе с тем значительная часть эмбрионального периода у птиц проходит вне организма самок, что облегчает доступ к эмбриону на ранних стадиях развития. На сегодняшний день разработан достаточно широкий спектр методов и подходов по введению генетических конструкций в эмбриональные клетки птиц (12). Опубликован ряд работ по успешному получению генетически модифицированных кур и перепелов, экспрессирующих репортерные гены *LacZ* (13) и *GFP* (14), бактериальный ген β -лактамазы (15), интерферон человека $\alpha 2b$ (16), β -интерферон человека (17), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (18), моноклональные антитела (19), антагонист рецептора β -интерлейкина (20) и гормон роста человека (21). Однако технологии, применявшиеся для модификации генома животных и птицы до 2012 года, носили неспецифичный характер, за исключением модельных научных систем. С 2012 года технология CRISPR/Cas9 последовательно вытесняет прочие приемы промышленного трангенеза. Имеется ряд работ по успешному использованию CRISPR/Cas9 для модификации клеток млекопитающих с последующим получением особей с заданными свойствами (22, 23). У птиц до недавнего времени в качестве наиболее эффективного способа привнесения наследственных изменений в генеративные клетки кур рассматривалась трансформация бластодермальных клеток на стадии X с использованием лентивирусных и ретровирусных векторов (24). В последние годы с развитием новых методов редактирования генома, в частности TALEN и CRISPR, возрастает интерес к использованию в качестве клеток-мишеней для введения генетических конструкций генеративных клеток — примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) и сперматогониев. ПЗК — это эмбриональные клетки, характеризующиеся плюрипотентностью, то есть способностью дифференцироваться как в мужские, так и женские половые клетки. Сперматогонии относятся к стволовым клеткам семенников самцов. Сперматогонии представляют собой немногочисленную популяцию сперматогенных клеток, располагающихся на базальной мембране семенных канальцев. Они обладают способностью к самообновлению и дифференцировке с образованием высокоспециализированных зрелых половых клеток самцов — спермиев.

Такие свойства ПЗК и сперматогониев открывают широкие возможности для реализации их потенциала в качестве мишеней для геномного редактирования у сельскохозяйственной птицы с целью создания особей с заданными свойствами. Возможность манипуляций с клетками этого типа *in vitro* позволяет точно интегрировать экспрессионные конструкции в определенный локус под заранее выбранную эндогенную промоторно-энхансерную систему. Более того, эти технологии позволяют сохранить экспрессию эндогенного гена. Использование ПЗК в качестве вектора предусматривает их выделение из эмбрионов-доноров, трансформацию в культуре *in vitro* и введение в эмбрионы-реципиенты. При работе со спермато-

гониями проводят трансформацию донорских сперматогониев *in vitro*, отбор трансформированных клеток и их трансплантацию в семенники стерильных самцов-реципиентов с последующим получением спермы для осеменения самок с целью получения генетически модифицированного потомства.

Показаны возможности технологий TALEN и CRISPR для генетической модификации клеток кур *in vitro* (25, 26). Опубликован ряд работ по успешному получению кур и перепелов с заданными свойствами с использованием различных систем геномного редактирования (27, 28). Одно из возможных направлений геномного редактирования, представляющих практический интерес для улучшения товарных качеств птицеводческой продукции, — создание особей, лишенных оперения. Установлены гены (*FGF20* и *HR*), необходимые для развития и роста волос у млекопитающих (29) и перьев у птиц (30).

В настоящем сообщении представлены результаты исследований по созданию системы редактирования на основе CRISPR/Cas9 для нокаута генов *FGF20* и *HR*, контролирующих развитие оперения у птиц. На эмбриональных фибробластах и генеративных клетках (ПЗК и сперматогонии) показана эффективность использования созданных конструкций для внесения делеций в области генов *FGF20* и *HR* кур и перепелов в условиях *in vitro*.

Нашей целью была разработка системы редактирования генома для нокаута генов *FGF20* и *HR* у кур и перепелов, пригодной для получения генетически модифицированной сельскохозяйственной птицы.

Методика. Эмбриональные фибробласты выделяли из 5-суточных эмбрионов кур (*Gallus gallus domesticus*, порода русская белая) или 4-суточных эмбрионов перепелов (*Coturnix coturnix*, порода японский перепел). Эмбрионы извлекали в асептических условиях. Для дезагрегации эмбрионы сначала механически измельчали ножницами, затем подвергали ферментативной обработке, инкубируя кусочки ткани в 0,15 % растворе трипсина («Gibco, Thermo Scientific», США) в течение 15 мин при 37 °С. Примордиальные зародышевые клетки выделяли из 6-суточных эмбрионов кур и 4-суточных эмбрионов перепелов. Диссоциацию проводили посредством последовательной механической и ферментативной обработки, как описано выше, но при концентрации трипсина 0,05 %. Сперматогенные клетки выделяли посредством последовательной механической и ферментативной обработки ткани семенника 1-недельных самцов. Для ферментативной обработки использовали 0,25 % раствор трипсина, инкубировали в течение 30 мин при 37 °С.

Долю жизнеспособных клеток в полученной клеточной суспензии после механической и ферментативной обработки эмбрионов и ткани семенника оценивали с помощью окрашивания 0,4 % трипановым синим в течение 10 мин при 37 °С. Подсчет окрашенных клеток проводили в счетчике клеток Countess («Thermo Fisher Scientific», США).

Суспензии эмбриональных клеток фибробластов и ПЗК, полученные после ферментативной обработки эмбрионов, переносили в чашки Петри и культивировали в ростовой среде DMEM HG («Gibco, Thermo Scientific», США) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) и добавлением 10 % сыворотки плода коровы (Fetal bovine serum, FBS, «HyClone», США), глутамина (2 мМ), 2-меркаптоэтанола (10^{-6} мМ) и антибиотика гентамицина (50 мкг/мл). Для первичной культуры клеток семенника в качестве ростовой использовали среду DMEM HG с содержанием глюкозы 4,5 г/л, дополненную 20 % FBS, альфа-глутамином (2 мМ), MEM (100×), антибиотиком-антимикотиком (100×) и ITS (100×). Культивирование сперматогониев осуществляли в среде DMEM HG, дополненной 5 % FBS, 2 мМ альфа-глутамином, MEM (10 мкл/мл), антибиотиком антимикотиком (100×), ITS

(10 мкл/мл), меркаптоэтанолом (5×10^{-5} М), альбумином (5 мг/мл), DL-lactic acid (1 мкл/мл), EGF (20 нг/мл), bFGF (10 нг/мл), LIF (2 нг/мл).

В составе культуральных сред использовали ростовые добавки, аминокислоты и антибиотики производства «Gibco» («Thermo Scientific», США) и «Sigma» (США).

Клетки кур и перепелов культивировали при 37 °С и 5 % CO₂. Для пассирования и проведения молекулярно-генетических исследований клетки снимали с субстрата 0,25 % раствором трипсина.

Микроскопирование полученных культур эмбриональных фибробластов, ПЗК и сперматогониев кур и перепелов проводили с помощью инвертированного микроскопа Nikon Eclipse TS100 («Nikon», Япония).

Последовательности гидовых РНК выбирали с помощью интернет ресурсов (<https://zlab.bio/guide-design-resources>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), используя вариант сборки генома курицы GalGal5 и названия генов FGF20 (Gene ID: 428779) и HR (Gene ID: 107049623) и перепела Coturnix japonica 2.0 и название гена FGF20 (Gene ID: 107313688), были выбраны оптимальные участки разрезания гена *FGF20* кур и *HR* перепелов. Для создания генетических конструкций для разрезания выбранных участков генома были гибридизованы пары следующих олигонуклеотидов: 5'-CACCGAAAGATG-GTACTCCCAGAGA-3' и 3'-CTTTCTACCATGAGGGTCTCTCAAA-5' (для гена *FGF20* кур), 5'-CACCGTCCATGTTTGTACACGTTGG-3' и 3'-CAGG-TACAAACATGTGCAACCCAAA-5' (для гена *FGF20* кур и перепелов); 5'-CACCGACGTGGCTGACGCGGCACT-3' и 3'-CTGCACCGACTGCGCCA-5' (для гена *HR* кур). Гибридизованные олигонуклеотиды были лигированы с плазмидой pX458 (Addgene #48138), линейаризованной эндонуклеазой рестрикции BbsI (ER1011, «Thermo Scientific», США) в соответствии с описанием (31). После лигирования и трансформации клеток *Escherichia coli* выросшие колонии пересеивали в жидкую среду LB с ампициллином и использовали для выделения плазмид. Анализ результатов клонирования проводили с помощью секвенирования. Успешно клонированные конструкции использовали для трансфекции клеток.

Для выделения геномной ДНК при создании конструкторов и оценке эффективности разрезания целевого участка генома использовали коммерческий набор QuickExtract™ DNA Extraction Solution («Lucigen Corporation», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию проводили в ПЦР смеси PCR MM на основе Taq ДНК полимеразы (K0171, «Thermo Scientific», США) в объеме 25 мкл при температуре гибридизации 60 °С и элонгации 1 мин при 72 °С. Для амплификации участка гена *FGF20* использовали праймеры F20_CHK2F 5'-TGTTCTTTGTGCAGGAGAAACT-2' и F20_CHK2R 5'-TCCCTCTCTCCTCAGCTGTATC-3', гена *HR* — HR_CHK2F 5'-CGCGCCTTCCCGTG-3' и HR_CHK2R 5'-GGCCGTTTGGCCGTTT-3'.

Системы редактирования вводили в эмбриональные фибробласты, ПЗК и сперматогонии методом электропорации, используя Neon™ Transfection System («Invitrogen», США). Трансфицированные клетки отбирали с помощью высокопроизводительного клеточного сортера BD FACSAria III («BD Biosciences», США).

Эффективность разрезания целевого участка генома оценивали посредством амплификации и секвенирования соответствующих фрагментов геномной ДНК с разработанными праймерами в указанных выше режимах (последовательности амплифицируемых фрагментов представлены на рисунках 1 и 2). Секвенирование (выполнено в компании ООО «Синтол», г. Москва) проводили по методу Сэнгера с использованием прямого праймера для амплификации.

Результаты. На первом этапе разработки системы геномного редактирования CRISPR/Cas9 для нокаута генов *FGF20* и *HR* мы провели биоинформатический поиск гомолога гена *HR* у птиц и подобрали последовательности гидовых РНК для инактивации генов *FGF20* и *HR*.

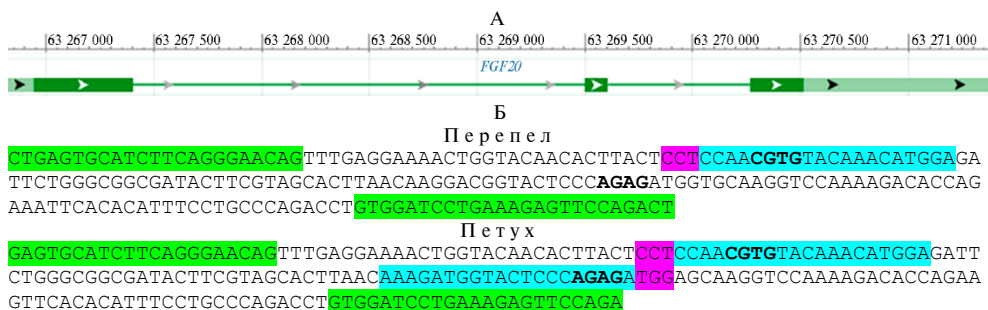


Рис. 1. Схема гена *FGF20* (А) и участки гибридизации гидовых РНК к нему (Б) у *Gallus gallus domesticus* и *Coturnix japonica*. Показана геномная координата 4-й хромосомы *G. gallus domesticus* с расположением экзонных (толстые линии) и интронных (тонкие линии) участков гена. Светло-зеленым отмечены некодирующие, темно-зеленым — кодирующие участки. Стрелки показывают направление транскрипции. Представлено выравнивание участков генома перепела *C. japonica* и курицы *G. gallus domesticus* с участками гибридизации разработанных праймеров (помечено зеленым) и гидовых РНК (помечено бирюзовым). PAM (protospacer adjacent motive) сайты показаны фиолетовым.

Ген *FGF20* курицы *G. gallus domesticus* расположен на 4-й хромосоме (рис. 1, А). Для инактивации этого гена мы выбрали III экзон. На рисунке представлены подобранные с использованием интернет-сервера участки разрезания в гене *FGF20* кур и перепелов, оптимальные для внесения в геном целевых мутаций с помощью системы CRISPR/Cas9, а также участки гибридизации двух гидовых РНК и праймеров для амплификации выбранных участков гена *FGF20* (см. рис. 1, Б). Одна из гидовых РНК была универсальной для курицы и перепела, вторая — комплементарной только для курицы. Праймеры, подобранные для амплификации выбранных участков гена *FGF20*, соответствовали геному как курицы, так и перепела.

Ген *HR* расположен на 22-й хромосоме курицы (рис. 2, А). Для его инактивации был выбран III экзон, кодирующий аминокислоты активного центра фермента HR, представляющего собой лизин-деметилазу. Показан участок генома курицы *G. gallus domesticus* с подобранными участками гибридизации праймеров и гидовой РНК (рис. 2, Б).

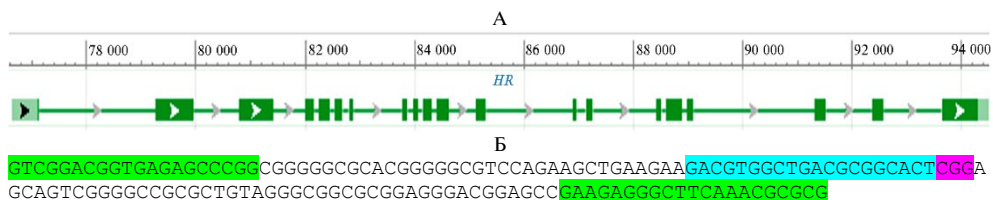


Рис. 2. Схема гена *HR* (А) и участка гибридизации гидовых РНК к нему (Б) у *Gallus gallus domesticus*. Показана геномная координата 22-й хромосомы *G. gallus domesticus* и экзонных (толстые линии) и интронных (тонкие линии) участков гена *HR*. Светло-зеленым отмечены некодирующие, темно-зеленым — кодирующие участки. Стрелки показывают направление транскрипции. Представлен участок генома *G. gallus domesticus* с участками гибридизации праймеров (помечено зеленым) и гидовых РНК (помечено бирюзовым). PAM (protospacer adjacent motive) сайты показаны фиолетовым.

Олигонуклеотиды для выбранных гидовых РНК синтезировали и использовали при создании конструкций для инактивации генов *FGF20* и *HR*. Плазмиду pX458 обрабатывали эндонуклеазой рестрикции *BbsI* и по сайту разрезания лигировали с гибридизованными олигонуклеотидами

F20C, F20U и HR (рис. 3).

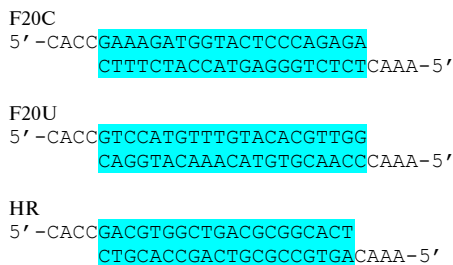


Рис. 3. Олигонуклеотиды, определяющие специфичность гидовых РНК и использованные для создания плазмид для инактивации генов *FGF20* и *HR* методом CRISPR/Cas9.

венирование полученных плазмид, которые далее использовали для трансфекции клеток кур и перепелов.

После лигирования и трансформации компетентных клеток *E. coli* JM109 (32) получили клоны трансформированных клеток, из которых выделяли плазмиды. Успешность клонирования конструкций подтвердило сек-

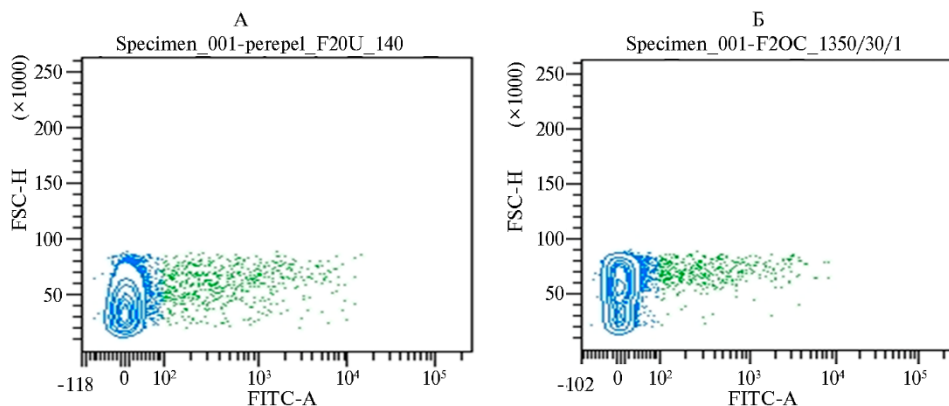


Рис. 4. Пример результата сортировки популяции клеток эмбриональных фибробластов перепелов (А) и кур (Б) после трансфекции конструкциями на основе плазмиды рХ458. По оси Х показана интенсивность флуоресценции в зеленом диапазоне, по оси Y — светорассеяние. Зеленым отмечены клетки, обладающие зеленой флуоресценцией.

Эффективность систем редактирования, разработанных для нокаута генов *FGF20* и *HR*, сначала оценили на эмбриональных фибробластах ввиду простоты и доступности их получения. Эмбриональные фибробласты кур и перепелов с плазмидой, кодирующей компоненты системы геномного редактирования CRISPR/Cas9, отделяли от нетрансфицированных клеток при помощи клеточного сортера (рис. 4). Разделение клеток основано на том, что в плазмиде рХ458 присутствуют области, соответствующие генам *Cas9* и *GFP*, кодирующие области которых отделены друг от друга последовательностью, кодирующей Р2А пептид. Таким образом, клетки, в которых происходит синтез Cas9, также содержат GFP и могут быть отделены от нетрансфицированных клеток по флуоресценции (см. рис. 4). Доля успешно трансфицированных эмбриональных клеток кур (размер выборки 10 000 клеток) при использовании систем для нокаута генов *FGF20* и *HR* достигала соответственно 5,7 и 7,4 %. Согласно распределению клеток по интенсивности флуоресценции, эффективность трансфекции эмбриональных клеток перепелов посредством системы редактирования для нокаута гена *FGF20* составила 6,3 %.

Трансфицированные эмбриональные фибробласты кур и перепелов, отсортированные на сортере, использовали для выделения геномной ДНК с целью оценки эффективности редактирования генов *FGF20* и *HR*. Выделенная ДНК была использована для ПЦР-амплификации локусов, содержащих участки комплементарности гидовым РНК (см. рис. 1, 2). Выделенные ПЦР-

продукты проанализировали с помощью секвенирования по Сэнгеру. В проанализированной популяции трансфицированных эмбриональных фибробластов кур (рис. 5, 6) и перепелов выявили множественные микроделеции.

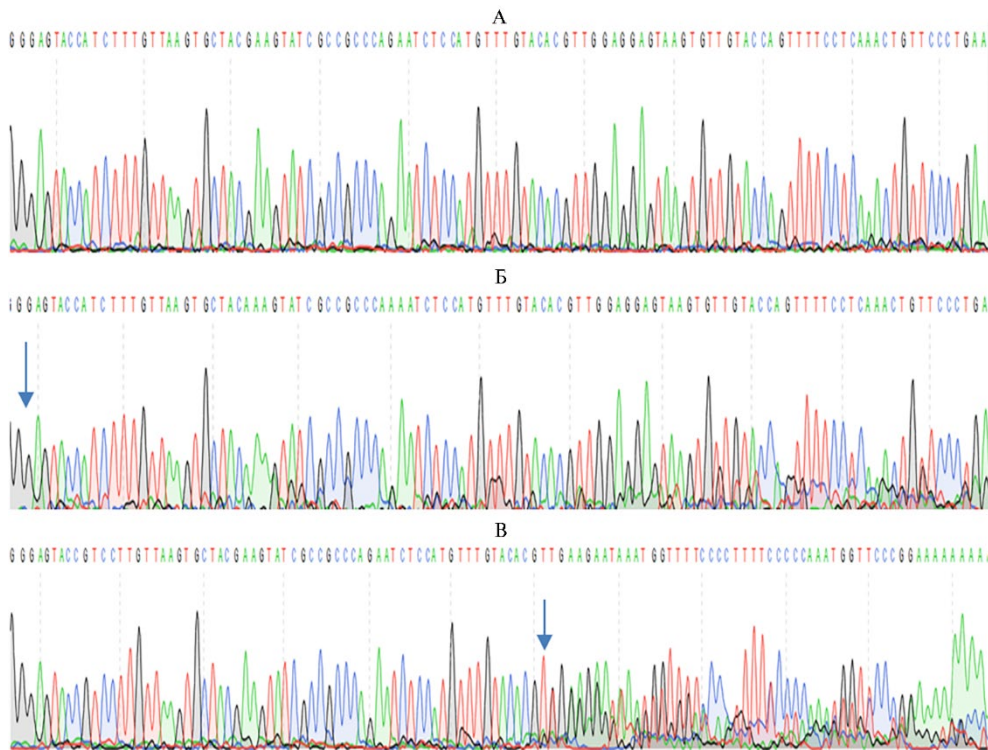


Рис. 5. Анализ эффективности разработанной системы CRISPR/Cas9-редактирования гена *FGF20* методом секвенирования по Сэнгеру: А — ген *FGF20* курицы, не подвергнутый редактированию; Б — ген *FGF20* курицы после редактирования при помощи Cas9 и гидовой РНК F20С; В — ген *FGF20* курицы после редактирования при помощи Cas9 и гидовой РНК F20U. Стрелками показаны участки разрезания генов. Видно наложение результатов секвенирования продуктов множественных микроделеций. При секвенировании гетерогенных продуктов микроделеций, в отличие от гомогенного ампликона дикого типа, происходит наложение пиков, соответствующих разным нуклеотидам (зеленый — А, черный — G, синий — С, красный — Т).

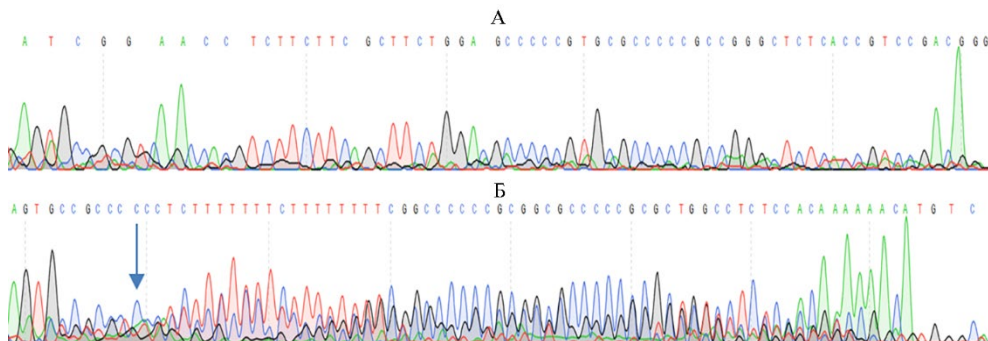


Рис. 6. Анализ эффективности разработанной системы CRISPR/Cas9-редактирования гена *HR* методом секвенирования по Сэнгеру: А — ген *HR* курицы, не подвергнутый редактированию; Б — ген *HR* курицы после редактирования при помощи Cas9 и гидовой РНК HR. Стрелками показаны участки разрезания генов. Видно наложение результатов секвенирования продуктов множественных микроделеций. При секвенировании гетерогенных продуктов микроделеций, в отличие от гомогенного ампликона дикого типа, происходит наложение пиков, соответствующих разным нуклеотидам (зеленый — А, черный — G, синий — С, красный — Т).

Анализ полученных данных (см. рис. 5, 6) позволил сделать вывод о

высокой эффективности внесения микроделечий в гены *FGF20* и *HR* с помощью созданных нами конструкций. Из двух конструкций, нацеленных на ген *FGF20*, более эффективной оказалась конструкция F20U, которую использовали для дальнейших экспериментов вместе с конструкцией HR.

При получении генетически модифицированной птицы наибольший интерес представляет возможность направленной модификации клеток гонад с целью их дальнейшего использования для получения потомства с измененным геномом. Для этих целей могут использоваться как зрелые половые клетки, так и их предшественники — ПЗК и сперматогонии.

При дезагрегации эмбрионов кур и перепелов с применением механической и ферментативной обработки мы получили суспензию разобщенных клеток (доля нежизнеспособных не превышала 5 %). В суспензии присутствовали разные типы эмбриональных клеток, разделение которых по адгезии (33) позволило получить популяцию эмбриональных клеток, максимально обогащенную ПЗК. Доля ПЗК от общего числа других типов клеток в культуре эмбриональных клеток кур и перепелов достигала соответственно 88 и 81 %. Немногочисленная популяция фибробластов, оставшаяся после разделения клеток, служила фидерным слоем, на который прикреплялись и культивировались ПЗК, образуя колонии (рис. 7).

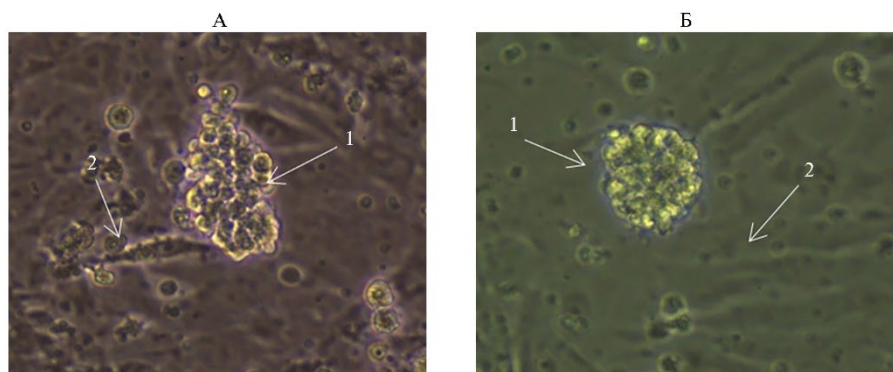


Рис. 7. Колонии примордиальных зародышевых клеток (ПЗК) кур (А) и перепелов (Б), использованные при трансфекции конструкциями для нокаута генов *FGF20* и *HR*: 1 — ПЗК, 2 — фибробласты (фидерный слой). Нативный препарат, световая микроскопия (микроскоп Nikon Eclipse TS100, «Nikon Co.», Япония; увеличение $\times 400$).

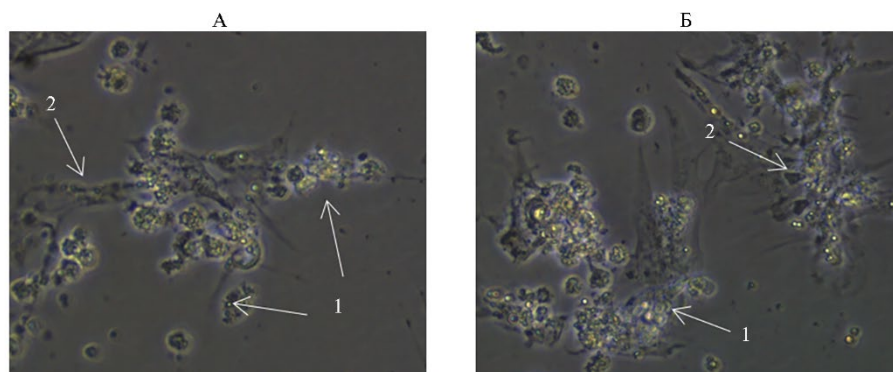


Рис. 8. Культуры сперматогенных клеток семенника петуха (А) и перепела (Б), использованные при трансфекции конструкциями для нокаута генов *FGF20* и *HR*: 1 — сперматогонии, 2 — клетки Сертоли. Нативный препарат, световая микроскопия (микроскоп Nikon Eclipse TS100, «Nikon Co.», Япония; увеличение $\times 400$).

После дезагрегации ткани семенников петушков и перепелов с при-

менением раствора трипсина получили суспензию, состоящую преимущественно из клеток Сертоли и сперматогониев. При дальнейшем культивировании клетки Сертоли распластывались на поверхности чашек Петри. Сперматогонии прикреплялись к клеткам Сертоли, образуя колонии на 7-8-е сут культивирования (рис. 8).

Полученные культуры ПЗК и сперматогониев кур и перепелов использовали для трансфекции созданными конструкциями для нокаута генов *FGF20* и *HR*. Доля трансфицированных *in vitro* ПЗК и сперматогониев кур с нокаутом гена *FGF20* достигала соответственно 0,9 и 1,2 %, с нокаутом гена *HR* — 0,8 и 1,0 %. Доля ПЗК и сперматогониев перепелов с нокаутом гена *FGF20* составила соответственно 0,9 и 1,1 %. Следует отметить относительно низкую эффективность трансфекции этих клеточных мишеней, однако благодаря отбору на сортере можно получить чистую популяцию трансфицированных клеток и размножить их до необходимых объемов в условиях *in vitro*.

Результативность использования ПЗК в качестве клеток-мишеней при геномном редактировании для получения птицы с нокаутом разных генов изучена несколькими научными группами: показана эффективность получения кур с нокаутом генов миостатина (5), тяжелой цепи иммуноглобулина (34), *DDX4* (35), овомуцина (8), *NHE1* (6) с применением систем *CRISPR/Cas9* (5, 6, 8, 34) и *TALEN* (35). В упомянутых публикациях для трансфекции ПЗК использовали два метода — электропорацию (6, 34, 35) и липофекцию (5, 8). При использовании метода электропорации в большинстве указанных случаев для отбора трансфицированных клеток осуществляли их культивирование в ростовых средах, содержащих селективный антибиотик. При отборе трансфицированных ПЗК посредством сортера без их предварительного культивирования в селективной среде эффективность трансфекции была невысокой (1 %), что согласуется с полученными нами данными.

Информация по использованию сперматогониев в качестве мишеней для введения систем редактирования генома в изученных нами доступных информационных источниках не была найдена.

Таким образом, нами получены системы геномного редактирования для нокаута генов *FGF20* и *HR* у кур и гена *FGF20* у перепелов. С использованием биоинформатического поиска подобраны оптимальные участки разрезания данных генов, а также гидовые РНК и праймеры для амплификации выбранных участков ДНК-мишеней. На основе вектора рХ458 созданы генетические конструкции для внесения делеций в областях, кодирующих *FGF20* и *HR*. Показана эффективность внесения микроделеций в указанные гены кур и перепелов с использованием полученных конструкций в системе *in vitro*: на культурах эмбриональных фибробластов частота трансфекции — соответственно 5,7 и 6,3 %, ПЗК — 0,9 и 0,9 %, сперматогониев — 1,2 и 1,1 %. Эти результаты свидетельствуют об успешном создании систем редактирования генома у сельскохозяйственной птицы с использованием генетических конструкций на основе вектора рХ458.

¹ФГБНУ ФИЦ животноводства —
ВИЖ им. академика Л.К. Эрста,
142132 Россия, Московская обл., г.о. Подольск, пос. Дубровицы, 60,
e-mail: anastezuya@mail.ru ✉, natavolkova@inbox.ru,
tomgorova@rambler.ru, ludavolkova@inbox.ru, n_zinovieva@mail.ru;

²ФГБОУ ВО Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, Химический факультет,
119991 Россия, г. Москва, ГСП-1, Ленинские горы, 1, стр. 3,
e-mail: petya@genebee.msu.ru, mprubtsova@gmail.com;

Поступила в редакцию
30 сентября 2021 года

³Центр наук о жизни Сколковского института науки и технологий,
143026 Россия, Московская обл., Территория Инновационного Центра «Сколково», Большой бульвар, 30, стр. 1,
e-mail: petya@genebee.msu.ru;

⁴Институт функциональной геномики,
ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
119991 Россия, г. Москва, Ленинские горы, 1,
e-mail: petya@genebee.msu.ru;

⁵ГНЦ ФГБУН Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117997 Россия, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10,
e-mail: mprubtsova@gmail.com

Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 6, pp. 1099-1110

CREATION OF GENOME EDITING SYSTEMS BASED ON CRISPR-CAS9 FOR KNOCKOUT IN *FGF20* AND *HR* GENES OF EMBRYONIC AND GENERATIVE CELLS FROM CHICKEN AND QUAILS

A.N. Vetokh¹ ✉, P.V. Sergiev^{2, 3, 4}, M.P. Rubtsova^{2, 5}, N.A. Volkova¹,
E.K. Tomgorova¹, L.A. Volkova¹, N.A. Zinovieva¹

¹Ernst Federal Research Center for Animal Husbandry, 60, pos. Dubrovitsy, Podolsk District, Moscow Province, 142132 Russia, e-mail anasteziyu@mail.ru (✉ corresponding author), natavolkova@inbox.ru, tomgorova@rambler.ru, ludavolkova@inbox.ru, n_zinovieva@mail.ru;

²Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, GSP-1, 1-3, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia, e-mail petya@genebee.msu.ru, mprubtsova@gmail.com;

³Center of Life Sciences, Skolkovo Institute of Science and Technology, 30-1, Bolshoi bulvar, Skolkovo, Moscow Province, 143026 Russia, e-mail petya@genebee.msu.ru;

⁴Institute of Functional Genomics, Lomonosov Moscow State University, 1, Leninskie Gory, Moscow, 119991 Russia, e-mail petya@genebee.msu.ru;

⁵Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry RAS, 16/10, ul. Mikluho-Maklaya, Moscow, 117997 Russia, e-mail mprubtsova@gmail.com

ORCID:

Vetokh A.N. orcid.org/0000-0002-2865-5960

Tomgorova E.K. orcid.org/0000-0001-5398-8815

Sergiev P.V. orcid.org/0000-0001-8866-1863

Volkova L.A. orcid.org/0000-0002-9407-3686

Rubtsova M.P. orcid.org/0000-0002-4808-5416

Zinovieva N.A. orcid.org/0000-0003-4017-6863

Volkova N.A. orcid.org/0000-0001-7191-3550

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Foundation for Basic Research, grant No. 18-29-07079

Received September 30, 2021

doi: 10.15389/agrobiol.2021.6.1099eng

Abstract

Genome editing technologies using site-specific nucleases (ZNF, TALEN, CRISPR/Cas9) are used more and more in animal husbandry, including poultry farming. With the use of these technologies, scientists hope not only to speed up the process of creating breeds with improved economically useful traits, high resistance to infectious diseases, but also to create individuals carrying phenotypes, the introduction of which into animal and bird populations by traditional breeding methods is impossible or difficult. The creation of individuals devoid of plumage in order to improve the commercial qualities of poultry product is of interest for industrial poultry farming. For this, we selected the *FGF20* and *HR* genes associated with the development and growth of hair in mammals (F. Benavides et al., 2009) and feathers in birds (K.L. Wells et al., 2012). The aim of the study was to create a system for knocking out the *FGF20* and *HR* genes in chickens and *FGF20* in quails by genome editing techniques. We inactivated *FGF20* and *HR* genes in the region of the third exons based on the analysis of their structure. The optimal cutting regions of these genes and guide RNAs and primers for amplifying the *FGF20* and *HR* DNA fragments were selected bioinformatically and using internet resources (<https://zlab.bio/guide-design-resources>, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). To create genetic constructs for cutting in the regions encoding *FGF20* and *HR*, the vector pX458 was selected (F.A. Ran et al., 2013). The hybridized oligonucleotides 5'-CACCGAAAGATGGTACTCCCAGAGA-3' and 3'-CTTTCTACCATGAGGGTCTCTCAAA-5' (for *FGF20* gene in chicken), 5'-CACCGTCCATGTTTGTACACGTTGG-3' and 3'-CAGGTACAACATGTGCAACCCAAA-5' (for *FGF20* gene in chicken and in quails); 5'-CACCGACGTGGCTGACGCGCACT-3' and 3'-CTGCACCGACTGCGC-CGTGACAAA-5' (for gene *HR*) were used for ligation. The effectiveness of cloning constructs was

confirmed by sequencing. The plasmids that were obtained were used for edit the genome of embryonic (fibroblasts) and generative (primordial germ cells — PGCs, spermatogonia) chicken and quail cells in *in vitro* experiments. Target cells were transfected by electroporation. Efficiency of electroporation was evaluated on a high-performance fluorescent cell sorter BD FACS Aria III («BD Biosciences», USA) by expression of the *eGFP* marker gene. The proportion of *in vitro* transfected embryonic fibroblasts, PGCs and spermatogonia from chickens with a knockout of the *FGF20* gene reached 5.7, 0.9, and 1.2 %, with a knockout of the *HR* gene — 7.4, 0.8, and 1.0 %, respectively. The percentage of embryonic fibroblasts, PGCs and spermatogonia from quails with a knockout of the *FGF20* gene was 6.3, 0.9, and 1.1 %, respectively. Genomic DNA was isolated from transformed chicken and quail cells and used for amplification and sequencing of the regions of the *FGF20* and *HR* genes in which deletions were introduced. The presence of multiple mutations in the amplified DNA regions was shown. The data obtained indicate the success of the knockout system creation for *FGF20* and *HR* genes in chickens and for *FGF20* gene in quails using genetic constructs based on the pX458 vector.

Keywords: genome editing, CRISPR/Cas9, chicken, quail, primordial germ cells (PGCs), spermatogonia cells, *FGF20*, *HR*.

REFERENCES

1. Bahrami S., Amiri-Yekta A., Daneshpour A., Jazayeri S.H., Mozdziak P.E., Sanati M.H., Gourabi H. Designing a transgenic chicken: applying new approaches toward a promising bioreactor. *Cell Journal*, 2020, 22(2): 133-139 (doi: 10.22074/cellj.2020.6738).
2. Cooper C. A., Doran T.J., Challagulla A., Tizard M.L.V., Jenkins K.A. Innovative approaches to genome editing in avian species. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9: 15 (doi: 10.1186/s40104-018-0231-7).
3. Petersen B. Basics of genome editing technology and its application in livestock species. *Reproduction in Domestic Animals*, 2017, 52(S3): 4-13 (doi: 10.1111/rda.13012).
4. Bhattacharya T.K., Shukla R., Chatterjee R.N., Bhanja S.K. Comparative analysis of silencing expression of myostatin (MSTN) and its two receptors (ACVR2A and ACVR2B) genes affecting growth traits in knock down chicken. *Scientific Reports*, 2019, 9: 7789 (doi: 10.1038/s41598-019-44217-z).
5. Kim G.-D., Lee J.H., Song S., Kim S.W., Han J.S., Shin S.P., Park B.-C., Park T.S. Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. *FASEB*, 2020, 34: 5688-5696 (doi: 10.1096/fj.201903035R).
6. Hellmich R., Sid H., Lengyel K., Flisikowski K., Schlickerrieder A., Bartsch D., Thoma T., Bertzbach L.D., Kaufer B.B., Nair V., Preisinger R., Schusser B. Acquiring resistance against a retroviral infection via CRISPR/Cas9 targeted genome editing in a commercial chicken line. *Frontiers in Genome Editing*, 2020, 2: 3 (doi: 10.3389/fgeed.2020.00003).
7. Koslová A., Trefil P., Mucksová J., Reinišová M., Plachý J., Kalina J., Kučerová D., Geryk J., Krchlínková V., Lejčková B., Hejnar J. Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *PNAS*, 2020, 117(4): 2108-2112 (doi: 10.1073/pnas.1913827117).
8. Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., Kagami H., Tagami T. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports*, 2016, 6: 23980 (doi: 10.1038/srep23980).
9. Oishi I., Yoshii K., Miyahara D., Tagami T. Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens. *Scientific Reports*, 2018, 8: 10203 (doi: 10.1038/s41598-018-28438-2).
10. Stern C.D. The marginal zone and its contribution to the hypoblast and primitive streak of the chick embryo. *Development*, 1990, 109: 667-682 (doi: 10.1242/dev.109.3.667).
11. Mozdziak P.E., Petitte J.N. Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Developmental Dynamics*, 2004, 229: 414-421 (doi: 10.1002/dvdy.10461).
12. Korshunova L.G., Karapetyan R.V., Ziadinova O.F., Fisinin V.I. Transgenic poultry: derivation and areas of application (review). *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2019, 54(6): 1080-1094 (doi: 10.15389/agrobiol.2019.6.1080rus).
13. Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., Petitte J.N. Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Developmental Dynamics*, 2003, 226: 439-445 (doi: 10.1002/dvdy.10234).
14. Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W., Kim J.S., Hwang I.S., Chung H.K., Kan I.S., Jeon I.S., Chang W.K., Park S.B., Yoo J.G. Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 2011, 75(4): 646-649 (doi: 10.1271/bbb.100721).
15. Harvey A.J., Speksnijder G., Baugh L.R., Morris J.A., Ivarie R. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nature Biotechnology*, 2002, 20: 396 (doi: 10.1038/nbt0402-396).

16. Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L., Hu W., Ivarie R. Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Research*, 2003, 12(5): 569-575 (doi: 10.1023/A:1025854217349).
17. Lillico S.G., Sherman A., McGrew M.J., Robertson C.D., Smith J., Haslam C., Barnard P., Radcliffe P.A., Mitrophanous K.A., Elliot E.A., Sang H.M. Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS*, 2007, 104(6): 1771-1776 (doi: 10.1073/pnas.0610401104).
18. Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R., Park Y.Y., Lee Y.M., Suh H.S., Park Y.S., Lee H.T., Kim J.H., Roh J.Y., Kim N.H., Kim T. Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Molecular Reproduction and Development*, 2008, 75(7): 1120-1126 (doi: 10.1002/mrd.20860).
19. Kamihira M., Ono K., Esaka K., Nishijima K., Kigaku R., Komatsu H., Yamashita T., Kyogoku K., Iijima S. High-level expression of single-chain Fv-Fc fusion protein in serum and egg white of genetically manipulated chickens by using a retroviral vector. *Journal of Virology*, 2005, 79(17): 10864-10874 (doi: 10.1128/JVI.79.17.10864-10874.2005)
20. Kwon S.C., Choi J.W., Jang H.J., Shin S.S., Lee S.K., Park T.S., Choi I.Y., Lee G.S., Song G., Han J.Y. Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biology of Reproduction*, 2010, 82: 1057-1064 (doi: 10.1095/biolreprod.109.081687).
21. Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K., Okino Y., Inayoshi Y., Kojima Y., Ono K., Motonoto M., Miyake K., Kawabe Y., Kyogoku K., Yamashita T., Kamihira M., Iijima S. Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2012, 113(2): 146-153 (doi: 10.1016/j.jbiosc.2011.10.006).
22. Li W.R., Liu C.X., Zhang X.M., Chen L., Peng X.R., He S.G., Lin J.P., Han B, Wang L.Q., Huang J.C., Liu M.J. CRISPR/Cas9-mediated loss of FGF5 function increases wool staple length in sheep. *FEBS Journal*, 2017 284(17): 2764-2773 (doi: 10.1111/febs.14144).
23. Wang X., Niu Y., Zhou J., Zhu H., Ma B., Yu H., Yan H., Hua J., Huang X., Qu L., Chen Y. CRISPR/Cas9-mediated MSTN disruption and heritable mutagenesis in goats causes increased body mass. *Animal Genetics*, 2018, 49(1): 43-51 (doi: 10.1111/age.12626).
24. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. Applications of avian transgenesis. *ILAR Journal*, 2010, 51(4): 353-361 (doi: 10.1093/ilar.51.4.353).
25. Véron N., Qu Z., Kipen P.A.S., Hirst C.E., Marcelle C. CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental Biology*, 2015, 407(1): 68-74 (doi: 10.1016/j.ydbio.2015.08.007).
26. Park T.S., Lee H.J., Kim K.H., Kim J.-S., Han J.Y. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *PNAS*, 2014, 111(35): 12716-12721 (doi: 10.1073/pnas.1410555111).
27. Cooper C.A., Challagulla A., Jenkins K.A., Wise T.G., O'Neil T.E., Morris K.R., Tizard M.L., Doran T.J. Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Research*, 2017, 26: 331-347 (doi: 10.1007/s11248-016-0003-0).
28. Lee J., Kim D. H., Lee K. Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21: 1504 (doi: 10.3390/ijms21041504).
29. Benavides F., Oberyszyn T.M., Van Buskirk A.M., Reeed V.E., Kusewit D.F. The hairless mouse in skin research. *Journal of Dermatological Science*, 2009, 53(1): 10-18 (doi: 10.1016/j.jdermsci.2008.08.012).
30. Wells K.L., Hadad Y., Ben-Avraham D., Hillel J., Cahaner A., Headon D.J. Genome-wide SNP scan of pooled DNA reveals nonsense mutation in *FGF20* in the scaleless line of featherless chickens. *BMC Genomics*, 2012, 13: 257 (doi: 10.1186/1471-2164-13-257).
31. Ran F., Hsu P., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*, 2013, 8: 2281-2308 (doi: 10.1038/nprot.2013.143).
32. Inoue H., Nojima H., Okayama H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene*, 1990, 96(1): 23-28 (doi: 10.1016/0378-1119(90)90336-P).
33. Volkova N.A., Bagirov V.A., Tomgorova E.K., Vetokh A.N., Volkova L.A., Zinov'eva N.A. Isolation, cultivation and characterization of quail primordial germ cells. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2017, 52(2): 261-267 (doi: 10.15389/agrobiology.2017.2.261eng).
34. Dimitrov L., Pedersen D., Ching K.H., Yi H., Collarini E. J., Izquierdo S., van de Lavoie M.-C., Leighton P.A. Germline gene editing in chickens by efficient CRISPR-mediated homologous recombination in primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2016, 11: e0154303 (doi: 10.1371/journal.pone.0154303).
35. Taylor L., Carlson D.F., Nandi S., Sherman A., Fahrenkrug S.C., McGrew M.J. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development*, 2017, 144: 928-934 (doi: 10.1242/dev.145367).