

Обзоры, проблемы

УДК 636.5:573.6.086.83:577.21

doi: 10.15389/agrobiology.2021.6.1015rus

**РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОМА СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННОЙ ПТИЦЫ:
СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
В ПТИЦЕВОДСТВЕ***
(обзор)Н.А. ВОЛКОВА , А.Н. ВЕТОХ, Н.А. ЗИНОВЬЕВА

В настоящее время достигнут значительный прогресс в области генетической модификации сельскохозяйственной птицы. Разработаны методы и методические подходы по введению рекомбинантных генов в клетки птиц. Их эффективность варьирует в зависимости от объекта исследований, клеток-мишеней, выбранных для введения рекомбинантной ДНК, и способа их трансформации. В качестве клеток-мишеней для внесения направленных модификаций рассматриваются клетки бластодермы, примордиальные зародышевые клетки, сперматогонии, спермии, клетки яйцевода. Генетическую трансформацию клеток-мишеней можно осуществить посредством ретровирусных, лентивирусных и аденовирусных векторов, электропорации, липофекции. Выделяют три основные стратегии создания генетически модифицированной птицы: введение генетических конструкций непосредственно в эмбрион (J. Love с соавт., 1994; Z. Zhang с соавт., 2012) или в отдельные органы и ткани взрослых особей (Д.В. Белоглазов с соавт., 2015; S. Min с соавт., 2011); трансфекция клеток-мишеней в культуре *in vitro* и их последующая трансплантация в эмбрион или органы-мишени (М.-С. van de Lavoie с соавт., 2006; B. Benesova с соавт., 2014); трансформация спермиев *in vitro* и осеменение самок трансформированной спермой (E. Harel-Markowitz с соавт., 2009). Эти подходы применялись при разработке методов редактирования генома клеток птиц. Изучена возможность модификации клеток птиц посредством различных систем редактирования, в частности ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats). К перспективным направлениям использования этой технологии в птицеводстве относятся изучение функций генов (N. Véron с соавт., 2015), получение рекомбинантных протеинов в составе яичного белка (I. Oishi с соавт., 2018), улучшение хозяйственно ценных и продуктивных качеств (J. Ahn с соавт., 2017), повышение устойчивости к инфекционным заболеваниям (A. Koslová с соавт., 2020; R. Hellmich с соавт., 2020). С помощью технологии редактирования генома получены куры с нокаутом генов тяжелой цепи иммуноглобулина (B. Schusser с соавт., 2013; L. Dimitrov с соавт., 2016), овомуцина (I. Oishi с соавт., 2016), миостатина (G.-D. Kim с соавт., 2020), а также с интегрированным геном бета-интерферона человека (I. Oishi с соавт., 2018). Выведены перепела с нокаутом генов миостатина (J. Lee с соавт., 2020) и меланофилина (J. Lee с соавт., 2019). В ряде исследований показана простота, безопасность и доступность системы редактирования CRISPR/Cas9 для модификации генома сельскохозяйственной птицы, что позволяет рассматривать эту систему как эффективный инструмент для создания и коммерческого использования пород и линий птиц с улучшенными качествами в рамках реализации крупномасштабных селекционных программ по повышению качества птицеводческой продукции. В настоящем обзоре рассмотрены основные методы и методические подходы по генетической модификации сельскохозяйственной птицы, в том числе с привлечением различных систем редактирования генома, а также основные направления и перспективы применения этой технологии в птицеводстве.

Ключевые слова: куры, перепела, трансгенез, геномное редактирование, CRISPR/Cas9, примордиальные зародышевые клетки, половые клетки.

Сельскохозяйственная птица, в частности куры и перепела, — удобный и доступный объект для проведения разнообразных исследований и решения задач в области биологии развития, медицины, ветеринарии (1, 2). В отличие от крупных сельскохозяйственных животных, птица имеет короткий генерационный интервал, что значительно сокращает время на выведение линий или популяций особей с определенными признаками, представляющими интерес как в рамках отдельных исследований, так и для решения более масштабных задач. Схожесть структуры гликозилирования

* Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда, грант № 21-66-00007.

белка у птиц и человека, а также высокая яичная продуктивность, стерильность и доступность яиц позволяют рассматривать птиц в качестве эффективной продуктивной платформы для производства рекомбинантных белков (3). Особенно это актуально в случае рекомбинантных продуктов, которые нельзя получить, используя трансгенных млекопитающих (если такие продукты для них токсичны).

Следует отметить, что методы, применяемые для модификации генома млекопитающих, в большинстве случаев малоэффективны для трансгенеза сельскохозяйственной птицы. Это связано прежде всего с особенностями физиологии, репродукции и биологии развития птиц (4). В отличие от млекопитающих, у птиц развитие эмбрионов в репродуктивных органах самки протекает только на ранних стадиях эмбриогенеза. К моменту снесения яйца непосредственно после кладки эмбрион состоит приблизительно из 60000 морфологически недифференцированных плюрипотентных клеток (5). Дальнейшее развитие эмбриона происходит вне организма самки при создании соответствующих условий окружающей среды. Особенности эмбрионального развития птиц существенно затрудняют использование традиционного метода выведения трансгенных животных — микроинъекции ДНК в пронуклеус зигот. Лимитирующими факторами также становятся трудности в точности определения овуляции, большое количество желтка в яйцеклетке, сильное уплотнение цитоплазмы. Вместе с тем продолжительный период эмбрионального развития птиц вне организма самки облегчает доступ к эмбрионам для проведения генно-инженерных манипуляций.

К настоящему времени разработано и предложено достаточно большое число методических подходов по генетической модификации клеток птиц, на основе которых были разработаны и оптимизированы отдельные этапы технологии редактирования генома с использованием различных систем, в частности ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nucleases) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats) (6, 7). Эта технология применяется в птицеводстве при создании клеточных линий и особей с нокаутом или вставкой отдельных генов при изучении их функций (8), получении рекомбинантных протеинов в составе яичного белка, улучшении хозяйственно полезных признаков и качества птицеводческой продукции (9, 10), повышении устойчивости к инфекционным заболеваниям (11, 12).

Цель настоящего обзора — обобщение данных об основных достижениях в области редактирования генома сельскохозяйственной птицы и перспективах их использования в птицеводстве.

Системы редактирования генома. Технология геномного редактирования предполагает внесение адресных изменений в целевой участок генома с использованием сайт-специфических нуклеаз (6, 13). Наиболее распространены цинк-пальцевые нуклеазы (ZFN), TALE-ассоциированные нуклеазы (TALEN) и CRISPR/Cas9 (14, 15). Принцип их действия основан на внесении в интересующий участок генома двуцепочечных разрывов, которые в последующем подвергаются репарации посредством негомологичного соединения концов или гомологичной рекомбинации (16, 17).

В первом случае репарация двуцепочечных разрывов приводит к образованию инсерций или делеций в месте разрыва, во втором для восстановления ДНК применяют искусственно введенную генетическую конструкцию, имитирующую сестринскую хроматиду (18). Делеции и инсерции приводят к выключению (нокауту) генов, что представляет интерес при изучении их функций, а также при производстве животноводческой продукции

с улучшенными качествами (например, низкоаллергенных яиц). Введение донорской ДНК (генетических конструкций) посредством гомологичной рекомбинации позволяет вносить дополнительную информацию в геном.

Системы редактирования ZFN и TALEN более затратные и трудоемкие по сравнению с CRISPR/Cas9. При использовании нуклеаз ZFN и TALEN чаще отмечаются нецелевые эффекты (7). Возможность автоматизированного подбора отдельных компонентов системы CRISPR/Cas9 с помощью различных онлайн-сервисов позволяет повысить специфичность внесения генетических изменений в целевой ген и значительно снизить вероятность нецелевых мутаций. К тому же компоненты системы могут быть сконструированы практически к любой последовательности геномной ДНК-мишени. В основе системы редактирования генома CRISPR/Cas9 лежит механизм естественной защиты (адаптивного иммунитета) бактерий и архей от фагов (19, 20). Эта система редактирования включает два основных компонента — нуклеазу Cas9 и направляющую (гидовую) РНК (gRNA, guide RNA). Направляющая РНК адресно связывается с целевым участком ДНК, который в последующем разрезается Cas9 (21–23). Образующиеся двуцепочечные разрывы ДНК в дальнейшем репарируются посредством гомологичной или негомологичной рекомбинации в зависимости от целей эксперимента (24, 25). Для внесения небольших делеций или инсерций в ДНК-мишень с целью нокаута гена берут одну направляющую РНК, специфичную для этого участка ДНК, и Cas9. В случае необходимости выключения нескольких генов используют смесь направляющих РНК и нуклеазу Cas9. Для включения донорской ДНК в определенный участок генома (например, для получения продуцентов рекомбинантных белков) наряду с направляющей РНК и нуклеазой в клетку вводят генетическую конструкцию для гомологичной рекомбинации, представляющую собой фрагмент встраиваемой ДНК, фланкированный гомологичными разрывами последовательностями (18, 26).

Системы редактирования генома на основе CRISPR/Cas9 позволяют вносить в целевые гены сайт-специфические мутации, аналогичные встречающимся в природе генетическим вариантам (редактирование без следа). При редактировании генома клеток-мишеней посредством этой системы основные ее компоненты — Cas9 и направляющая РНК — могут экспрессироваться с одного вектора или быть введены в виде смеси. Наиболее распространен первый подход, основанный на применении плазмиды, кодирующей Cas9 и направляющую РНК. В этом случае исключается необходимость в нескольких компонентах для трансфекции, что упрощает процедуру редактирования и повышает стабильность результатов.

Методы генетической модификации клеток птиц. Для получения генетически модифицированных особей используют, как правило, комплекс методов и методических подходов, учитывая объект исследований, выбор клеток-мишеней для введения рекомбинантной ДНК и способ генетической трансформации клеток-мишеней. Можно выделить три основные стратегии создания генетически модифицированной птицы: введение генетических конструкций непосредственно в эмбрион (27, 28) или в органы и ткани взрослых особей (29, 30); трансфекция клеток-мишеней в культуре *in vitro* и их последующая трансплантация в эмбрион или органы-мишени (31, 32); трансформация спермиев *in vitro* и осеменение самок трансформированной спермой (33).

Эффективный инструмент для адресной доставки рекомбинантной ДНК в клетки эмбриона или органов и тканей взрослых особей — использование векторов на основе рекомбинантных вирусов, что связано с их при-

родной способностью самостоятельно проникать в клетки-мишени и с высокой результативностью интегрироваться в чужой геном.

С применением вирусных векторов были проведены первые успешные эксперименты по созданию трансгенной птицы. В 1987 году D.W. Salter с соавт. (34) были получены трансгенные куры посредством введения ретровирусного вектора на основе вируса лейкоза птиц (avian leukosis virus, ALV) в субзародышевую полость эмбрионов на X стадии. Эффективность передачи трансгена потомству составила 1-11 %. В дальнейшем была показана возможность создания трансгенной птицы с использованием ретровирусных векторов на основе вирусов саркомы Рауса (35), ретикулоэндотелиоза (reticuloendotheliosis virus, REV) (36), некроза селезенки птиц (37), лейкоза мышей Молони (Moloney murine leukemia virus, MoMLV) (38, 39). К настоящему времени созданы трансгенные куры с интегрированными генами, кодирующими β -галактозидазу, LacZ (37), β -лактамазу (40, 41), зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein, GFP) (42), биспецифические антитела (43), гормон роста (44), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (39), интерферон α -2b (45).

Применение лентивирусных векторов позволило повысить эффективность трансгенеза сельскохозяйственной птицы (46). M.J. McGrew с соавт. (47) посредством лентивирусной трансфекции клеток бластодермы эмбрионов на X стадии получили трансгенных кур с интегрированными генами *LacZ* и *eGFP*. Эффективность передачи трансгена потомству составила 4-45 %. В дальнейшем с использованием лентивирусных векторов были созданы трансгенные куры и перепела, продуцирующие рекомбинантные белки, в частности β -интерферон человека hIFN β 1 (48), биспецифические антитела (48, 28), GFP (49, 50), антагонист рецептора интерлейкина 1 (rhIL1RN) (51), лизоцим человека (52), α -дефензин HNP4 (human neutrophil defensin 4) (53).

Необходимо отметить, что при введении вирусных векторов в субзародышевую полость эмбрионов на X стадии трансгенная птица оказывается мозаиком, и для создания генеративной особи требуются дальнейшие скрещивания. В связи с этим ключевым моментом становится результативность трансформации клеток репродуктивных органов самцов и самок. Эта проблема может быть решена посредством направленной модификации половых клеток, что позволяет целенаправленно воздействовать на конкретные клетки-мишени, полностью нивелируя риски, связанные с созданием трансгенных особей-мозаиков, от которых в дальнейшем невозможно получение трансгенного потомства.

Благодаря культивированию эмбриональных и сперматогенных клеток *in vitro* можно использовать разнообразные приемы введения рекомбинантной ДНК в клетки-мишени с помощью безопасных систем доставки генов. Использование генетически модифицированных половых клеток гарантирует наличие в ооците после оплодотворения одной копии встроенной в определенный локус конструкции. Интегрированная в геном клеток-мишени рекомбинантная ДНК может устойчиво передаваться в ряде поколений. Манипуляции на взрослых особях значительно сокращают время и материальные затраты на получение генетически модифицированного потомства.

При создании генетически модифицированной сельскохозяйственной птицы клетками-мишенями могут служить как зрелые половые клетки (33), так и их предшественники — примордиальные зародышевые клетки (ПЗК) (54, 55) и сперматогонии (56, 57). Использование первичных и ранних половых клеток представляет наибольший интерес (58, 59). При даль-

нейшем развитии они могут сформировать значительную популяцию трансформированных зрелых половых клеток (60).

ПЗК в процессе эмбриогенеза могут дифференцироваться как в мужские, так и в женские половые клетки, что значительно расширяет возможности реализации потенциала ПЗК при создании генетически модифицированных и химерных особей с заданными свойствами. У эмбрионов птиц примордиальные зародышевые клетки образуются в эпибласте и мигрируют через гипобласт в кровь, затем в гонады (61). При введении донорских ПЗК в дорсальную аорту эмбрионов-реципиентов в период миграции собственных ПЗК из крови в гонады возможна колонизация гонад реципиентов донорскими клетками.

Сперматогонии служат предшественниками мужских половых клеток (56). Наибольший интерес представляют сперматогонии типа А, которые относят к стволовым клеткам семенников. Уникальное свойство самообновления открывает широкие возможности реализации потенциала этих клеток при выведении генетически модифицированной сельскохозяйственной птицы. Сперматогонии формируют немногочисленную популяцию клеток, располагающуюся на базальной мембране семенных канальцев. Процесс их многократного самообновления и дальнейшей дифференцировки обеспечивает непрерывность сперматогенеза с образованием высокоспециализированных половых клеток — спермиев. Сперматогонии наиболее устойчивы к различным повреждающим факторам (часто только эти клетки выживают, в то время как остальные типы клеток сперматогенного эпителия погибают) и претерпевают постоянную репликацию, сохраняя численность в течение процесса, называемого обновлением состава стволовых клеток.

В настоящее время разработаны и оптимизированы подходы по получению и культивированию зародышевых (62, 63) и сперматогенных (64, 65) клеток птиц. Показана эффективность генетической трансформации этих клеток-мишеней при помощи различных систем доставки генов, таких как электропорация (66, 67), нуклеофекция (68), липосомальная трансфекция (69, 70), использование ретровирусных (71, 72) и лентивирусных векторов (28, 73, 74), катионных полимеров (30, 57), транспозонов (68, 75, 76).

ПЗК можно трансформировать двумя способами — в культуре *in vitro* и *in vivo* посредством введения генетических конструкций в дорсальную аорту эмбрионов в период миграции собственных ПЗК в гонады. Наряду с традиционными методами трансфекции клеток в культуре *in vitro* — электропорацией и липофекцией — в ряде работ представлены результаты генетической модификации ПЗК с использованием других методов доставки генов. Так, J. Macdonald с соавт. (75) для трансфекции ПЗК кур *in vitro* использовали транспозоны Tol2 и piggyBac. Эффективность трансфекции клеток-мишеней составила соответственно 5,4 и 25,5 %. Было показано формирование функциональных гамет из трансформированных донорских клеток, а также получено трансгенное потомство от первичных химер зародышевой линии. M. Naito с соавт. (68) получили и трансформировали *in vitro* посредством нуклеофекции культуру ПЗК кур с эффективностью 10 %. Трансформированную культуру ПЗК ввели эмбрионам-реципиентам. От выведенной после этих манипуляций птицы получили потомство. Наличие GFP установили у 1 из 270 особей.

Имеется ряд сообщений об эффективности трансформации ПЗК *in vivo* с получением химер зародышевой линии. Так, Z. Zhang с соавт. (28) предложили простой и эффективный способ создания трансгенных перепелов посредством инъекции лентивирусного вектора, содержащего репортер-

ный ген *eGFP*, в дорсальную аорту эмбрионов. Из 80 эмбрионов авторы получили 48 химер G_0 (60 %). Наличие *eGFP* было подтверждено в большинстве органов и тканей химерной птицы, в том числе в половых клетках самцов. Эффективность получения трансгенного потомства от химерных самцов достигала 13 %. S.G. Tuack с соавт. (69) и L.S. Lambeth с соавт. (76) для генетической трансформации ПЗК кур *in vivo* вводили рекомбинантную ДНК в комплексе с липофектаминам 2000 и транспозоном Tol2 непосредственно в дорсальную аорту эмбрионов кур. Были получены химеры F_0 по зародышевой линии и трансгенное потомство с экспрессией интегрированных рекомбинантных генов.

Z.-Q. Jiang с соавт. (73) для повышения эффективности трансфекции ПЗК *in vitro* и *in vivo* использовали лентивирусный вектор, конъюгированный с антителами к SSEA4 (stage-specific embryonic antigen-4), специфичными к белкам мембран ПЗК. Предложенный подход позволил повысить целевую эффективность трансдукции клеток птиц на 30,0-46,7 %. У 50,0-66,7 % эмбрионов отмечалась экспрессия GFP в гонадах.

Трансформацию сперматогенных клеток птиц, как и ПЗК, можно осуществлять в культуре *in vitro* и *in vivo* посредством введения генетических конструкций в паренхиму семенника самцов. В последнем случае используют, как правило, вирусные векторы. В ряде работ рассмотрена возможность применения невирусных систем доставки генов. Так, S. Min с соавт. (30) и B. Li с соавт. (57) изучили эффективность катионного полимера SofastTM для трансформации сперматогенных клеток петухов *in vivo*. Этот препарат в комплексе с генетической конструкцией инъецировали непосредственно в паренхиму семенника. S. Min с соавт. (30) выводили кур, устойчивых к вирусу птичьего гриппа. Эффективность трансформации сперматогенных клеток составила 72,2 %. Наличие трансгена было установлено в 10 % сперматозоидов и в крови 7,8 % потомства F_1 . B. Li с соавт. (57) для генетической трансформации сперматогенных клеток применяли генетическую конструкцию, кодирующую репортерный ген GFP. При ее введении в комплексе с катионным полимером в семенники петухов результативность трансформации клеток-мишеней достигала 19,1 %.

Таким образом, технология создания генетически модифицированных особей с использованием ПЗК и сперматогониев в качестве донорских клеток предполагает их выделение, трансформацию и трансплантацию в гонады реципиентов с последующим получением потомства с внесенными признаками (77, 78). Результативность колонизации донорских клеток в гонады реципиентов показана в ряде работ при использовании как донорских ПЗК (78, 79), так и сперматогониев (32, 81, 82). Эффективность трансплантации донорских ПЗК и сперматогониев может быть повышена посредством предварительной подготовки реципиентов, направленной на элиминацию собственных зародышевых или сперматогенных клеток в гонадах под воздействием гамма-излучения (83, 84) или при химической стерилизации (85, 86). В последнем случае эффективен бусульфан, который представляет собой алкилирующий агент, вызывающий повреждение ДНК в клетках-мишенях, что приводит к выключению всех клеточных механизмов и разрушению клеток.

Основные методы и методические подходы, используемые в настоящее время для генетической модификации клеток птиц, представлены в таблице 1. Ниже рассмотрена их эффективность при редактировании генома сельскохозяйственной птицы в системах *in vitro* и *in vivo*.

1. Основные методы и методические подходы, используемые для генетической модификации клеток сельскохозяйственной птицы

Способ введения генетических конструкций	Клетки-мишени	Метод трансфекции	Источник
Введение непосредственно в эмбрион или органы и ткани взрослых особей	Клетки бластодермы Примордиальные зародышевые клетки Клетки яйцевода, сперматогенные клетки семенников	Вирусные векторы, липофекция Вирусные векторы, транспозоны, липофекция Вирусные векторы	(27, 34, 47) (28, 69, 76) (29, 74, 30)
Трансфекция донорских клеток-мишеней <i>in vitro</i> с их последующей трансплантацией реципиентам	Клетки бластодермы, примордиальные зародышевые клетки, сперматогонии	Вирусные векторы, липофекция, электропорация, нуклеофекция, транспозоны	(31, 32, 87, 88)
Трансформация спермиев и осеменение самок	Спермии	Липофекция, электропорация	(33)

Геномное редактирование сельскохозяйственной птицы. Проведен ряд успешных экспериментов по модификации клеток птиц с помощью различных систем редактирования в направлении нокаута отдельных генов (89). На клеточных линиях кур DF-1 и DT-40 изучены функции ряда генов, связанных с биологией развития эмбрионов и патогенезом эмбриональных заболеваний (90), гаметогенезом (91), устойчивостью к инфекционным заболеваниям (92). Разработаны и оптимизированы методические подходы по внесению мутаций (нокауту) в целевые гены (93), в том числе связанные с ростом, развитием и продуктивными качествами (94).

K.D. Abu-Bonsrah с соавт. (90) получили две линии клеток кур с нокаутом генов *HIRA*, *TYRP1*, *DICER*, *MBD3*, *EZH2*, *RET* с помощью системы CRISPR/Cas9. Показано, что с использованием этой системы редактирования возможно внесение в последовательность целевых генов делеции размером более 75 т.п.н. Посредством электропорации *in vivo*, выполненной на эмбрионах кур, внесены генетические изменения в последовательность гена *DGCR8* в нервных клетках. В генетически измененных клетках установлено снижение экспрессии *DGCR8*, а также ассоциированных с ним генов *Drosha*, *YPEL1* и *Ngn2*. Отмечены морфологические различия в структуре нервной ткани и сердечной мышцы у трансфицированных эмбрионов.

Y. Zhang с соавт. (91) изучили влияние гена *Stras8* на процесс дифференцировки эмбриональных стволовых клеток в сперматогониях. С этой целью плазмиду Cas9/gRNA ввели в клетки линии DF-1 и эмбриональные стволовые клетки. Эффективность внесения мутаций в целевой ген составила 25 % в клетках DF-1 и 23 % в эмбриональных стволовых клетках. Показано, что нокаут гена *Stras8* блокирует дифференцировку эмбриональных стволовых клеток в сперматогониях *in vitro*. Y. Bai с соавт. (93) использовали систему CRISPR/Cas9 для внесения генетических изменений в последовательность генов овальбумина *PPARG* и *ATP5F1E* в клеточной линии кур DF-1. Частота мутаций варьировала от 0,5 до 3,0 %. Культивирование клеток после трансфекции на селективной среде, содержащей пуромицин, повысило эффективности отбора генетически модифицированных клеток до 95 %. J.H. Lee с соавт. (94) на клеточной линии DF-1 рассмотрели возможность использования никазы Cas9-D10A для внесения сайт-специфических мутаций в целевой участок ДНК-мишени. В качестве целевого был выбран ген миостатина. Генотипирование трансфицированных клеток подтвердило наличие мутаций в целевом сайте ДНК-мишени. Размер внесенных делеций варьировал от 2 до 39 нуклеотидов. При этом анализ шести нецелевых сайтов не выявил наличия в них каких-либо неспецифических мутаций. Также не отмечалось фенотипических различий между нормальными и модифи-

цированными клетками. Вестерн-блоттинг не показал наличия белка мио-статина в модифицированных клетках.

Наряду с сообщениями о редактировании генома клеточных линий имеется ряд публикаций о получении сельскохозяйственной птицы с нокаутом или вставкой генов. Исследования проведены на курах и перепелах. В частности, В. Schusser с соавт. (95), используя ПЗК, посредством гомологичной рекомбинации вывели кур с нокаутом гена тяжелой цепи иммуноглобулина. У птицы, гомозиготной по нокауту этого гена, не синтезировались антитела и не происходило развития В-клеток. При этом миграция предшественников В-клеток в фабрициеву сумку сохранялась, в то время как формирование зрелых В-клеток и их миграция из фабрициевой сумки были заблокированы. Развитие и функциональная активность других типов клеток иммунной системы оставались в норме. Куры с нокаутом гена тяжелой цепи иммуноглобулина ввиду отсутствия у них периферической популяции В-клеток служат уникальной экспериментальной моделью для изучения иммунного ответа птиц на инфекционные заболевания, а также представляют интерес для решения ряда задач в области вирусологии, биологии развития и биотехнологии. L. Dimitrov с соавт. (96) показали возможность изменения гена тяжелой цепи иммуноглобулина кур посредством модификации ПЗК *in vitro* с применением системы CRISPR/Cas9. В результате были получены четыре линии ПЗК, которые инъецировали в эмбрионы. Эффективность передачи внесенных модификаций от химерной птицы зародышевой линии потомству варьировала от 0 до 96 %.

С использованием системы редактирования TALEN L. Taylor с соавт. (97) вывели кур с нокаутом локуса *DDX4* на Z-половой хромосоме для изучения роли этого гена в формировании половых клеток. Ген *DDX4* — ключевая детерминанта зародышевых клеток у многих видов животных. Как предполагается, он контролирует образование зародышевых клеток у птиц. Эффективность его нокаута в ПЗК кур составила 8,1 %. Были внесены большие делеции размером 30 т.п.н, охватывающие весь локус *DDX4*. После редактирования *in vitro* ПЗК вводили эмбрионам-реципиентам и получили химерную птицу зародышевой линии. Потомство от этой птицы было гомозиготным по нокауту гена *DDX4*. У особей отмечали закладку и развитие ПЗК в гонадах эмбрионов, однако с началом мейоза развитие репродуктивных клеток блокировалось, приводя к бесплодию у самок.

Нокаут генов яичного белка рассматривается как возможность снижения аллергенности куриных яиц. Это особенно актуально при производстве продукции для лиц, чувствительных к яичному белку. В 2014 году T.S. Park с соавт. (98) получили кур с нокаутом гена овальбумина посредством генетической модификации ПЗК системой редактирования TALEN. В целевой ген были внесены делеции, что привело к сдвигу рамки считывания и, как следствие, к выключению функции гена овальбумина. I. Oishi с соавт. (99) создали кур с нокаутом гена овомуцина (*OVM*). В качестве клеток-мишеней для редактирования генома системой CRISPR/Cas9 применяли ПЗК, трансфицированные в культуре *in vitro* и трансплантированные эмбрионам-реципиентам. Химеры G₀ были использованы для последующих скрещиваний с отбором кур G₂, гомозиготных по нокауту гена *OVM*. От двух из трех химерных петухов G₀ получили потомство с делецией в гене *OVM*.

Позднее той же научной группой с использованием аналогичного подхода были выведены куры — продуценты бета-интерферона человека (*hIFN-β*) посредством включения гена *hIFN-β* в локус гена овальбумина (100). Такая птица продуцировала 3,5 мг/мл *hIFN-β* в составе яичного

белка. При этом самки (в отличие от самцов) оказались бесплодны. Биоактивность и продукция рекомбинантного белка hIFN- β у потомства сохранялась на уровне предыдущих поколений, что подтверждает перспективность включения целевых генов в локус гена овальбумина кур для создания особей — продуцентов рекомбинантных протеинов в составе яичного белка для промышленного применения.

Х. Qin с соавт. (101) оценили результативность использования аденовирусного вектора для доставки системы CRISPR/Cas9 в клетки кур с целью нокаута гена овальбумина (*OV*) и интеграции в этот локус гена эпидермального фактора роста человека (*hEGF*). Эффективность нокаута гена *OV* и экспрессия интегрированного гена *hEGF* была показана на культуре первичных клеток яйцевода кур. Биологическая активность секретируемого белка hEGF подтверждена на клетках Hela: пролиферация клеток при включении в среду культивирования этого белка соответствовала аналогичным показателям, установленным для коммерческого препарата hEGF. Также был проведен нокаут гена *OV* с интеграцией гена *hEGF* в клетках бластодермы *in vitro* и *in vivo*. Получены эмбрионы кур с внесенными генетическими изменениями в клетках гонад. Эффективность получения таких эмбрионов была выше при трансплантации модифицированных *in vitro* клеток бластодермы в зародышевый диск эмбрионов-реципиентов, чем при непосредственной инъекции аденовирусного вектора в эмбрионы *in vivo*. Доля модифицированных зародышевых клеток в гонадах эмбрионов также была выше при использовании модифицированных *in vitro* бластодермальных клеток.

Опубликован ряд работ по успешному редактированию генома кур и перепелов с нокаутом гена миостатина (*MSTN*). Белок миостатин подавляет рост и развитие мышечной ткани. Нокаут гена *MSTN* представляет интерес при создании линий с повышенной скоростью роста мышечной ткани. Так, G.-D. Kim с соавт. (102) получили кур с нокаутом гена *MSTN* посредством введения системы редактирования в ПЗК. Для внесения делеций в целевой участок ДНК-мишени использовали никазу D10A-Cas9. После введения модифицированных *in vitro* ПЗК в эмбрионы у 7 из 52 цыплят были идентифицированы делеции от 5 до 39 нуклеотидов в локусе гена *MSTN*. На этой птице проводили дальнейшие скрещивания с целью выведения кур, гомозиготных по нокауту гена *MSTN*. Были изучены особенности роста и развития мышечной ткани. У птицы с нокаутом *MSTN* отмечалось непрерывное увеличение массы тела до 18-недельного возраста, в то время как у немодифицированных особей скорость роста после 13 нед снижалась. Сравнительная оценка показателей мясной продуктивности выявила у особей с нокаутом гена *MSTN* увеличение массы окорочков на 55,3 % по сравнению с контролем. При этом масса абдоминального жира была на 77,1 % ниже. Сравнение массы внутренних органов, включая сердце, селезенку, желудок и печень, не выявило значительных различий между генетически модифицированными и немодифицированными курами.

J. Lee с соавт. (103) получили перепелов с нокаутом гена миостатина (*MSTN*) посредством инъекции рекомбинантного аденовируса, содержащего CRISPR/Cas9, в зародышевый диск (клетки бластодермы). У птицы были идентифицированы делеции размером 3 п.н. Мутация не вызывала сдвиг рамки считывания и приводила к делеции цистеина в пропептидной области *MSTN*. У перепелов, гомозиготных по нокауту гена *MSTN*, отмечалось значительное увеличение массы тела и мышечной ткани с гиперплазией мышц по сравнению с перепелами, гетерозиготными по нокауту гена

MSTN и дикого типа. Кроме того, у особей с нокаутом гена *MSTN* снижалась доля абдоминального жира и увеличивалась массы сердца по сравнению с перепелами дикого типа. Той же научной группой выведены перепела с нокаутом гена меланофилина (*MLPH*), связанного с пигментацией пера (104). Аденовирусный вектор, содержащий компоненты системы CRISPR/Cas9, вводили в подзародышевую полость бластодермы эмбрионов. Из 100 инъектированных эмбрионов получили 11 перепелов, из них пять несли мутацию в гене *MLPH* в репродуктивных клетках. Эффективность передачи мутации потомству варьировала от 2,4 до 10,0 %. В потомстве одной модифицированной птицы F₀ выявили две разные мутации в локусе *MLPH*. Были установлены различия в фенотипе модифицированных перепелов с нокаутом гена *MLPH*. Гомозиготные по нокауту гена *MLPH* перепела имели серое оперение, в то время как у перепелов, гетерозиготных по внесенной мутации, и у дикого типа оперение было темно-коричневым.

Наряду с применением технологии геномного редактирования для улучшения хозяйственно полезных признаков у сельскохозяйственной птицы представляет интерес создание особей, устойчивых к инфекционным заболеваниям, например к лейкозу птиц (avian leukosis virus, ALV). Это заболевание сложно поддается контролю и профилактике ввиду отсутствия эффективных вакцин. Выделяют несколько подгрупп ALV. R. Hellmich с соавт. (12) предприняли попытку получить кур, устойчивых к подгруппе J вируса лейкоза птиц (ALV-J), вызывающего миелоидный лейкоз и образование опухолей. С этой целью с помощью системы CRISPR/Cas9 в локус *chNHE1* была внесена делеция по триптофану 38 (W38). Аминокислота W38 в *chNHE1* играет решающее значение для проникновения вируса в клетку, что делает ее предпочтительной мишенью для нокаута с целью повышения устойчивости к патогену. Внесенная в геном кур генетическая модификация полностью защищала клетки от заражения вирусом ALV-J. Делеция W38 не оказала существенного негативного влияния на развитие или общее функциональное состояние генетически модифицированных особей. В целом создание особей, устойчивых к ALV-J, посредством точного редактирования генов позволяет рассматривать такой подход в качестве альтернативной стратегии борьбы с болезнями домашней птицы.

Основные достижения в редактировании геномов разных видов сельскохозяйственной птицы суммированы в таблице 2.

2. Основные достижения в редактировании генома сельскохозяйственной птицы

Вид птицы	Целевой ген	Клетки-мишени	Метод трансфекции клеток-мишеней	Система редактирования генома	Источник
Курица	<i>IgH</i>	ПЗК	Электропорация	CRISPR/Cas9	(96)
	<i>DDX4</i>	ПЗК	Электропорация	TALEN	(97)
	<i>OVM</i>	ПЗК	Липофекция	CRISPR/Cas9	(99)
	<i>hIFN-β</i>	ПЗК	Липофекция	CRISPR/Cas9	(100)
	<i>MSTN</i>	ПЗК	Липофекция	D10A-Cas9B	(102)
	<i>OV</i>	ПЗК	Липофекция	TALEN	(98)
	<i>chNHE1</i>	ПЗК	Электропорация	CRISPR/Cas9	(12)
Перепел	<i>MSTN</i>	Клетки бластодермы	Аденовирусный вектор	CRISPR/Cas9	(103)
	<i>MLPH</i>	Клетки бластодермы	Аденовирусный вектор	CRISPR/Cas9	(104)

Примечание. ПЗК — примордиальные зародышевые клетки.

Таким образом, в настоящее время достигнут определенный прогресс в редактировании генома сельскохозяйственной птицы. Отработаны и оптимизированы методические подходы и приемы по модификации клеток птиц с помощью различных систем редактирования генов, в частности ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9. Выведены куры и перепела с нокаутом ряда генов с целью изучения их функций, улучшения продуктивных качеств

птицы, повышения устойчивости к инфекционным заболеваниям, получения рекомбинантных протеинов в составе белка яиц. В ряде исследований показана простота, безопасность и доступность системы редактирования CRISPR/Cas9 при модификации генома сельскохозяйственной птицы, что позволяет рассматривать эту систему как эффективный инструмент для создания и коммерческого использования пород и линий птиц с улучшенными качествами.

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

Поступила в редакцию
27 сентября 2021 года

Sel'skokhozyaystvennaya biologiya [Agricultural Biology], 2021, V. 56, № 6, pp. 1015-1030

GENOME EDITING: CURRENT STATE AND PROSPECTS FOR USE IN POULTRY (review)

N.A. Volkova ✉, *A.N. Vetokh*, *N.A. Zinovieva*

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

ORCID:

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

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

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

The authors declare no conflict of interests

Acknowledgements:

Supported financially by Russian Science Foundation, grant No. 21-66-00007

Received September 27, 2021

doi: 10.15389/agrobiol.2021.6.1015eng

Abstract

To date, significant progress has been made in the poultry's genetic modification. A sufficiently large number of methods and methodological approaches have been developed for the introduction of recombinant genes into bird cells. The efficiency of using these approaches for genetic modification of bird cells varies depending on the object of research, the selected target cells for the introduction of recombinant DNA and the method of their transformation. Blastoderm cells, primordial germ cells, spermatogonia, sperm cells, and oviduct cells can serve as target cells for gene modifications. Using retroviral, lentiviral and adenoviral vectors, electroporation and lipofection, genetic transformation of these target cells can be carried out. In general, three main strategies for creating a genetically modified bird can be distinguished: i) the introduction of genetic constructs directly into the embryo (J. Love et al., 1994; Z. Zhang et al., 2012) or into individual organs and tissues of adults (D.V. Beloglazov et al., 2015; S. Min et al., 2011), ii) transfection of target cells in vitro and their subsequent transplantation into the embryo or target organs (M.-C. van de Lavoie et al., 2006; B. Benesova et al., 2014), and iii) sperm transformation in vitro and insemination of females with transformed sperm (E. Harel-Markowitz et al., 2009). These approaches were used to develop methods for editing the avian cell genome. A number of papers have studied the possibility of modifying bird cells using various editing systems, in particular, ZFN (zinc finger nuclease), TALEN (transcription activator-like effector nucleases), and CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced palindromic repeats). Promising areas of using this technology in poultry farming are the following: studying the genes functions (N. Véron et al., 2015), obtaining recombinant proteins in the egg white composition (I. Oishi et al., 2018), improving economically useful and productive qualities (J. Ahn et al., 2017), and increasing resistance to infectious diseases (A. Koslová et al., 2020; R. Hellmich et al., 2020). Chickens with knockout of genes of the heavy chain of immunoglobulin (B. Schusser et al., 2013; L. Dimitrov et al., 2016), ovomucin (I. Oishi et al., 2016), myostatin (G.-D. Kim et al., 2020), as well as an integrated human interferon beta gene (I. Oishi et al., 2018) were obtained using genome editing technology. Quail with knockout of myostatin genes (J. Lee et al., 2020) and melanophilin (J. Lee et al., 2019) were also obtained. A number of studies have shown the simplicity, safety and availability of using the CRISPR/Cas9 editing system for modifying the poultry genome. This allows us to consider this system as an effective tool for the creation and commercial use of breeds and lines of birds with improved qualities in the framework of the implementation of large-scale breeding programs aimed at improving the quality of the resulting poultry products.

Keywords: poultry, quail, chicken, transgenesis, genome editing, CRISPR/Cas9, primordial

REFERENCES

1. Ivarie R. Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends in Biotechnology*, 2003, 21(1): 14-19 (doi: 10.1016/S0167-7799(02)00009-4).
2. Amro W.A., Al-Qaisi W., Al-Razem F. Production and purification of IgY antibodies from chicken egg yolk. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 2018, 16(1): 99-103 (doi: 10.1016/j.jgeb.2017.10.003).
3. Lillico S.G., McGrew M.J., Sherman A., Sang H.M. Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs. *Drug Discovery Today*, 2005, 10(3): 191-196 (doi: 10.1016/S1359-6446(04)03317-3).
4. Stern C.D. The marginal zone and its contribution to the hypoblast and primitive streak of the chick embryo. *Development*, 1990, 109: 667-682.
5. Mozdziak P.E., Petite J.N. Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Developmental Dynamics*, 2004, 229(3): 414-421 (doi: 10.1002/dvdy.10461).
6. 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).
7. 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).
8. 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).
9. Ahn J., Lee J., Park J.Y., Oh K.B., Hwang S., Lee C.-W., Lee K. Targeted genome editing in a quail cell line using a customized CRISPR/Cas9 system. *Poultry Science*, 2017, 96(1): 1445-1450 (doi: 10.3382/ps/pew435).
10. 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).
11. Koslová A., Trefil P., Mucksová J., Reinišová M., Plachý J., Kalina J., Kučerová D., Geryk J., Krchlíková V., Lejšková B., Hejnar J. Precise CRISPR/Cas9 editing of the *NHE1* gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2020, 117(4): 2108-2112 (doi: 10.1073/pnas.1913827117).
12. 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).
13. 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).
14. Sander J.D., Joung J.K. CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting. *Nature Biotechnology*, 2014, 32(4): 347-355 (doi: 10.1038/nbt.2842).
15. Panda S.K., Wefers B., Ortiz O., Floss T., Schmid B., Haass C., Wurst W., Kühn R. Highly efficient targeted mutagenesis in mice using TALENs. *Genetics*, 2013, 195(3): 703-713 (doi: 10.1534/genetics.113.156570).
16. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. Increasing the efficiency of homology-directed repair for CRISPR-Cas9-induced precise gene editing in mammalian cells. *Nature Biotechnology*, 2015, 33: 543-548 (doi: 10.1038/nbt.3198).
17. Wefers B., Panda S.K., Ortiz O., Brandl C., Hensler S., Hansen J., Wurst W., Kühn R. Generation of targeted mouse mutants by embryo microinjection of TALEN mRNA. *Nature Protocols*, 2013, 8: 2355-2379 (doi: 10.1038/nprot.2013.142).
18. Menzorov A.G., Luk'yanchikova V.A., Korablev A.N., Serova I.A., Fishman V.S. *Vavilovskii zhurnal genetiki i seleksii*, 2016, 20(6): 930-944 (doi: 10.18699/VJ16.214) (in Russ.).
19. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D., Horvath P. CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 2007, 315(5819): 1709-1712 (doi: 10.1126/science.1138140).
20. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 2013, 339(6121): 819-823 (doi: 10.1126/science.1231143).
21. Anders C., Niewoehner O., Duerst A., Jinek M. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. *Nature*, 2014, 513: 569-573 (doi: 10.1038/nature13579).
22. Gonatopoulos-Pournatzis T., Aregger M., Brown K.R., Farhangmehr S., Braunschweig U.,

- Ward H.N., Ward H.N., Ha K.C.H., Weiss A., Billmann M., Durbic T., Myers C.L., Blencowe B.J., Moffat J. Genetic interaction mapping and exon-resolution functional genomics with a hybrid Cas9-Cas12a platform. *Nature Biotechnology*, 2020, 38: 638-648 (doi: 10.1038/s41587-020-0437-z).
23. Najm F.J., Strand C., Donovan K.F., Hegde M., Sanson K.R., Vaimberg E.W., Sullender M.E., Hartenian E., Kalani Z., Fusi N., Listgarten J., Younger S.T., Bernstein B.E., Root D.E., Doen J.G. Orthologous CRISPR-Cas9 enzymes for combinatorial genetic screens. *Nature Biotechnology*, 2018, 36(2): 179-189 (doi: 10.1038/nbt.4048).
 24. Pennisi E. The CRISPR craze. *Science*, 2013, 341(6148): 833-836 (doi: 10.1126/science.341.6148.833).
 25. Wilson L.O.W., Reti D., O'Brien A.R., Dunne R.A., Bauer D.C. High activity target-site identification using phenotypic independent CRISPR-Cas9 core functionality. *The CRISPR Journal*, 2018, 1(2): 182-190 (doi: 10.1089/crispr.2017.0021).
 26. Salsman J., Delleire G. Precision genome editing in the CRISPR era. *Biochemistry and Cell Biology*, 2017, 95: 187-201 (doi: 10.1139/bcb-2016-0137).
 27. Love J., Gribbin C., Mather C., Sang H. Transgenic birds by DNA microinjection. *Nat. Biotechnol.*, 1994, 12(1): 60-63 (doi: 10.1038/nbt0194-60).
 28. Zhang Z., Sun P., Yu F., Yan L., Yuan F., Zhang W., Wang T., Wan Z., Shao Q., Li Z. Transgenic quail production by microinjection of lentiviral vector into the early embryo blood vessels. *PLoS ONE*, 2012, 7(12): e50817 (doi: 10.1371/journal.pone.0050817).
 29. Beloglazov D.V., Volkova N.A., Volkova L.A., Zinov'eva N.A. Efficiency of local transgenesis of the oviductal cells in chicken as influenced by hormonal stimulation. *Sel'skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2015, 50(6): 729-735 (doi: 10.15389/agrobiology.2015.6.729eng).
 30. Min S., Qing S.Q., Hui Y.Y., Zhi F.D., Rong Q.Y., Feng X., Chun L.B. Generation of antiviral transgenic chicken using spermatogonial stem cell transfected in vivo. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10(70): 15678-15683 (doi: 10.5897/AJB11.040).
 31. van de Lavoie M.-C., Diamond J.H., Leighton P.A., Mather-Love C., Heyer B.S., Bradshaw R., Kerchner A., Hooi L.T., Gessaro T.M., Swanberg S.E., Delany M.E., Etches R.J. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature*, 2006, 441: 766-769 (doi: 10.1038/nature04831).
 32. Benesova B., Mucksova J., Kalina J., Trefil P. Restoration of spermatogenesis in infertile male chickens after transplantation of cryopreserved testicular cells. *British Poultry Science*, 2014, 55(6): 837-845 (doi: 10.1080/00071668.2014.974506).
 33. Harel-Markowitz E., Gurevich M., Shore L.S., Katz A., Stram Y., Shemesh M. Use of sperm plasmid DNA lipofection combined with REMI (restriction enzyme-mediated insertion) for production of transgenic chickens expressing *eGFP* (enhanced green fluorescent protein) or human follicle-stimulating hormone *Biology of Reproduction*, 2009, 80(5): 1046-1052 (doi: 10.1095/biolreprod.108.070375).
 34. Salter D.W., Smith E.J., Hughes S.H., Wright S.E., Crittenden L.B. Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line. *Virology*, 1987, 157(1): 236-240 (doi: 10.1016/0042-6822(87)90334-5).
 35. Chen H.Y., Garber E.A., Mills E., Smith J., Kopchick J.J., Dilella A.G., Smith R.G. Vectors, promoters, and expression of genes in chick embryos. *Journal of Reproduction and Fertility. Supplement*, 1990, 41: 173-182.
 36. Bosselman R.A., Hsu R.Y., Boggs T., Hu S., Bruszewski J., Ou S., Kozar L., Martin F., Green C., Jacobsen F., Nicolson M., Schultz J.A., Semon K.M., Rishell W., Stewart R.G. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*, 1989, 243(4890): 533-535 (doi: 10.1126/science.2536194).
 37. Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., Petite J.N. Development of transgenic chickens expressing bacterial beta-galactosidase. *Developmental Dynamics*, 2003, 226(3): 439-445 (doi: 10.1002/dvdy.10234).
 38. Mizuarai S., Ono K., Yamaguchi K., Nishijima M., Kamihira M., Iijima S. Production of transgenic quails with high frequency of germ-line transmission using VSV-G pseudotyped retroviral vector. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2001, 286(3): 456-463 (doi: 10.1006/bbrc.2001.5422).
 39. 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).
 40. Harvey A.J., Ivarie R. Validating the hen as a bioreactor for the production of exogenous proteins in egg white. *Poultry Science*, 2003, 82(6): 927-930 (doi: 10.1093/ps/82.6.927).
 41. 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(4): 396 (doi: 10.1038/nbt0402-396).
 42. Smith C.A., Roeszler K.N., Sinclair A.H. Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation*, 2009, 77(5): 473-482 (doi: 10.1016/j.diff.2009.02.001).

43. 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).
44. 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.jbi-osc.2011.10.006).
45. 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).
46. 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).
47. McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M., Lillico S.G., Gilhooley H.J., Kingsman A.J., Mitrophanous K.A., Sang H. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Reproduction*, 2004, 5(7): 728-733 (doi: 10.1038/sj.embor.7400171).
48. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(6): 1771-1776 (doi: 10.1073/pnas.0610401104).
49. Chapman S.C., Lawson A., Macarthur W.C., Wiese R.J., Loechel R.H., Burgos-Trinidad M., Wakefield J.K., Ramabhadran R., Mauch T.J., Schoenwolf G.C. Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentiviral vector. *Development*, 2005, 132(5): 935-940 (doi: 10.1242/dev.01652).
50. 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).
51. 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(6): 1057-1064 (doi: 10.1095/biolreprod.109.081687).
52. Cao D.N., Wu H.Y., Li Q.Y., Sun Y.M., Liu T.X., Fei J., Zhao Y.F., Wu S., Hu X.X., Li N. Expression of recombinant human lysozyme in egg whites of transgenic hens. *PLoS ONE*, 2015, 10(2): e0118626 (doi: 10.1371/journal.pone.0118626).
53. Liu T.X., Wu H.Y., Cao D.N., Li Q.Y., Zhang Y.Q., Li N., Hu X.X. Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens. *PLoS ONE*, 2015, 10(5): e0127922 (doi: 10.1371/journal.pone.0127922).
54. Chojnacka-Puchta L., Kasperczyk K., Plucienniczak G., Sawicka D., Bednarczyk M. Primordial germ cells (PGCs) as a tool for creating transgenic chickens. *Polish Journal of Veterinary Sciences*, 2012, 15(1): 181-188 (doi: 10.2478/v10181-011-0132-6).
55. Macdonald J., Glover J.D., Taylor L., Sang H.M., McGrew M.J. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2010, 5(11): e15518 (doi: 10.1371/journal.pone.0015518).
56. Zheng Y., Zhang Y., Qu R., He Y., Tian X., Zeng W. Spermatogonial stem cells from domestic animals: progress and prospects. *Reproduction*, 2014, 147(3): 65-74 (doi: 10.1530/REP-13-0466).
57. Li B., Sun G., Sun H., Xu Q., Gao B., Zhou G., Zhou W., Wu X., Bao W., Yu F., Wang K., Chen G. Efficient generation of transgenic chickens using the SSCs in vivo and ex vivo transfection. *Science China Life Sciences*, 2008, 51: 734-742 (doi: 10.1007/s11427-008-0100-2).
58. Han J.Y. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, 2009, 32(2): 61-80 (doi: 10.1016/j.cimid.2007.11.010).
59. Nakamura Y., Usui F., Miyahara D., Mori T., Ono T., Takeda K., Nira-sawa K., Kagami H., Tagami T. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujiadori). *Reproduction, Fertility and Development*, 2010, 22(8): 1237-1246 (doi: 10.1071/RD10056).
60. Takashima S. Biology and manipulation technologies of male germline stem cells in mammals. *Reproductive Medicine and Biology*, 2018, 17(4): 398-406 (doi: 10.1002/rmb2.12220).
61. Eyal-Giladi H., Kochav S. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Developmental Biology*, 1976, 49(2): 321-337 (doi: 10.1016/0012-1606(76)90178-0).
62. Zhao D.-F., Kuwana T. Purification of avian circulating primordial germ cells by nycodenz density gradient centrifugation. *British Poultry Science*, 2003, 44(1): 30-35 (doi: 10.1080/0007166031000085382).
63. Mozdziaik P.E., Angerman-Stewart J., Rushton B., Pardue S.L., Petite J.N. Isolation of chicken

- primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poultry Science*, 2005, 84(4): 594-600 (doi: 10.1093/ps/84.4.594).
64. Sisakhtnezhad S., Bahrami A.R., Matin M.M., Dehghani H., Momeni-Moghaddam M., Boozarpour S., Farshchian M., Dastpak M. The molecular sig-nature and spermatogenesis potential of newborn chicken spermatogonial stem cells in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal*, 2015, 51: 415-425 (doi: 10.1007/s11626-014-9843-1).
 65. Li B., Wang X.-Y., Tian Z., Xiao X.-J., Xu Q., Wei C.-X., Sun H.-C., Chen G.-H. Directional differentiation of chicken spermatogonial stem cells in vitro. *Cytotherapy*, 2010, 12(3): 326-331 (doi: 10.3109/14653240903518155).
 66. Yu F., Ding L.-J., Sun G.-B., Sun P.-X., He X.-H., Ni L.-G., Li B.-C. Transgenic sperm produced by electrotransfection and allogeneic transplantation of chicken fetal spermatogonial stem cells. *Molecular Reproduction and Development*, 2010, 77(4): 340-347 (doi: 10.1002/mrd.21147).
 67. Hong Y.H., Moon Y.K., Jeong D.K., Han J.Y. Improved transfection efficiency of chicken gonadal primordial germ cells for the production of transgenic poultry. *Transgenic Research*, 1998, 7(4): 247-252 (doi: 10.1023/A:1008861826681).
 68. Naito M., Harumi T., Kuwana T. Long term in vitro culture of chicken primordial germ cells isolated from embryonic blood and incorporation into germline of recipient embryo. *Poultry Science*, 2010, 47(1): 57-64 (doi: 10.2141/jpsa.009058).
 69. Tyack S.G., Jenkins K.A., O’Neil T.E., Wise T.G., Morris K.R., Bruce M.P., McLeod S., Wade A.J., McKay J., Moore R.J., Schat K.A., Lowenthal J.W., Doran T.J. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Research*, 2013, 22(6): 1257-1264 (doi: 10.1007/s11248-013-9727-2).
 70. Sawicka D., Chojnacka-Puchta L. Effective transfection of chicken primordial germ cells (PGCs) using transposon vectors and lipofection. *Folia Biologica*, 2019, 67(1): 45-52 (doi: 10.3409/fb_67-1.04).
 71. Kalina J., Senigl F., Micáková A., Mucksová J., Blazková J., Yan H., Poplstein M., Hejnar J., Trefil P. Retrovirus-mediated in vitro gene transfer into chicken male germ line cells. *Reproduction*, 2007, 134(3): 445-453 (doi: 10.1530/rep-06-0233).
 72. Allioli N., Thomas J.-L., Chebloune Y., Nigon V.-M., Verdier G., Legras C. Use of retroviral vectors to introduce and express the β -galactosidase marker gene in cultured chicken primordial germ cell. *Developmental Biology*, 1994, 165(1): 30-37 (doi: 10.1006/dbio.1994.1231).
 73. Jiang Z.-Q., Wu H.-Y., Tian J., Li N., Hu X.-X. Targeting lentiviral vectors to primordial germ cells (PGCs): An efficient strategy for generating transgenic chickens. *Zoological Research*, 2020, 41(3): 281-291 (doi: 10.24272/j.issn.2095-8137.2020.032).
 74. Vetokh A.N., Volkova L.A., Iolchiev B.S., Tomgorova E.K., Volkova N.A. Genetic modification of roosters’ germ cells using various methodological approaches. *Sel’skokhozyaistvennaya biologiya [Agricultural Biology]*, 2020, 55(2): 306-314 (doi: 10.15389/agrobiology.2020.2.306eng).
 75. Macdonald J., Taylor L., Sherman A., Kawakami K., Takahashi Y., Sang H.M., McGrew M.J. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(23): E1466-E1472 (doi: 10.1073/pnas.1118715109).
 76. Lambeth L.S., Morris K.R., Wise T.G., Cummins D.M., O’Neil T.E., Cao Y., Sinclair A.H., Doran T.J., Smith C.A. Transgenic chickens overexpressing aromatase have high estrogen levels but maintain a predominantly male phenotype. *Endocrinology*, 2016, 157(1): 83-90 (doi: 10.1210/en.2015-1697).
 77. Zhao R., Zuo Q., Yuan X. Jin K., Jin J., Ding Y., Zhang C., Li T., Jiang J., Li J., Zhang M., Shi X., Sun H., Zhang Y., Xu Q., Chang G., Zhao Z., Li B., Wu X., Zhang Y., Song J., Chen G., Li B. Production of viable chicken by allogeneic transplantation of primordial germ cells induced from somatic cells. *Nature Communications*, 2021, 12: 2989 (doi: 10.1038/s41467-021-23242-5).
 78. Woodcock M.E., Gheyas A.A., Mason A.S., Nandi S., Taylor L., Sherman A., Smith J., Burt D.W., Hawken R., McGrew M.J. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(42): 20930-20937 (doi: 10.1073/pnas.190631611678).
 79. Kang S.J., Choi J.W., Kim S.Y., Park K.J., Kim T.M., Lee Y.M., Kim H., Lim J.M., Han J.Y. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. *Biology of Reproduction*, 2008, 79(5): 931-937 (doi: 10.1095/biolreprod.108.069989).
 80. Wernery U., Liu C., Baskar V., Guerineche Z., Khazanehdari K.A., Saleem S., Kinne J., Wernery R., Griffin D.K., Chang I.-K. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line Houbara bustard off-spring: potential for repopulating an endangered species. *PLoS ONE*, 2010, 5(12): e15824 (doi: 10.1371/journal.pone.0015824).
 81. Trefil P., Bakst M.R., Yan H., Hejnar J., Kalina J., Mucksová J. Restoration of spermatogenesis after transplantation of c-Kit positive testicular cells in the fowl. *Theriogenology*, 2010, 74(9): 1670-1676 (doi: 10.1016/j.theriogenology.2010.07.002).
 82. Kim Y.M., Park J.S., Yoon J.W., Choi H.J., Park K.J., Ono T., Han J.Y. Production of germline chimeric quails following spermatogonial cell transplantation in busulfan-treated testis. *Asian Journal of Andrology*, 2018, 20(4): 414-416 (doi: 10.4103/aja.aja_79_17).

83. Park K.J., Kang S.J., Kim T.M., Lee Y.M., Lee H.C., Song G., Han J.Y. Gamma irradiation depletes endogenous germ cells and increases donor cell distribution in chimeric chickens. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*, 2010, 46: 828-833 (doi: 10.1007/s11626-010-9361-8).
84. Trefil P., Polak J., Poplstein M., Mikus T., Kotrbová A., Rozinek J. Preparation of fowl testes as recipient organs to germ-line chimeras by means of gamma-radiation. *British Poultry Science*, 2003, 44(4): 643-650 (doi: 10.1080/00071660310001616246).
85. Tagirov M., Golovan S. The effect of busulfan treatment on endogenous spermatogonial stem cells in immature roosters. *Poultry Science*, 2012, 91(7): 1680-1685 (doi: 10.3382/ps.2011-02014).
86. Nakamura Y., Yamamoto Y., Usui F., Atsumi Y., Ito Y., Ono T., Takeda K., Nirasawa K., Kagami H., Tagami T. Increased proportion of donor primordial germ cells in chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. *Reproduction, Fertility and Development*, 2008, 20(8): 900-907 (doi: 10.1071/RD08138).
87. Motono M., Yamada Y., Hattori Y., Nakagawa R., Nishijima K., Iijima S. Production of transgenic chickens from purified primordial germ cells infected with a lentiviral vector. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2010, 109(4): 315-321 (doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.10.007).
88. van de Lavoie M.C., Collarini E.J., Leighton P.A., Fesler J., Lu D.R., Harriman W.D., Thiyyagasundaram T.S., Etches R.J. Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS ONE*, 2012, 7(5): e35664 (doi: 10.1371/journal.pone.0035664).
89. Han J.Y., Park Y.H. Primordial germ cell-mediated transgenesis and genome editing in birds. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 2018, 9: 19 (doi: 10.1186/s40104-018-0234-4).
90. Abu-Bonsrah K.D., Zhang D., Newgreen D.F. CRISPR/Cas9 targets chicken embryonic somatic cells in vitro and in vivo and generates phenotypic abnormalities. *Scientific Report*, 2016, 6: 34524 (doi: 10.1038/srep34524).
91. Zhang Y., Wang Y., Zuo Q., Li D., Zhang W., Wang F., Ji Y., Jin J., Lu Z., Wang M., Zhang C., Li B. CRISPR/Cas9 mediated chicken Stra8 gene knockout and inhibition of male germ cell differentiation. *PLoS ONE*, 2017, 12(2): e0172207 (doi: 10.1371/journal.pone.0172207).
92. Koslová A., Kučerová D., Reinišová M., Geryk J., Trefil P., Hejnar J. Genetic resistance to avian leukosis viruses induced by CRISPR/Cas9 editing of specific receptor genes in chicken cells. *Viruses*, 2018, 10(11): 605 (doi: 10.3390/v10110605).
93. Bai Y., He L., Li P., Xu K., Shao S., Ren C., Liu Z., Wei Z., Zhang Z. Efficient genome editing in chicken DF-1 cells using the CRISPR/Cas9 system. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 2016, 6(4): 917-923 (doi: 10.1534/g3.116.027706).
94. Lee J.H., Kim S.W., Park T.S. Myostatin gene knockout mediated by Cas9-D10A nickase in chicken DF1 cells without off-target effect. *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 2017, 30(5): 743-748 (doi: 10.5713/ajas.16.0695).
95. Schusser B., Collarini E.J., Yi H., Izquierdo S. M., Fesler J., Pedersen D., Klasing, K. C. Kaspers B., Harriman W. D., van de Lavoie M.-C., Etches R.J., Leighton P.A. Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2013, 110(50): 20170-20175 (doi: 10.1073/pnas.1317106110).
96. 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(4): e0154303 (doi: 10.1371/journal.pone.0154303).
97. 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(5): 928-934 (doi: 10.1242/dev.145367).
98. Park T.S., Lee H.J., Kim K.H., Kim J.-S., Han J.Y. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(35): 12716-12721 (doi: 10.1073/pnas.1410555111).
99. 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).
100. 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).
101. Qin X., Xiao N., Xu Y., Yang F., Wang X., Hu H., Liu Q., Cui K., Tang X. Efficient knock-in at the chicken ovalbumin locus using adenovirus as a CRISPR/Cas9 delivery system. *3 Biotech*, 2019, 9: 454 (doi: 10.1007/s13205-019-1966-3).
102. 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(4): 5688-5696 (doi: 10.1096/fj.201903035R).
103. 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(4): 1504 (doi: 10.3390/ijms21041504).
104. Lee J., Ma J., Lee K. Direct delivery of adenoviral CRISPR/Cas9 vector into the blastoderm for generation of targeted gene knockout in quail. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2019, 116(27): 13288-13292 (doi: 10.1073/pnas.1903230116).