

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА БЕТА-ЛАКТОГЛОБУЛИНА ПРИ ПОЛУЧЕНИИ
РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ – ОТ СТАРЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
ТРАНСГЕНЕЗА К НОВЫМ МЕТОДАМ РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА (обзор)**

Трубицина Т.П., Рябых В.П., Колоскова Е.М., Езерский В.А., Максименко С.В.

*ВНИИ физиологии, биохимии и питания животных, Боровск
Калужской обл., Российская Федерация*

В исследованиях, проводимых в мире по получению животных-продуцентов биологически активных белков с молоком (молочная железа как биореактор), значительная доля принадлежит работам с геном β -лактоглобулина (*BLG*). В обзоре рассматриваются применение генных конструкций с участием фрагментов *BLG* на разных этапах развития этого направления исследований. Описаны эволюция и результативность новых технологий, обеспечивающих возможность сайт-специфической интеграции трансгена, включая применение сайт-специфичных нуклеаз – ZFN (zinc-finger nucleases), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) и CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) – короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами. В этих новых технологиях получают сайт-специфический двунилевой разрыв ДНК; повреждение устраняется путем негомологичного соединения концов или путём репарации гомологичной рекомбинацией с использованием ДНК-матрицы (трансгена), фланкированной плечами гомологии к соседним к месту разреза участкам ДНК-мишени. Процесс восстановления часто приводит к целенаправленным мутациям в виде делеций или вставок нуклеотидов, которые могут привести к мутациям сдвига рамки считывания или нокауту гена. CRISPR/Cas9 технология стала доминирующей в создании трансгенных сельскохозяйственных животных, сделав возможным получение крупных генно-модифицированных животных в более короткие сроки, в основном методом микроинъекции в пронуклеусы зигот. Основное внимание в обзоре уделено использованию фрагментов *BLG* в составе гибридных генетических конструкций. В числе достижений в применении новых технологий – получение ТЖ, экспрессирующих в молоко моноклональные антитела, β -интерферон, лактоферрин, Г-КСФ и лактоферрин человека. В России введен запрет на выращивание и разведение генетически модифицированных растений и животных для производства продуктов питания. Вместе с тем, если какой-то вариант «ослабления» этого запрета, в свете очевидного прогресса в технологиях генетического редактирования, не будет принят в ближайшей перспективе, то необходимость получения животных, продуцирующих с молоком биологически активные белки диагностического и лечебного назначения сохраняет свою актуальность.

Ключевые слова: ген β -лактоглобулина, редактирование генома, сайт-специфичные нуклеазы, гибридные генные конструкции, получение рекомбинантных белков с молоком

Проблемы биологии продуктивных животных, 2018, 3: 15-34

Введение

В истории исследований по получению животных-продуцентов биологически активных белков с молоком (молочная железа как биореактор) немалая доля принадлежит работам с геном β -лактоглобулина (*BLG*) разных видов сельскохозяйственных животных. В начале 21-го века генные конструкции (ГК), создаваемые биотехнологами, стали всё более приближаться к изначальной цели - получению изначального природного варианта. Самые эффективные экспрессионные векторы для продукции рекомбинантных белков (РБ) в

молочной железе (МЖ) стали содержать протяженную 5'-область гена белка молока (БМ), с промотором, тканеспецифичными энхансерами, первыми некодирующими экзонами и расположенными между ними интронами. В ГК включают 3'-нетранслируемую область (*UTR*) гена БМ, содержащую последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательности, потенциально способные усиливать терминацию транскрипции. Кроме перечисленного, для накопления целевого белка в молоке кодирующая часть гена должна содержать последовательность сигнального пептида, необходимого для секреции (Максименко и др., 2013).

К настоящему времени накоплен огромный фактический материал по получению и использованию трансгенных животных (ТЖ), экспрессирующих рекомбинантные белки в МЖ, тканеспецифичность которых обеспечивается включением в состав ГК регуляторных областей генов основных БМ (казеинов и сывороточных белков молока).

Почти у всех млекопитающих, кроме грызунов и приматов, основным сывороточный белок молока – это β -лактоглобулин (β -ЛГ). Регуляторные районы гена β -лактоглобулина (*BLG*) овец, коз и крупного рогатого скота, наряду с промоторными областями генов других мажорных белков молока, активно используются в создании ГК. Первые мыши с трансгеном *BLG* овцы были получены в еще в 1987 г (Simons et al., 1987). Промоторная область *BLG* овцы и крупного рогатого скота позднее активно применялась в разных ГК при получении ТЖ.

До недавнего времени основным способом получения ТЖ с нужным локусом нокаута, внесения мутаций или встраивания трансгена был метод гомологичной рекомбинации с использованием эмбриональных стволовых клеток (ЭСК). Модифицированные ЭСК инъецировали в бластоцисты реципиентов с получением потомства химерных животных, с последующим выведением линий, содержащих нужную генетическую модификацию. Это надежный способ получения генно-модифицированных животных, но очень трудоёмкий и длительный, поэтому выполнение его недоступно для многих лабораторий.

С применением новых эндонуклеазных технологий, в которых CRISPR/Cas9 – самая популярная, стала возможной одноступенчатая генерация мутаций в нескольких генах одновременно, с участием одного или обоих аллелей (в том числе для получения гомозиготных животных в F0 поколении), введение в геном сразу нескольких трансгенов, нокаут собственного гена с заменой его трансгеном. Огромное достоинство нового метода в том, что длительность работы по получению линейных животных сократилась с нескольких лет до нескольких месяцев (Немудрый и др., 2014).

Относительно низкая эффективность и высокие материальные затраты, свойственные традиционным методам трансгенеза, длительное время являлись лимитирующим фактором при создании трансгенных сельскохозяйственных животных. С использованием CRISPR/Cas9-системы можно решать задачи, связанные с разными областями фундаментальной и прикладной биологии, биотехнологии, медицины. Наиболее близкие нашей области интересов – это:

- возможность исследовать роль отдельных генов в функционировании разных клеток и всего организма в целом;
- получение модельных организмов для исследований в области биологии развития, иммунологии и изучения заболеваний человека и животных;
- создание новых пород скота, а также сельскохозяйственных культур растений, высокоурожайных и устойчивых к неблагоприятным условиям;
- получение линий животных, способных синтезировать биологически активные белки человека с молоком.

В области создания ТЖ - продуцентов биологически активных белков с молоком с помощью новых технологий уже есть весьма впечатляющие результаты.

Функции белка и структура гена β -лактоглобулина

Функции белка. Бета-лактоглобулин (β -ЛГ), основной сывороточный белок молока жвачных животных (до 50% сывороточных белков), содержится в нём в виде нековалентно связанного димера с молекулярной массой 36 кДа. При низких и высоких значениях pH β -ЛГ распадается на мономеры размером 18 кДа. Это амфипатический, кислотоустойчивый белок с оптимумом pH 6,5. Содержание β -LG в молоке коз и КРС составляет около 4 г/л, или 13 и 11% от общего белка соответственно (Хаертдинов и др., 2017). Первичная структура белка представлена цепью, состоящей из 162 аминокислот. Вторичная структура образована β -складчатыми слоями (43%), α -спиралями (10%) и неорганизованными структурами (47%). Низкое содержание пролина и значительное – метионина, цистеина и остатков цистина определяют низкую стабильность β ЛГ к термической обработке, но его глобулярная структура устойчива к действию протеолитических ферментов и кислоты желудка.

Благодаря амфипатическим свойствам β -ЛГ взаимодействует с лигандами разной природы, осуществляя транспортную функцию – перенос небольших, преимущественно гидрофобных молекул жирных кислот (предпочтительно длинноцепочечных, возможно, витамина А). При этом биодоступность жирных кислот повышается, что важно для пищеварения. Способность связывать гидрофобные компоненты зависит также от видовой принадлежности β -ЛГ – для белка свиньи и лошади она не характерна. Белок участвует в пассивной передаче иммунитета от матери к потомству, проявляет антимикробную активность против бактерий, в том числе вызывающих мастит. Обнаружены некоторые антиоксидантные свойства β -ЛГ, но их точная биологическая роль пока полностью не определена (Le Maux et al., 2014).

При оценке качества молока-сырья в последние годы учитывают полиморфизм молочных белков (β -ЛГ имеет несколько генетических вариантов).

Структура гена *BLG*. Локус *BLG* козы и КРС находится на 11-й хромосоме, единица транскрипции размером 4662 п.н. состоит из 7 экзонов и 6 интронов (рис. 1). *BLG* отвечает за белкомолочность и показатель биологической ценности молока. Наиболее часто встречаемые у большинства пород КРС варианты В и А отличаются двумя аминокислотными заменами (результат точечных замен в 4-м экзоне гена) – в положении 64 (глицин и аспартат соответственно) и 118 (аланин и валин) (Caroli et al., 2009). Из вариантов *BLG* чаще всего встречаются 4 аллеля – А, В, С, D. Генетические варианты *BLG* оказывают влияние на массовую долю жира и белка в молоке, соотношение белковых фракций и технологические свойства молока. Для генотипа ВВ характерно высокое содержание жира и казеиновых белков в молоке, для АА – высокие надои и содержание сывороточных белков в молоке (Погорельский, Позовникова, 2014).

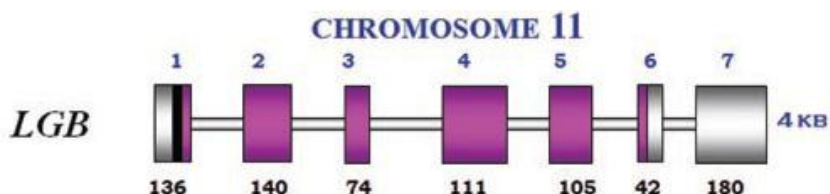


Рис.1. Строение транскрипционной единицы *BLG* КРС. Незаполненные участки – интроны; экзоны представлены блоками – серые для 5' и 3' нетранслируемых регионов, чёрный – часть экзона, кодирующего сигнальный пептид, окрашено – экзоны и части экзонов, кодирующие зрелый белок. Указан размер экзонов в п.н. и номер экзона (Caroli et al., 2009).

Некодирующие области генов (5'-нетранслируемая (utr) область, включая промотор, 3'-utr и интроны), а также межгенные регионы, во многих случаях имеют важное значение для молочной продуктивности. От вариаций в таких областях зависит, например, более высокий уровень экспрессии βЛГА по сравнению с βЛГВ. Причина такого функционального различия заключается в наличии нескольких однонуклеотидных замен в 5'-фланкирующем регионе. Промоторы *BLG*А* и *BLG*В* имеют 13 полиморфных участков в пределах фрагмента -730-+92 нуклеотидов (относительно точки инициации трансляции). Трансверсия G > C в положении -430 находится в консенсусном сайте связывания белка-активатора 2 (БА 2 - фактор транскрипции). Аффинность БА 2 к сайту узнавания в условиях *in vitro* у аллеля *BLG*А* на 60% больше, чем к сайту узнавания у промотора *BLG*В* (Lum et al., 1997). К 2008 г в области промотора, экзонов и интронов *BLG* КРС обнаружено 50 полиморфизмов, один из них – замена G на A в положении -731 приводит к уменьшению содержания βЛГ у животных, гомозиготных по аллелю *BLG*А* (Ganai et al., 2008). Полиморфизм *BLG*В* (кодирующих, некодирующих, промоторной областей), связь с содержанием белка в молоке рассмотрены в ряде относительно недавних работ (Caroli et al., 2009; Sardina et al., 2012; Kishore et al., 2014).

Регуляторные области BLG в составе генетических конструкций. Регуляторные последовательности генов молочных белков определяют тканеспецифический характер экспрессии в клетках молочной железы, вследствие чего используются в качестве промоторов в генных конструкциях при создании животных-продуцентов биологически активных белков с молоком. В регуляцию экспрессии генов молочных белков на разных стадиях развития МЖ вовлечены разные специфические факторы – trans-регуляторные (преобразователь сигнала и активатор транскрипции 5 (Stat5), глюкокортикоид-чувствительный элемент (GRE), ядерный фактор 1 (NF-1)), узнающие cis-регуляторные ДНК-мотивы, расположенные около сайта старта транскрипции генов БМ. Их совместное действие обеспечивает тканеспецифичность экспрессии. Имеются и дистальные (удалённые) регуляторные элементы, выполняющие значимую роль в регуляции транскрипции (Mercier, Vilotte, 1993; Malewski, 1998).

Исследования функциональности гена β-лактоглобулина. Значение размера промотора. Разносторонние работы с использованием *BLG* овцы в качестве трансгена начались еще в середине 90-х годов учеными Эдинбургского университета (Великобритания). В первых экспериментах по получению мышей с *BLG* овцы (*oBLG*) было показано что чужеродный ген белка молока, интегрированный в геном животного, не имеющего подобного гена, способен к тканеспецифической экспрессии. Размер 5'-фланкирующей области *oBLG* в этом случае составлял 4,3 т.п.н., β-ЛГ выделялся только с молоком в количестве 3-23 мг/мл (Simons et al., 1987).

Для оценки функциональной и структурной активности промотора *oBLG* были получены мыши, трансгенные по *oBLG* с 5' фланкирующими областями от 4,3 т.п.н. до 79 п.н. В области промотора гена *oBLG* (-1800- + 100 п.н. относительно точки инициации транскрипции) были найдены три основных *DNase-1* гиперчувствительных участка, изучен проксимальный (-400 п.н.) пролактин-чувствительный участок. Еще один дополнительный, менее охарактеризованный участок был найден на уровне - 2500 п.н. (Whitelaw et al., 1992). При изучении влияния размера 5'-области *oBLG* (3, 5,5 или 10,8 т.п.н.) на уровень экспрессии трансгенного βЛГ было показано, что для высокого уровня экспрессии достаточно 5'-области размером 3 т.п.н., использование более длинных областей не улучшало результат (Shani et al., 1992). Сокращение размера промотора до проксимальных -406 п.н. не оказывало большого влияния на тканеспецифичность и уровень экспрессии трансгена (зависящий в основном от числа встроенных копий). Уменьшение же промотора до -146 п.н. привело к резкому сокращению экспрессии без потери тканеспецифичности. При оставшихся 79 п.н. 5'-области экспрессия в МЖ отсутствовала, но появилась в почках (Whitelaw, 1996).

Возможность «конкуренции» экзогенного гена с эндогенными за экспрессию в МЖ исследовали на трансгенных по *oBLG* мышях и их потомках. Даже при самом высоком

содержании β -ЛГ (до 33 мг/мл) общий белок молока менялся незначительно. Трансгенный белок вырабатывался за счет доли «хозяйских» молочных белков, при этом больше всего подавлялся синтез кислого сывороточного протеина (WAP). Супрессия эндогенных протеинов соответствовала пониженному уровню их mRNA – у гомозиготных и би-трансгенных мышей с максимальным уровнем β -ЛГ содержание mRNA WAP и казеина было на 75 и 56% меньше, чем у нетрансгенных (McClenaghan et al., 1995; в этой работе обсуждается и возможный механизм конкуренции). Следует отметить, что мыши использованных линий трансгенных мышей имели множественные копии *oBLG* (Simons et al., 1987). Копии трансгена *oBLG* были интегрированы тандемно: тандем первой линии имел 25 копий, второй – 17. Каждая генная копия содержала транскрипционную единицу *oBLG* (4,9 т.п.н.), 5'-фланкирующую последовательность размером 4 т.п.н., 3'-utr размером 7,3 т.п.н. для первой линии или 1,6 – для второй.

Несмотря на высокую экспрессию β -ЛГ овцы с молоком трансгенных мышей, результаты по получению трансгенных по *oBLG* других видов жвачных животных были не столь впечатляющими. Так, у мышей, трансгенных по *BLG* козы (*gBLG*), содержание экзогенного белка в молоке не превышало 0,5 мг/мл, несмотря на то, что интегрированный трансген содержал полноценную единицу транскрипции, фланкированную 5'- и 3'-областями размером 6,1 и 3,7 т.п.н. (Ibáñez et al., 1997). Уровень экспрессии гена *BLG* (*bBLG*) у четырех линий трансгенных мышей был на уровне 1-2 мг/мл и сохранялся стабильным в ходе двух лактаций (Hytinen et al., 1998). Интегрированный *bBLG* содержал 5'- и 3'-фланкирующие области размером 2,8 и 1,9 т.п.н. соответственно. В другой работе, с 5'- и 3'-фланкирующими областями меньшего размера (1,2 и 1 т.п.н.), содержание β -ЛГ в молоке трансгенных мышей было 0,75-3,4 мг/мл (Gutiérrez-Adán et al., 1999). У мышей с одной встроенной копией *bBLG* содержание β -лактоглобулина в молоке было 2,5 и 3,4 мг/мл, тогда как эндогенный уровень β -ЛГ в коровьем молоке – 3 мг/мл. Увеличение числа копий трансгена до 10 приводило к полному отсутствию экзогенного белка в молоке трансгенных мышей.

Элементы гена β -лактоглобулина в гибридных конструкциях

Первая работа с использованием *oBLG* в качестве вектора для экспрессии белка человека с молоком ТЖ была выполнена в 1989 г тем же эдинбургским коллективом. Гибридный ген для синтеза антигемофильного фактора IX человека (FIX) в МЖ овцы содержал фрагмент его кДНК размером 1552 п.н., клонированный в 1-й экзон *oBLG* (10,5 т.п.н., из них 5'-фланкирующая область – 4 т.п.н.). Обе трансгенные овцы были получены методом микроинъекции в пронуклеус (около 10 тандемных копий трансгена на геном), трансген наследовался классически. Уровень FIX человека в молоке трансгенных овец был около 25 нг/мл и биологическая активность белка была невысокой. Авторы объясняли низкий уровень экспрессии как эффектом случайного встраивания трансгена, так и использованием кДНК вместо полноразмерного гена FIX человека (33,5 т.п.н.), возможно, содержащего в своих интронах важные функциональные сайты (Clark et al., 1989).

Эксперимент с получением животных, продуцирующих с молоком α_1 -антитрипсин человека ($h\alpha_1AT$), оказался гораздо более впечатляющим: трансгенные по $h\alpha_1AT$ мыши в молоке содержали высокую концентрацию биологически активного белка – от 1 до 5 мг/мл (Archibald et al., 1990). В применённой генетической конструкции геномная последовательность $h\alpha_1AT$, лишённая собственной промоторной области и первого интрона, была соединена с 5'-фланкирующей областью *oBLG* (4 т.п.н., включая 1-й экзон, рис.2). Размер линейной конструкции составлял 10,5 т.п.н. Несмотря на потенциальную значимость интронов для эффективной экспрессии трансгена, величина первого интрона $h\alpha_1AT$ (5,3 т.п.н.) могла существенно затруднить получение плазмиды-вектора.

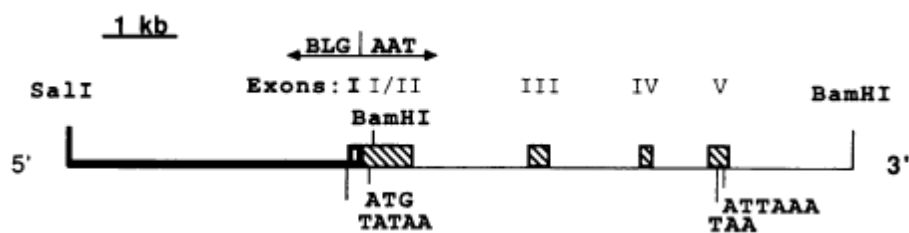


Рис. 2. Схема генной конструкции для экспрессии α_1 -антитрипсина человека в молочной железе животных. Конструкция включает в себя 4 т.п.н. 5'-области BLG овцы, соединенной с «мини-геном», кодирующим a1AT. 5' BLG область обозначена жирной линией; пустой блок – 1-й экзон BLG; заштрихованные блоки – экзоны a1ATs; тонкие линии – интроны и 3'-фланкирующая область a1AT. Указаны положение BLG TATA-бокса, кодона инициации a1AT, стоп-кодона, сайт полиаденилирования (Archibald et al., 1990).

Концентрация $\text{h}\alpha_1\text{AT}$ в молоке у четырех трансгенных по этой ГК овец на седьмой неделе лактации варьировала от 1.5 до 37.5 г/л, составив более чем половину выделяемого с молоком белка (Wright et al., 1991). Продолжительность лактации и здоровье трансгенных животных были нормальными. Использование же в составе ГК вместо геномной, пусть и укороченной, последовательности кДНК $\text{h}\alpha_1\text{AT}$ оказалось неэффективным (Wilmut et al., 1990).

Опровергая результаты работ (Clark et al., 1990; Wilmut et al., 1990) более поздняя работа китайских исследователей показала, что кДНК трансгена в составе генной конструкции под управлением BLG-промотора тоже может работать эффективно. Культуру эпителиальных клеток молочной железы KPC трансфецировали конструцией, содержащей кДНК чЛФ (2259 п.н.) под 5'-фланговой регуляторной последовательностью bBLG вместе с первыми экзонам и интроном (1449 п.н.) (рис. 3). В кодон инициации трансляции ATG 5'-флангового регуляторного фрагмента (первого экзона bBLG) вносили мутацию с целью предотвращения образования слитого белка, но вместе с этим сохранялась естественная модель транскрипции bBLG с участием первого интрона. Методом иммуноцитохимического и Western-блот анализа у положительных клеточных клонов была обнаружена высокая экспрессия белка чЛФ (Shu et al., 2006).



Рис. 3. Структура генной конструкции с использованием кДНК лактоферрина человека для экспрессии в МЖ КРС. BLG P – промотор гена BLG КРС, E1 – 1-й экзон, I1 – 1-й интрон гена BLG, hLF cDNA – кДНК гена лактоферрина человека, SV40 polyA – сигнал полиаденилирования SV40 (Shu et al., 2006).

Использование моноклональных антител (mAbs) в терапии онкозаболеваний – одно из важных направлений получения ТЖ. Экспрессия mAbs в молочной железе трансгенных животных – экономически выгодная возможность для производства перспективного антитела для клинических испытаний и фармакологии. Трансгенные мыши, экспрессирующие с молоком химерные мышино-человеческие антитела к антигену CD19 были получены с помощью коинъекции двух отдельных ГК, легкая и тяжелая цепи антител в которых была под промотором bBLG. У одной из пяти трансгенных мышей в молоко выделялись полностью собранные химерные моноклональные антитела с концентрацией около 0,5 мг/мл, специфически связывающиеся с поверхностным антигеном CD19 на В-лимфоцитах человека (Van Kuik-Romeijn et al., 2000). В связи с тем, что белок характерен для В-лимфоцитов, он

используется в диагностике В-лимфоцитарных заболеваний (лимфом и лейкозов) а также в качестве мишени при терапии против В-лимфоцитарных лимфом (Зугмайер и др., 2016).

С генной конструкцией, содержащей модифицированный ген **лизостафина** (белок с анти-стафилококковым действием) под 5'-фланговой областью *oBLG* были получены трансгенные мыши, секретирующие лизостафин с молоком: белковый состав молока при этом не менялся, мыши были устойчивы к заражению МЖ золотистым стафилококком (Keig et al., 2001).

С использованием гибридного гена, состоящего из кодирующей последовательности гена **β -интерферона**, встроенной в первый экзон *oBLG*, были получены трансгенные кролики с тканеспецифичной экспрессией трансгена, его наследованием в первом и втором поколениях. Интерфероновая активность составила 2.2×10^4 и 7.2×10^4 МЕ на мл молока трансгенных крольчих, при этом наследование трансгена у линии с высокой экспрессией происходило реже (Ходарович и др., 2008).

С регуляторными элементами *bBLG* получали трансгенных по **чГ-КСФ** кроликов (Прокофьев и др., 2003). Содержание чГ-КСФ в молоке крольчих, определенное методом ИФА, составляло 8-22 мг/л. В гибридном гене геномную копию чГ-КСФ (1 500 п.н.) фланкировали промотором *bBLG* (0,9 т.п.н., с содержанием последовательности, кодирующей сигнальный пептид) и 3'-областью гена β -казеина быка (0,35 т.п.н.) (Прокофьев и др., патент РФ 2157846, 2000).

Козы, экспрессирующие с молоком рекомбинатный **активатор плазминогена** человека rhPA, впервые были получены с использованием тканеспецифичного вектора с 5'-регуляторной последовательностью *gBLG* (включая последовательность кодирования сигнального пептида) и 3'- фланкирующей областью *gBLG*, в который клонировали ДНК, кодирующую основные фибрин-связывающие домены белка rhPA. В молоке трансгенных коз содержание rhPA, определенное методом ИФА, было 78,32 мкг/мл молочной сыворотки (He et al., 2018)

В лаборатории молекулярной биологии ВНИИФБиП элементы *bBLG* использовались при создании генных конструкций, содержащих кДНК **лактоферрина** человека (Езерский и др., 2006) или геномную копию **Г-КСФ** человека (Езерский и др., 2007). Размер 5'- и 3'-фланкирующих областей составлял 3000 (включая 1-й экзон, 1-й интрон и часть 2-го экзона) и 1500 п.н. соответственно (Езерский, Шевченко, 2005). С целью селекции трансгенных эмбрионов на предимплантационной стадии, впоследствии в рекомбинантные плазмиды вводили ген зелёного флуоресцентного белка под цитомегаловирусным промотором (Езерский, Шевченко, 2008).

С целью увеличения экспрессии, снижения токсичности или для упрощения процессов выделения рекомбинантных белков, во многих прокариотических и эукариотических экспрессирующих системах широко используется **технология слитых белков**; для аффинной (или какой-либо другой) очистки РБ к нему присоединяют различные фрагменты. Эту технологию применяют и при получении ТЖ, продуцирующих РБ с молоком. При слиянии *bBLG* с кДНК **эритропоэтина** человека (чЭПО) были получены трансгенные мыши и кролики, продуцирующие в молоко слитый белок β ЛГ-чЭПО. Содержание чЭПО в молоке, определенное ИФА-методом, было до 0,3 и 0,5 г/л у мыши и кролика соответственно. После очистки слитого РБ путем гидролиза специфической бактериальной IgA-протеазой ранее введенной аминокислотной последовательности получали активный чЭПО (Korhonen et al., 1997). Фланкирующие 5'- и 3'- области гена *bBLG* в этой конструкции были 2,8 и 1,9 т.п.н. соответственно, кДНК чЭПО встроена в 5-й экзон *bBLG* (рис. 4).

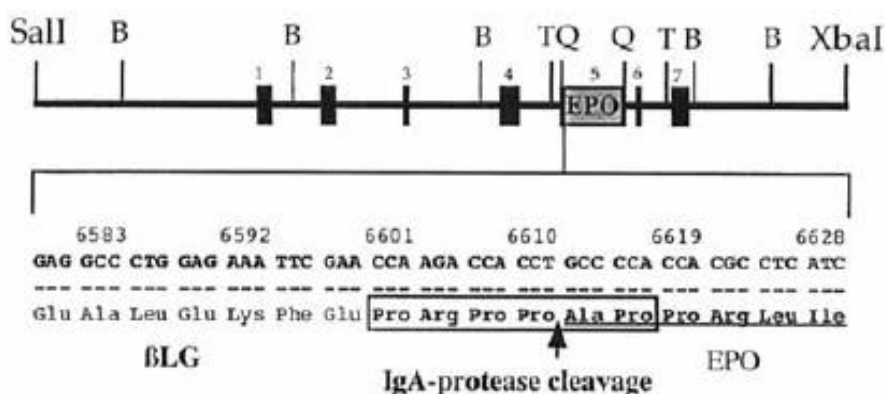


Рис. 4. Конструкция слитого гена BLGEPO. κДНК чЭПО встроена в 5-й экзон с сохранением рамки считывания. Ниже показан участок слияния генов через нуклеотидную последовательность, кодирующую связь, лизируемую IgA-протеазой в слитом белке (Korhonen et al., 1997).

Использование фрагментов гена β-лактоглобулина в новых эндонуклеазных технологиях

В настоящее время генная инженерия сельскохозяйственных животных получила несколько мощных инструментов в виде новых технологий, обеспечивающих возможность сайт-специфической интеграции трансгена, а также полной утери функции эндогена. Это три основные технологии сайт-специфичных нуклеаз:

ZFN – Zinc-finger nucleases – нуклеазы «цинковых пальцев» (Kim et al., 1995; Durai et al., 2005);

TALEN – transcription activator-like effector nuclease – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (Christian et al., 2010; Sun, Zhao, 2013);

CRISPR/Cas9 – clustered regularly interspaced short palindromic repeats — короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами (Ran et al., 2013; Lander, 2016).

В результате работы компонентов этих новых технологий получают сайт-специфический двунитевой разрыв ДНК (DSBs). Повреждение устраняется путем негомологичного соединения концов (NHEJ) или путем репарации гомологичной рекомбинацией (HDR) с использованием ДНК-матрицы (трансгена), фланкированной плечами гомологии к соседним к месту разреза участкам ДНК-мишени. Процесс восстановления NHEJ часто приводит к целенаправленным мутациям в виде делеций или вставок нуклеотидов, которые могут привести к мутациям сдвига рамки считывания и нокауту гена.

Основным недостатком ZFN и TALEN является высокая трудоемкость конструирования рекомбинантных векторов и дороговизна этих технологий. CRISPR/Cas9 технология стала доминирующей в создании трансгенных сельскохозяйственных животных, сделав возможным получение крупных генно-модифицированных животных в более короткие сроки. Если клонирование с использованием пересадки ядер соматических клеток (SCNT) было основным методом получения таких животных, технология CRISPR/Cas9 дает возможность их получения методом микроинъекции зигот (Wang et al., 2015; Whitworth et al., 2014).

Научные коллективы, добившиеся серьезных успехов в получении ТЖ-продуцентов рекомбинантных белков с молоком, заявили о планах применения новых технологий в своих исследованиях. Почти одновременно появилось множество работ, посвященных осмыслению пройденного пути и эффективности полученных возможностей в решении сложных биотехнологических задач. Это работы ученых из США, около 10 лет посвятивших получению коз-продуцентов лизоцима человека (Cooper et al., 2015), из Китая, получивших

КРС с высокой экспрессией чЛФ и лизоцима с использованием ВАС-конструкции (Lu D et al., 2016); бразильско-российский коллектив, добившийся серьезного успеха в создании чГ-КСФ-продуцирующих коз (Freitas et al., 2014).

Направленные модификации гена β -лактоглобулина в ZFN и TALEN технологиях. Применение новых эндонуклеазных технологий с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) – эффективный метод гуманизации молока замещением генов эндогенных молочных белков (МБ) у сельскохозяйственных животных генами белков молока человека для улучшения его потребительских качеств. Можно исключить из состава молока какой-либо белок; заменить его белком фармакологического или диагностического назначения; модифицировать сами МБ с целью повышения их питательной ценности и усваиваемости или переработки в разные молочные продукты для получения из них биологически активных пептидов в качестве вакцин (Whitelaw et al. 2016).

ZFN-технология впервые была успешно применена в Китае для получения КРС, нокаутного по *BLG* (Yu et al., 2011). В работе на фибробластах КРС сайт, выбранный в первом экзоне *BLG*, разрезался с эффективностью 19%. Были получены клеточные колонии, у более чем 80% которых возникли короткие делеции и инсерции (менее 20 п.н., с преобладанием 4 п.н.) в целевом сайте. Из 18 мутантных колоний у двух были биаллельные делеции, и их ядра использовали для SCNT-клонирования. Родившиеся телята были носителями биаллельных модификаций в 1-м экзоне *BLG*. Единственный теленок, доживший до 6-месячного возраста, имел небольшую делецию, не приведшую к сбою рамки считывания и нокауту гена *BLG*, в результате чего получалась укороченная версия белка.

ZFN-технология оказалась эффективной и при использовании метода микроинъекции зигот КРС плазмидными ДНК или мРНК, кодирующими ZF-нуклеазы. Коинъекция их с олигонуклеотидом, HDR-механизмом репарирующем разрез гена *bBLG* после ATG - стартового кодона в первом экзоне, вводила новый сайт рестрикции (дополнительные 5 нуклеотидов) с нокаутом *bBLG*. Частота мутаций в бластоцистах составила 33% (Wei et al., 2015).

Эффективный нокаут гена *BLG* был получен в фибробластах козы (Xiong et al., 2013). Хороший результат получен с использованием рекомбинантной ZF-нуклеазы – бактериального продукта *E. coli*, трансформированной соответствующими плазмидами (Song et al., 2015).

Впервые встраивание трансгена в локус гена молочного белка (во 2-й интрон гена β -казеина КРС) с использованием ZFN-технологии было осуществлено немного позже китайскими учеными (Liu et al., 2013; 2014). В первой работе был сайт-специфично интегрирован ген лизостафина (стафилолитический фермент), во второй – ген лизоцима человека (*hLYZ*): около 1% фибробластов содержали трансген. С использованием SNTF-метода были получены коровы, секретирующие с молоком лизостафин или лизоцим, убивающий *Staphylococcus aureus*. В обоих случаях HDR-матрица содержала трансген и флоксированную *Neo-GFP* кассету, фланкированные плечами гомологии (по 700 п.н.) гена β -казеина к ДНК-последовательностям у сайта разреза.

С использованием технологии TALEN на крупных сельскохозяйственных животных были получены еще более впечатляющие результаты. Если при микроинъекции зигот КРС ZF-нуклеазными векторами целевые мутации гена *bBLG* были у 33% бластоцист, в аналогичной ситуации с использованием TALE-нуклеаз изменения фиксировали у 46% (Wei et al., 2015). Гарантированный нокаут гена обеспечивался HDR-встраиванием одноцепочечной ДНК-матрицы, содержащей 9-нуклеотидную делецию, приводящую к образованию TAG стоп-кодона для прерывания синтеза β ЛГ на стадии сигнального пептида. Рамка считывания сохранялась, но ни зрелый, ни укороченный белок β ЛГ не образовывался. В результате трансплантации сохраненных ПЦР-проверенных эмбрионов коровам-реципиентам были получены *bBLG*^{-/-} бычок и телочка, молоко которой не содержало β -лактоглобулина (Wei et al., 2018).

Бета-лактоглобулин – это главный аллерген козьего и коровьего молока, отсутствующий в грудном молоке человека. Получение козы и коровы, в молоке которых нет β -лактоглобулина и содержится биологически активный белок человека (например, лактоферрин) – многолетняя цель генных инженеров. В частности, ставилась задача получить «гуманизированное» козье молоко с интегрированными в эндогенный *BLG* генами молочных белков человека – лактоферрина и лактальбумина. Такие козы впервые были получены китайскими генетиками. Работу проводили на первичных фибробластах; мишень – фрагмент 1-го экзона *BLG*, 20 нуклеотидов из кодирующей последовательности белка (рис. 5).

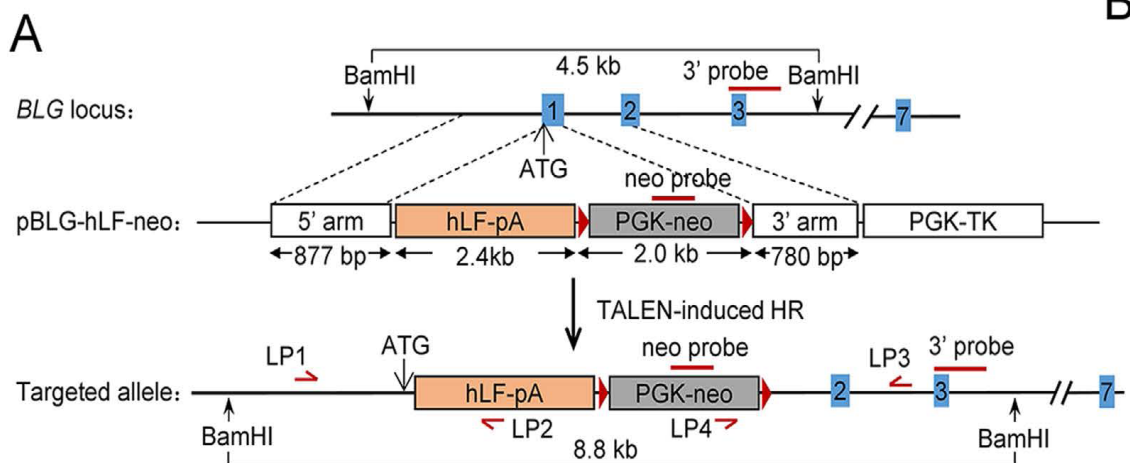


Рис. 5. Схема целевой модификации гена β ЛГ козы с использованием технологии TALEN. Схема локуса *BLG* (вверху) и HDR-матрица, содержащая кДНК чЛФ с сигналом полиаденилирования гормона роста *KPC*; «5'arm» и «3'arm» – плечи гомологии *BLG*, треугольники – последовательности *LoxP*. Внизу – интегрированный ген чЛФ и *PGK-neo* кассета (Cui et al., 2015).

Эффективность TALEN составила 12,5%. В результате последовательно выполненной работы с использованием двух ДНК-матриц для HDR были получены 7 *BLG*^{+/-} и 3 *BLG*^{+/hLF} козленка. Экспрессия β ЛГ в молоке F0 *BLG*^{+/-} моноаллельных козочек была значительно меньше, чем у коз дикого типа. В молоке F0 коз *BLG*^{+/hLF} содержание чЛФ было 2,3-2,4 г/л. Молоко *BLG*^{-/-} и *BLG*^{-/hLF} коз следующего поколения не содержало β -лактоглобулина, а уровень чЛФ в молоке гомозиготных *BLG*^{-/hLF} коз составлял 3,2 г/л (и это на фоне некоторых упомянутых выше работ, казалось бы, убедительно продемонстрировавших эффективность экспрессии только полноразмерных трансгенов!) (Cui et al., 2015). Репродуктивные функции, качество семени моно- и биаллельных козчиков (*BLG*-нокаутных и дикого типа) не различались, приобретённые качества сохранялись в последующих поколениях (Ge et al., 2016).

Спустя год была опубликована работа, выполненная этим же коллективом, в которой сообщалось о получении коз, в молоке которых содержался α -лактальбумин человека и отсутствовал эндогенный β -лактоглобулин (Zhu et al., 2016).

В 2017 году появилась публикация о биаллельном, в один прием, включении кДНК лактоферрина человека (чЛФ) в локус *BLG* козы. Фибробласты трансфицировали смесью TALEN-плазмид, сайтспецифичных к 1- и 3-му экзону, и линейаризированной HDR-ГК для замещения последовательностью hLF кДНК фрагмента *BLG* от 1-го экзона до 5-го интрона. Экспрессия чЛФ при этом находилась под управлением промотора козьего альфа-лактальбумина (но на схеме в оригинальной статье, вероятно ошибочно, изображен *cmv*-промотор!). Для позитивной селекции трансформантов использовали ген *neo*, фланкированный *LoxP*-фрагментами. Эффективность целевой мутации, оцененная ПЦР-

анализом, составила около 10%. Из 12 биаллельных колоний 5 были использованы в 1-м этапе SCNT, у нескольких коз-реципиентов была подтверждена беременность (Yuan et al., 2017).

Почти одновременно был получен КРС, трансгенный по сывороточному альбумину человека (HSA) с нокаутом *BLG*. Применённая в этой работе TALEN-технология была в другом формате – для создания односторонних разрезов ДНК использовали TALE-никазы, что предотвращало негомологичное соединение концов (NHEJ) и снижало гибель трансфицированных клеток по сравнению с TALE-нуклеазами. В результате одного раунда ко-трансфекции фетальных фибробластов КРС сайт-специфичным *HSA*-вектором и вектором, экспрессирующим TALE-никазу, 4,8% клеточных клонов содержали *HSA* в локусе *BLG*. У одного клона (0,1%) в обоих аллелях *BLG* был интегрирован *HSA*. *HSA*, синтезированный вместо эндогенного β -лактоглобулина, был найден в молоке моноаллельных коров в хорошей концентрации (до 2,3 г/л) и имел правильный фолдинг. Содержание *HSA* в молоке гомозиготных коров было значительно выше – 3,3-3,5 г/л (Luo et al., 2016). Схема сайт-специфического редактирования и интеграции трансгена приведена на рис. 6.

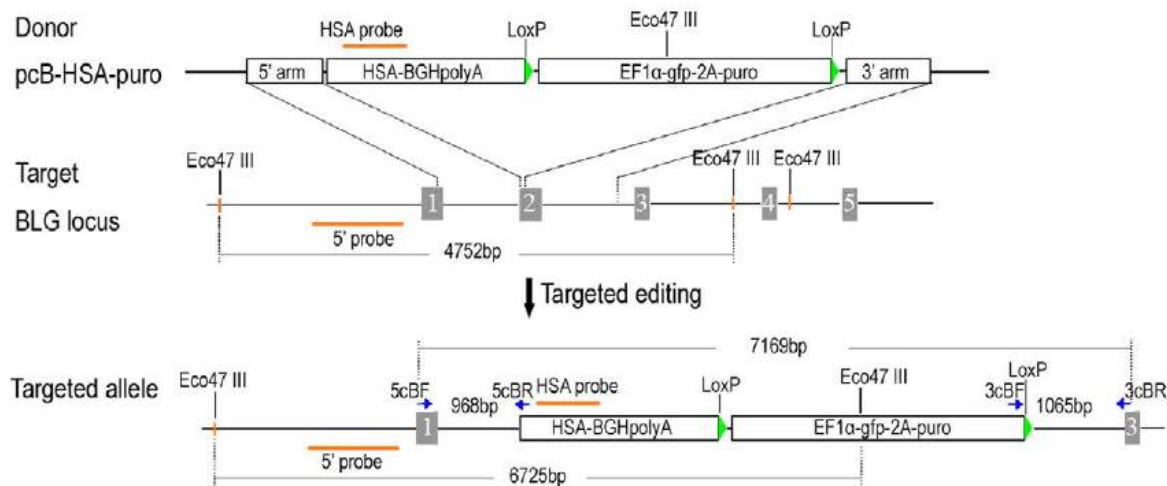


Рис. 6. Схема сайт-специфического редактирования *BLG*-локуса КРС и HDR-интеграции *HSA*. Southern- blot пробы и праймеры для ПЦР-детекции обозначены красными линиями и синими стрелками. Экзоны *BLG* обозначены серыми блоками. *HSA-BGHpolyA* – кодирующая последовательность сывороточного альбумина человека, фланкированная *BGHpolyA*; *EF1α-gfp-2A-puro* – ген зеленого флуоресцентного белка под промотором фактора элонгации 1α (*EF1α*), соединенный автогидролизующей 2A пептидной последовательностью с геном устойчивости к пуromицину. Мишень – второй экзон *BLG* (Luo et al., 2016).

Ген β -лактоглобулина как мишень при использовании *CRISPR/Cas9* технологии. С появлением технологии *CRISPR/Cas9* разнообразие одновременно осуществляемых целей стало гораздо шире – одноступенчатый нокаут гена с возможностью его замены трансгеном, генерация мутаций в нескольких генах одновременно с участием одного или обоих аллелей (в том числе получение гомозиготных животных в F0 поколении), введение в геном сразу нескольких трансгенов. В отличие от первых двух эндонуклеазных методов, найдено всего три публикации об использовании *CRISPR/Cas9* в рамках темы данного обзора.

Возможность моно- и биаллельного нокаута гена (в том числе *BLG*) по технологии *CRISPR/Cas9* в первичных фибробластах коз впервые продемонстрирована в работе (Ni et al., 2014). Сразу четыре гена были мутированы при однократной трансфекции нескольких бицистронных плазмид рХ330 (плазмидный вектор для одновременной экспрессии в клетках млекопитающих нуклеазы *Cas9* и сайт-специфичной *gRNA* (Cong et al., 2013)), содержащих последовательности сайт-специфичных *gRNA* к генам миостатина, нуклеопорина, прион протеина и β -ЛГ. Эффективность точных мутаций была на уровне от 9 до 70%. Миостатин-

нокаутные фибробласты были успешно использованы в SCNT-технологии для создания коз с биаллельными мутациями.

Высокая эффективность CRISPR/Cas9 технологии сделала возможным получение крупных генно-редактированных животных методом микроинъекции зигот, что раньше было оправдано в работе только с мелкими лабораторными животными. В 2017 году посредством микроинъекции в цитоплазму зигот CRISPR/Cas9-компонентов (Cas9 mRNA, sgRNAs) были получены *BLG*-нокаутные козы (Zhou et al., 2017a). Как и во всех случаях, для *gBLG* – основная мишень – первый экзон, к PAM-последовательностям которого подобрали три sgRNA (рис. 7).

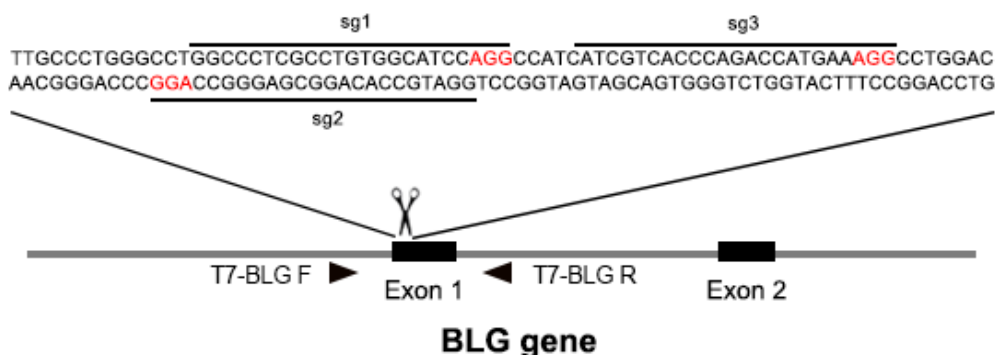


Рис. 7. Схема обусловленных CRISPR/Cas9 модификаций в локусе *BLG* и дизайн sgRNA для локуса *BLG* козы. Красным цветом выделены PAM-последовательности. Праймеры *BLG-T7-F* и *BLG-T7-R* использованы для T7E- анализа эффективности работы sgRNA: *sg1*, *sg2* и *sg3* (ПЦР-амплификат мутированного участка в результате отжига с ПЦР-амплификатом WT и обработки T7E1-эндонуклеазой будет давать дополнительные полосы при электрофорезе) (Zhou et al., 2017a).

Использовали разные варианты – разрез по одному сайту (с использованием одной sgRNA), двум сайтам одновременно (две sgRNA), разные концентрации компонентов смеси. Суммарная эффективность составила 15%; 4 из 26 козлят имели модификации в *BLG* локусе. Большинство модифицированных F0 козлят были химерными.

Более низкий результат первых двух групп авторы связали с низкими концентрациями sgRNA-компонентов (*sg1*, *sg2*) – при увеличении концентраций выросла и эффективность эксперимента. Одна козочка была гомозиготной с делецией в 29 п.н. в области, кодирующей сигнальный пептид. В основном, у козлят по аллелям *BLG* были точечные мутации, небольшие инсерции (+2,+3,+11) и делеции, размер самой большой из которых составлял 138 п.н. Все полученные мутации могли сбивать рамку считывания, приводить к нокауту гена или изменению последовательности синтезируемого белка. Анализ состава молока *BLG*^{-/-} козы показал не только полное отсутствие β-ЛГ, но и изменение качества молока – снижение жирности, содержания общего белка, лактозы, насыщенных жирных кислот примерно на 0,3-0,4 процентных пунктов каждого из компонентов.

Следующий этап в этой работе – интеграция кДНК чЛФ в локус *BLG* козы. В работе использовали добавление в рецептуру компонента *RS-1*, стимулирующего наработку RAD51, белка-катализатора ДНК-репарации гомологичной рекомбинацией (Jayathilaka et al., 2008; Song et al., 2016). Трансфецированные смесью HDR-ДНК-матрицы и CRISPR/Cas9-компонентов клетки действительно показали EGFP-свечение, в 3.5 более интенсивное, чем в контрольной группе, интеграция кДНК чЛФ дозе *RS-1* 10 мкмоль/л увеличилась на 33% относительно контроля (Zhou W, et al 2017b).

Заключение

Если в исследованиях по использованию гена β -лактоглобулина (как и других генов молочных белков) в получении трансгенных животных, вплоть до начала второго десятилетия 21-го века, главная роль принадлежала генетикам ведущих мировых держав (США, Великобритании, в том числе и России), в последние годы на передний план сельскохозяйственной биотехнологии вышли китайские исследователи. С использованием новых современных технологий ими уже успешно решены многие задачи, десятилетиями стоящие перед прикладной генной инженерией; в частности, получены сельскохозяйственные животные, продуцирующие с молоком адекватное количество белков человека со всеми присущими им функциями. Как показали работы последних лет, в большинстве случаев по показателям здоровья и развития такие животные не отличались от обычных контрольных животных, приобретенные качества наследуются по законам Менделя. Эти, назовем их – «новые виды животных», уже не вписываются в традиционно воспринимаемую схему «генетически модифицированных организмов», вызывающих у потенциального потребителя исключительно негативные эмоции. В последние годы получил распространение новый термин, более корректно описывающий текущую ситуацию – генетическое редактирование, которое, наряду с получением нового качества (или удаления нежелательного имеющегося), обеспечивает соблюдение принципа «не навреди».

С 2016 года в России введен запрет на выращивание и разведение генетически модифицированных растений и животных для производства продуктов питания, разрешены только научные исследования (Федеральный закон № 358-ФЗ от 3 июля 2016). Вместе с тем, если какой-то вариант «ослабления» этого запрета, в свете очевидного прогресса в технологиях генетического редактирования, не будет принят в ближайшей перспективе, то необходимость получения животных, продуцирующих с молоком биологически активные белки диагностического и лечебного назначения сохраняет свою актуальность.

ЛИТЕРАТУРА

1. Езерский В.А., Шевченко В.Г. Выделение и клонирование нуклеотидной последовательности 5'-области гена β -лактоглобулина быка для использования в генно-инженерных конструкциях // Сборник научных трудов ВНИИФБиП. – 2005. – Т. 44. – С. 176-188.
2. Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции на основе регуляторных элементов гена β -лактоглобулина быка и структурного гена лактоферрина человека // Сб. науч. тр. ВНИИФБиП. – 2006. – Т. 45. – С. 121-137.
3. Езерский В.А., Иванова Л.Б., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген *GCSF* человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2007. – № 1. – С. 123-131.
4. Езерский В.А., Шевченко В.Г. Создание генно-инженерной конструкции, содержащей структурный ген лактоферрина человека под контролем регуляторных элементов гена β -лактоглобулина крупного рогатого скота и репортерный ген GFP // Проблемы биологии продуктивных животных. – 2008. – № 2. – С. 3-12.
5. Зугмайер Г, Клиндер М., Шмидт М., Субклеве М. Клинический обзор анти-CD19 BiTE® и ex vivo данных об анти-CD33 BiTE® в качестве примеров ретаргетирования Т-клеток при гематологических опухолях // Российский журнал детской гематологии и онкологии. – 2016. – Т. 3. – № 2. – С. 18-30.
6. Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. Использование трансгенных животных в биотехнологии: перспективы и проблемы // Acta naturae. – 2013. – Т. 5. – № 1(16). – С. 33-47.
7. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas – инструменты открытий. – Acta naturae. – 2014. – Т. 6. – № 3(22). – С. 20-43.
8. Погорельский И.А., Позовникова М.В. Полиморфизм гена бета-лактоглобулина (BLG) в стаде крупного рогатого скота черно-пестрой породы и взаимосвязь его генотипов с показателями молочной продуктивности // Генетика и разведение животных. – 2014. – № 1. – С. 45-48.

9. Прокофьев М.И., Городецкий С.И., Черных В.Я., Мезина М.Н., Лагутина И.С., Косоруков В.С., Шепель Н.И. Способ получения трансгенного животного, экспрессирующего в молочной железе гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека и гибридный ген h-GM-1 для осуществления способа: патент РФ 2157846, 2000.
10. Прокофьев М.И., Городецкий С.И., Мезина М.Н., Юткин Е.В., Косоруков В.С., Букреев Ю.М., Антипова Т.А., Пинюгина М.Н., Карелина Т.К., Звездин А.В., Краевой С.А. Создание трансгенных кроликов, продуцирующих с молоком человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор // Сельскохозяйственная биология. – 2003. – № 6. – С. 49-54.
11. Хаертдинов Р.А., Закирова Г.М., Камалдинов И.Н., Фатихов А.Г.. Значение бета-лактоглобулина в белковом составе козьего молока. // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины. – 2017. – Т. 229. – № 1. – С. 58-61.
12. Ходарович Ю.М., Воробьева Н.Е., Мезина М.Н., Пинюгина М.В., Прокофьев М.И., Ларионов О.А.. Экспрессия бета-интерферона человека в молочной железе трансгенных кроликов // Биоорганическая химия. – 2008. – Т. 34. – № 2. – С. 185-193.
13. Archibald A.L., McClenaghan M., Hornsey V., Simons J.P., Clark A.J. High-level expression of biologically active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice (emphysema/elastase/antiprotease/recombinant DNA/therapeutic proteins) // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. – 1990. – Vol. 87. – P. 5178-5182.
14. Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition // J. Dairy Sci. – Vol. 92. – P. 5335-5352. doi: 10.3168/jds.2009-2461
15. Clark A.J., Bessos H., Bishop J.O., Brown P., Harris S., Lathe R., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B.A., Wilmut I. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep // Bio/Technology. – 1989. – Vol. 7. – P. 487-492. doi: 10.1038/nbt0589-487
16. 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. – Vol. 339. – P. 819-823. doi: 10.1126/science.1231143
17. Cooper C.A., Maga E.A., Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future // Transgenic Res. – 2015. – Vol. 24. – No. 4. – P. 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5
18. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double strand breaks with TAL effector nucleases // Genetics. – Vol. 186. – P. 757-761.
19. Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu, Jin Y., Zhang Y.. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk // Sci. Rep. – 2015. – No. 10482. doi: 10.1038/srep10482
20. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. Zinc finger nucleases: custom designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells // Nucl. Acids Res. – 2005. – Vol. 33. – P. 5978-5990.
21. Freitas V.J.F., Melo L.M., Batista R.I.T.P., Souza-Fabjan J.M.G., Teixeira D.I.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Serov O.L. Goats (*Capra hircus*) as bioreactors for production of recombinant proteins interesting to pharmaceutical industry // Clon. Transgen. – 2014. – Vol. 3. – P. 130. doi:10.4172/2168-9849.1000130
22. Ganai N.A., Bovenhuis H., van Arendonk J.A., Visker M.H. Novel polymorphisms in the bovine β -lactoglobulin gene and their effects on β -lactoglobulin protein concentration in milk // Anim. Genet. – 2008. – Vol. 40. – P. 127-133.
23. Ge H., Cui C., Liu J., Luo Y., Quan F., Jin Y., Zhang Y. The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β -lactoglobulin-knockout bucks // Transgenic Res. – 2016. – Vol. 25. – No. 5. – P. 721-729. doi: 10.1007/s11248-016-9967-z
24. Gutiérrez-Adán A., Maga E.A., Behboodi E., Conradbrink J.S., Mackinlay A.G., Anderson G.B., Murray J.D. Expression of bovine β -lactoglobulin transgenic mice // J. Dairy Res. – 1999. – Vol. 66. – P. 289-294.
25. He Z., Lu R., Zhang T., Jiang L., Zhou M., Wu D., Cheng Y. A novel recombinant human plasminogen activator: Efficient expression and hereditary stability in transgenic goats and in vitro thrombolytic bioactivity in the milk of transgenic goats // PLoS One. – 2018. – Vol. 13. – No. 8. – e0201788. doi: 10.1371/journal.pone.0201788
26. Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Hiltunen M.O., Myohanen S., Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice // J. Biotechnol. – 1998. – Vol. 61. – No. 3. – P. 191-198.

27. Ibáñez E., Folch J.M., Vidal F., Coll A., Santaló J., Egozcue J., Sánchez A. Expression of caprine b-lactoglobulin in the milk of transgenic mice // *Transgenic Research*. – 1976. – Vol. 6. – P. 69-74.
28. Jayathilaka K., Sheridan S.D., Bold T.D., Bochenska K., Logan H.L., Weichselbaum R.R., Bishop D.K., Connell P.P. A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51 // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105. – P. 15848-15853.
29. Kerr D.E., Plaut K., Bramley A.J., Williamson C.M., Lax A.J., Moore K., Wells K.D., Wall R.J. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice // *Nat. Biotechnol.* – 2001. – Vol. 19. – P. 66-70.
30. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1996. – Vol. 93. – P. 1156-1160.
31. Kishore A., Mukesh M., Sobti R.C., Khate K., Mishra B.P., Sodhi M. et al. Single nucleotide polymorphism in exon 4 and promoter regions of β -lactoglobulin gene in native cattle (*Bos indicus*) breeds of India // *J. Adv. Dairy Res.* – 2014. – Vol. 2 – P. 125. doi:10.4172/2329-888X.1000125
32. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits // *Eur. J. Biochem.* – 1997. – Vol. 245. – P. 482-489.
33. Lander E.S. The heroes of CRISPR // *Cell*. – 2016. – Vol. 164. – No. 1-2. – P. 18-28. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.041
34. Le Maux S., Bouhallab S., Giblin L., Brodkor A., Croguennec T. Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties // *Dairy Sci. Technol.* – 2014. – Vol. 94. – P. 409-426. doi: 10.1007/s13594-014-0160-y
35. Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows // *Nat. Commun.* – 2013. – Vol. 4. – P. 2565.
36. Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., Zhang Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases // *Proc. Biol. Sci.* – 2014. – Vol. 281. – P. 1780.
37. Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N. Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 22947. doi: 10.1038/srep22947
38. Lum L.S., Dovč P., Medrano J.F. Polymorphisms of bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor // *J. Dairy Sci.* – 1997. – Vol. 80. – P. 1389-1397.
39. Luo Y., Wang Y., Liu J., Cui C., Wu Y., Lan H., Chen Q., Liu X., Quan F., Guo Z., Zhang Y.. Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands // *Sci. Rep.* – 2016. – Vol. 6. – P. 20657. doi: 10.1038/srep20657
40. Malewski, T. Computer analysis of distribution of putative cis- and transregulatory elements in milk protein gene promoters // *Biosystems.* – 1998. – Vol. 45. – P. 29-44.
41. Mercier J.-C., Vilotte J.-L. Structure and function of milk protein genes // *J. Dairy Sci.* – 1993. – Vol. 76. – P. 3079-3098.
42. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice // *Biochem. J.* – 1995. – Vol. 310. – P. 637-641.
43. Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system // *PloS One.* – 2014. – Vol. 9. No. 9. – e106718. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>> – PMID: 25188313
44. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system // *Nature Protocols.* – 2013. – Vol. 8. – No. 11. – P. 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143 – PMID 24157548
45. Sardina M.T., Rosa A.J.M., Davoli R., Braglia S., Portolano B. Polymorphisms of beta - lactoglobulin promoter region in three Sicilian goat breeds // *Mol. Biol. Rep.* – 2012. – Vol. 39. – P. 3203-3210. doi: 10.1007/s11033-011-1087-5
46. Shani M., Barash I., Nathan M., Ricca G., Searfoss G.H., Dekel I., Faerman A., Givol D., Hurwitz D.R. Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice // *Transgenic Research*. – 1992. – Vol. 1. – P. 195-208.
47. Shu J.H., Zhang Y., Pan Z.F., Peng S.Y., Cao J.W., Li X.C. Construction of expression vector of human lactoferrin and its expression in bovine mammary epithelial cells // *Belg. J. Zool.* – 2007. – Vol. 137. – No. 2. – P. 231-237.

48. Simons J., McClenaghan M., Clarc A. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice // *Nature*. – 1987. – Vol. 328. – P. 530-532.
49. Song Y., Cui C., Zhu H., Li Q., Zhao F., Jin Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene // *Protein Expres. Purif.* – 2015. – Vol. 112. – P. 1-7.
50. Song J., Yang D., Xu J. et al. RS-1 enhances CRISPR/Cas9- and TALEN-mediated knock-in efficiency // *J. Nat. Commun.* – 2016. – Vol. 7. – P. 10548. doi: 10.1038/ncomms10548
51. Sun N., Zhao H. Transcription activator like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing // *Biotechnol. Bioeng.* – 2013. – Vol. 110. – P. 1811-1821.
52. Van Kuik-Romeijn P., De Groot N., Hooijberg E., De Boer H.A. Expression of a functional mouse-human chimeric anti-CD19 antibody in the milk of transgenic mice // *Transgenic Research*. – 2000. –Vol. 9. – No. 2. – P. 155-159.
53. Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome // *Sci. Rep.* – 2015. – Vol. 5. – P. 20155. doi: 10.1038/srep11735.
54. Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin // *Sci. Rep.* – 2018. – Vol. 8. – P. 7661. doi: 10.1038/s41598-018-25654-8
55. Whitelaw C B. Truncated beta-lactoglobulin transgenes are expressed in the kidney // *Gene*. – 1996. – Vol. 178. – No. 1-2. – P. 157-159.
56. Whitelaw C.B., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice // *Biochem. J.* – 1992. – Vol. 286. – P. 31-39.
57. Whitelaw C.B.A., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P. Engineering large animal models of human disease // *J. Pathol.* – 2016. – Vol. 238. – P. 247-256.
58. Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J.D., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos // *Biology of Reproduction*. – 2014. – Vol. 91. – No. 3. – Article 78. doi: 10.1095/biolreprod.114.121723
59. Wilmut I., Archibald A.L., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Whitelaw C.B.A., Clark A.J. Modification of milk composition // *J. Reprod. Fert.* – 1990. – Vol. 41. – P. 135-146.
60. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High-level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep // *Bio/Technol.* – 1991. – Vol. 9. – P. 830-834.
61. Xiong K., Li S., Zhang H., Cui Y., Yu D., Li Y., Sun W., Fu Y., Teng Y., Liu Z. et al. Targeted editing of goat genome with modular assembly zinc finger nucleases based on activity prediction by computational molecular modeling // *Mol. Biol. Rep.* – 2013. – Vol. 40. – P. 4251-4256.
62. Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle // *Cell Res.* – 2011. – Vol. 21. – P. 1638-1640.
63. Yuan Y.-G., Song S.-Z., Zhu M.-M., He Z.-Y., Lu R., Zhang T., Mi F., Wang J.-Y., Cheng Y. Human lactoferrin efficiently targeted into caprine beta-lactoglobulin locus with transcription activator-like effector nucleases // *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* – 2017. – Vol. 30. – No. 8. – P. 1175-1182. <<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0697>>
64. Zhou W., Wan Y., Guo R., Deng M., Deng K., Wang Z., Zhang Y., Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9 // *PLoS ONE*. – 2017a. – Vol. 12. – No. 10. – e0186056. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186056>>
65. Zhou W, Guo R, Deng M, Wang F, Zhang Y. RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin // *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao.*– 2017b. – Vol. 33. – No. 8. – P. 1224-1234. doi: 10.13345/j.cjb.170105
66. Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination // *PLoS ONE*. – 2016. – Vol. 11. – No. 6. – e0156636. doi:10.1371/journal.pone.0156636

REFERENCES.

1. Archibald A.L., McClenaghan M., Hornsey V., Simons J.P., Clark A.J. High-level expression of biologically active human α 1-antitrypsin in the milk of transgenic mice

- (emphysema/elastase/antiprotease/recombinant DNA/therapeutic proteins). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1990, 87: 5178-5182.
2. Caroli A.M., Chessa S., Erhardt G.J. Invited review: milk protein polymorphisms in cattle: effect on animal breeding and human nutrition. *J. Dairy Sci.* 92: 5335-5352. doi: 10.3168/jds.2009-2461
 3. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. Targeting DNA double strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*. 186, 757-761.
 4. Clark A.J., Bessos H., Bishop J.O., Brown P., Harris S., Lathe R., McClenaghan M., Prowse C., Simons J.P., Whitelaw C.B.A., Wilmut I. Expression of human anti-hemophilic factor IX in the milk of transgenic sheep. *Bio/Technology*. 1989, 7: 487-492. doi: 10.1038/nbt0589-487
 5. 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: 819-823. doi: 10.1126/science.1231143
 6. Cooper C.A., Maga E.A., Murray J.D. Production of human lactoferrin and lysozyme in the milk of transgenic dairy animals: past, present, and future. *Transgenic Res.* 2015, 24(4): 605-614. doi: 10.1007/s11248-015-9885-5
 7. Cui C., Song Y., Liu J., Ge H., Li Q., Huang H., Hu L., Zhu, Jin Y., Zhang Y. Gene targeting by TALEN-induced homologous recombination in goats directs H. production of β -lactoglobulin-free, high-human lactoferrin milk. *Sci. Rep.* 2015, No. 10482. doi: 10.1038/srep10482
 8. Durai S., Mani M., Kandavelou K., Wu J., Porteus M.H., Chandrasegaran S. Zinc finger nucle ases: custom designed molecular scissors for genome engineering of plant and mammalian cells. *Nucl. Acids Res.* 2005, 33: 5978-5990.
 9. Ezerskii V.A., Shevchenko V.G. [Isolation and cloning of the nucleotide sequence of the 5' region of the bull β -lactoglobulin gene for use in genetically engineered constructs]. *Sbornik nauchnykh trudov VNIIFBiP* (Proc. Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition). 2005, 44: 176-188.
 10. Ezerskii V.A., Ivanova L.B., Shevchenko V.G. [Creation of a genetic engineering structure based on regulatory elements of the bull's β -lactoglobulin gene and structural human lactoferrin gene]. *Sbornik nauchnykh trudov VNIIFBiP* (Proc. Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition). 2006, 45: 121-137.
 11. Ezerskii V.A., Ivanova L.B., Shevchenko V.G. [Creation of a genetic engineering structure containing the human GCSF structural gene under the control of the regulatory elements of the cattle beta-lactoglobulin gene]. *Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2007, 1: 123-131.
 12. Ezerskii V.A., Shevchenko V.G. [Creation of a genetic engineering structure containing a structural gene of human lactoferrin under the control of regulatory elements of the gene for β -lactoglobulin of cattle and the reporter gene GFP]. *Problemy biologii productivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology*. 2008, 2: 3-12.
 13. Freitas V.J.F., Melo L.M., Batista R.I.T.P., Souza-Fabjan J.M.G., Teixeira D.I.A., Serova I.A., Andreeva L.E., Burkov I.A., Serov O.L. Goats (*Capra hircus*) as bioreactors for production of recombinant proteins interesting to pharmaceutical industry. *Clon. Transgen.* 2014, 3: 130. doi:10.4172/2168-9849.1000130
 14. Ganai N.A., Bovenhuis H., van Arendonk J.A., Visker M.H. Novel polymorphisms in the bovine β -lactoglobulin gene and their effects on β -lactoglobulin protein concentration in milk. *Anim. Genet.* 2008, 40: 127-133.
 15. Ge H., Cui C., Liu J., Luo Y., Quan F., Jin Y., Zhang Y. The growth and reproduction performance of TALEN-mediated β -lactoglobulin-knockout bucks. *Transgenic Res.* 2016, 25(5): 721-729. doi: 10.1007/s11248-016-9967-z
 16. Gutiérrez-Adán A., Maga E.A., Behboodi E., Conradbrink J.S., Mackinlay A.G., Anderson G.B., Murray J.D. Expression of bovine β -lactoglobulin transgenic mice. *J. Dairy Res.* 1999, 66: 289-294.
 17. He Z., Lu R., Zhang T., Jiang L., Zhou M., Wu D., Cheng Y. A novel recombinant human plasminogen activator: Efficient expression and hereditary stability in transgenic goats and in vitro thrombolytic bioactivity in the milk of transgenic goats. *PLoS One*. 2018, 13(8): e0201788. doi: 10.1371/journal.pone.0201788
 18. Hyttinen J.M., Korhonen V.P., Hiltunen M.O., Myohanen S., Janne J. High-level expression of bovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *J. Biotechnol.* 1998, 61(3): 191-198.
 19. Ibáñez E., Folch J.M., Vidal F., Coll A., Santaló J., Egozcue J., Sánchez A. Expression of caprine β -lactoglobulin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*. 1976, 6: 69-74.

20. Jayathilaka K., Sheridan S.D., Bold T.D., Bochenska K., Logan H.L., Weichselbaum R.R., Bishop D.K., Connell P.P. A chemical compound that stimulates the human homologous recombination protein RAD51. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2008, 105: 15848-15853.
21. Khaertdinov R.A., Zakirova G.M., Kamaldinov I.N., Fatikhov A.G. [The importance of beta-lactoglobulin in the protein composition of goat's milk]. *Uchenye zapiski Kazanskoi gosudarstvennoi akademii veterinarnoi meditsiny - Scientific notes of the Kazan State Academy of Veterinary Medicine*. 2017, 229(1): 58-61.
22. Khodarovich Yu.M., Vorob'eva N.E., Mezina M.N., Pinyugina M.V., Prokof'ev M.I., Larionov O.A. [Expression of human interferon beta in the mammary gland of transgenic rabbits]. *Bioorganicheskaya khimiya - Bioorganic chemistry*. 2008, 34(2): 185-193.
23. Kerr D.E., Plaut K., Bramley A.J., Williamson C.M., Lax A.J., Moore K., Wells K.D., Wall R.J. Lysostaphin expression in mammary glands confers protection against staphylococcal infection in transgenic mice. *Nat. Biotechnol.* 2001, 19: 66-70.
24. Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1996, 93: 1156-1160.
25. Kishore A., Mukesh M., Sobti R.C., Khate K., Mishra B.P., Sodhi M. Single nucleotide polymorphism in exon 4 and promoter regions of β -lactoglobulin gene in native cattle (*Bos indicus*) breeds of India. *J. Adv. Dairy Res.* 2014, 2: 125. doi:10.4172/2329-888X.1000125
26. Korhonen V.P., Tolvanen M., Hyttinen J.M., Uusi-Oukari M., Sinervirta R., Alhonen L., Jauhiainen M., Janne O.A., Janne J. Expression of bovine beta-lactoglobulin/human erythropoietin fusion protein in the milk of transgenic mice and rabbits. *Eur. J. Biochem.* 1997, 15, 5(224): 482-489.
27. Lander E.S. The heroes of CRISPR. *Cell*. 2016, 164(1-2): 18-28. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.041
28. Le Maux S., Bouhallab S., Giblin L., Brodkor A., Croguennec T. Bovine β -lactoglobulin/fatty acid complexes: binding, structural, and biological properties. *Dairy Sci. Technol.* 2014, 94:409-426. doi: 10.1007/s13594-014-0160-y
29. Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. Zinc-finger nickase-mediated insertion of the lysostaphin gene into the beta-casein locus in cloned cows. *Nat. Commun.* 2013, 4: 2565.
30. Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., Zhang Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to beta-casein locus using zinc-finger nucleases. *Proc. Biol. Sci.* 2014, 281: 1780.
31. Lu D., Liu S., Ding F., Wang H., Li J., Li L., Dai Y., Li N. Large-scale production of functional human lysozyme from marker-free transgenic cloned cows. *Sci. Rep.* 2016, 6: 22947. doi: 10.1038/srep22947
32. Lum L.S., Dovč P., Medrano J.F. Polymorphisms of bovine β -lactoglobulin promoter and differences in the binding affinity of activator protein-2 transcription factor. *J. Dairy Sci.* 1997, 80: 1389-1397.
33. Luo Y., Wang Y., Liu J., Cui C., Wu Y., Lan H., Chen Q., Liu X., Quan F., Guo Z., Zhang Y. Generation of TALE nickase-mediated gene-targeted cows expressing human serum albumin in mammary glands. *Sci. Rep.* 2016, 6: 20657. doi: 10.1038/srep20657
34. Maksimenko O.G., Deikin A.V., Khodarovich Yu.M., Georgiev P.G. [The use of transgenic animals in biotechnology: perspectives and problems]. *Acta naturae*. 2013, 5, 1(16): 33-47. (In Russian)
35. Malewski, T. Computer analysis of distribution of putative cis- and transregulatory elements in milk protein gene promoters. *Biosystems*. 1998, 45: 29-44.
36. Mercier J.-C., Vilotte J.-L. Structure and function of milk protein genes. *J. Dairy Sci.* 1993, 76: 3079-3098.
37. McClenaghan M., Springbett A., Wallace R. Secretory proteins compete for production in the mammary gland of transgenic mice. *Biochem. J.* 1995, 310: 637-641.
38. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. [Genome editing systems TALEN and CRISPR / Cas - discovery tools]. *Acta naturae*. 2014, 6, 3(22): 20-43. (In Russian)
39. Ni W., Qiao J., Hu S., Zhao X., Regouski M., Yang M., Polejaeva I.A., Chen C. Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS One*. 2014, 9(9): e106718. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106718>> PMID: 25188313
40. Pogorel'skii I.A., Pozovnikova M.V. [Polymorphism of the beta-lactoglobulin gene (BLG) in a herd of cattle of Black-and-White breed and the interrelation of its genotypes with indicators of milk productivity]. *Genetika i razvedenie zhivotnykh - Genetics and breeding of animals*. 2014, № 1: 45-48.
41. Prokof'ev M.I., Gorodetskii S.I., Chernykh V.Ya., Mezina M.N., Lagutina I.S., Kosorukov V.S., Shepel' N.I. [A method for producing a transgenic animal expressing in the mammary gland a granulocyte colony-stimulating factor of a human and a hybrid h-GM-1 gene for carrying out the method]. *Patent of Russian Federation* No 2157846, 2000.

42. Prokof'ev M.I., Gorodetskii S.I., Mezina M.N., Yutkin E.V., Kosorukov V.S., Bukreev Yu.M., Antipova T.A., Pinyugina M.N., Karelina T.K., Zvezdin A.V., Kraevoi S.A. [Creation of transgenic rabbits producing with milk a human granulocyte colony-stimulating factor]. *Sel'skokhosyaistvennaya biologiya - Agricultural Biology*. 2003, 6: 49-54.
43. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nature Protocols*. 2013, 8(11): 2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. PMID 24157548.
44. Sardina M.T., Rosa A.J.M., Davoli R., Braglia S., Portolano B. Polymorphisms of beta-lactoglobulin promoter region in three Sicilian goat breeds. *Mol. Biol. Rep.* 2012, 39: 3203-3210. doi: 10.1007/s11033-011-1087-5
45. Shani M., Barash I., Nathan M., Ricca G., Searfoss G.H., Dekel I., Faerman A., Givol D., Hurwitz D.R. Expression of human serum albumin in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*. 1992, 1: 195-208.
46. Shu J.H., Zhang Y., Pan Z.F., Peng S.Y., Cao J.W., Li X.C. Construction of expression vector of human lactoferrin and its expression in bovine mammary epithelial cells. *Belg. J. Zool.* 2007, 137(2): 231-237.
47. Simons J., McClenaghan M., Clarc A. Alteration of the quality of milk by expression of sheep beta-lactoglobulin in transgenic mice. *Nature*. 1987, 328: 530-532.
48. Song Y., Cui C., Zhu H., Li Q., Zhao F., Jin Y. Expression, purification and characterization of zinc-finger nuclease to knockout the goat beta-lactoglobulin gene. *Protein Expres. Purif.* 2015, 112: 1-7.
49. Sun N., Zhao H. Transcription activator like effector nucleases (TALENs): a highly efficient and versatile tool for genome editing. *Biotechnol. Bioeng.* 2013, 110: 1811-1821.
50. Van Kuik-Romeijn P., De Groot N., Hooijberg E., De Boer H.A. Expression of a functional mouse-human chimeric anti-CD19 antibody in the milk of transgenic mice. *Transgenic Research*. 2000, 9(2): 155-159.
51. Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Sci. Rep.* 2015, 5: 20155.
52. Wei J., Wagner S., Maclean P., Brophy B., Cole S., Smolenski G., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., Wells D.N., Laible G. Cattle with a precise, zygote-mediated deletion safely eliminate the major milk allergen beta-lactoglobulin. *Sci. Rep.* 2018, 8: 7661. doi: 10.1038/s41598-018-25654-8
53. Whitelaw C B. Truncated beta-lactoglobulin transgenes are expressed in the kidney. *Gene*. 1996, 178(1-2): 157-159.
54. Whitelaw C.B., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Clark A.J. Position-independent expression of the ovine beta-lactoglobulin gene in transgenic mice. *Biochem. J.* 1992, 286: 31-39.
55. Whitelaw C.B.A., Sheets T.P., Lillico S.G., Telugu B.P. Engineering large animal models of human disease. *J. Pathol.* 2016, 238: 247-256.
56. Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A., Beaton B.P., Spate L.D., Murphy S.L., Samuel M.S., Mao J.D., O'Gorman C., Walters E.M., Murphy C.N., Driver J., Mileham A., McLaren D., Wells K.D., Prather R.S. Use of the CRISPR/Cas9 system to produce genetically engineered pigs from in vitro-derived oocytes and embryos. *Biology of Reproduction*. 2014, 91(3), Article 78. doi: 10.1095/biolreprod.114.121723
57. Wilmut I., Archibald A.L., Harris S., McClenaghan M., Simons J.P., Whitelaw C.B.A., Clark A.J. Modification of milk composition. *J. Reprod. Fert.* 1990, 41: 135-146.
58. Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmut I., Garner I., Colman A. High-level expression of active human alpha-1-antitrypsin in the milk of transgenic sheep. *BioTechnol.* 1991, 9: 830-834.
59. Xiong K., Li S., Zhang H., Cui Y., Yu D., Li Y., Sun W., Fu Y., Teng Y., Liu Z. et al. Targeted editing of goat genome with modular assembly zinc finger nucleases based on activity prediction by computational molecular modeling. *Mol. Biol. Rep.* 2013, 40: 4251-4256.
60. Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res*. 2011, 21: 1638-1640.
61. Yuan Y.-G., Song S.-Z., Zhu M.-M., He Z.-Y., Lu R., Zhang T., Mi F., Wang J.-Y., Cheng Y. Human lactoferrin efficiently targeted into caprine beta-lactoglobulin locus with transcription activator-like effector nucleases. *Asian-Austral. J. Anim. Sci.* 2017, 30(8): 1175-1182. <<https://doi.org/10.5713/ajas.16.0697>>
62. Zhou W., Wan Y., Guo R., Deng M., Deng K., Wang Z., Zhang Y., Wang F. Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*. 2017, 12(10): e0186056. <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186056>>
63. Zhou W, Guo R, Deng M, Wang F, Zhang Y. RS-1 enhanced the efficiency of CRISPR-Cas9 mediated knock-in of human lactoferrin. *Sheng Wu Gong Cheng Xue Bao*. 2017, 33(8): 1224-1234. doi: 10.13345/j.cjb.170105.

64. Zhu H., Liu J., Cui C., Song Y., Ge H., Hu L., Li Q., Jin Y., Zhang Y. Targeting human α -lactalbumin gene insertion into the goat β -lactoglobulin locus by TALEN-mediated homologous recombination. *PLoS ONE*. 2016, 11(6): e0156636. doi:10.1371/journal.pone.0156636
65. Zugmaier G, Klinger M., Schmidt M., Subkleve M. [Clinical review of anti-CD19 BiTE® and ex vivo anti-CD33 BiTE® data as examples of retargeting T cells in hematological tumors]. *Rossiiskii zhurnal detskoj gematologii i onkologii - Russian Journal of Pediatric Hematology and Oncology* 2016, 3(2): 8-30.

Use of beta-lactoglobulin gene in the production of recombinant proteins – from old technologies of transgenesis to new methods of genome editing: a review

Trubitsina T.P., Ryabykh V.P., Koloskova E.M., Yezersky V.A., Maksimenko S.V.

Institute of Animal Physiology, Biochemistry and Nutrition, Borovsk, Kaluga Region, Russian Federation

ABSTRACT. In studies conducted in the world to aimed to create the animal producers of biologically active proteins with milk (the mammary gland as a bioreactor), a significant proportion belongs to work with the β -lactoglobulin gene (*BLG*). The review deals with the use of gene constructs involving *BLG* fragments at different stages of development of this research area. The evolution and effectiveness of new technologies are discussed that allow the site-specific integration of the transgene, including the use of site-specific nucleases-ZFN (zinc-finger nucleases), TALEN (transcription activator-like effector nuclease) and CRISPR/Cas9 (clustered with reciprocated short palindromic repeats). In these new technologies, a site-specific double-stranded DNA rupture is obtained; damage is eliminated by a non-homologous joining of the ends or by repair by homologous recombination using DNA template (transgene) flanked by the arms of homology to the adjacent regions of the DNA target. The recovery process often leads to targeted mutations in the form of deletions or insertions of nucleotides, which can lead to mutations in the frame shift and gene knockout. CRISPR/Cas9 technology has become dominant in the creation of transgenic farm animals, making it possible to produce large genetically modified animals in a shorter time, mainly by micro-injection in zygotic pronuclei. The review focuses on the use of *BLG* fragments as part of hybrid genetic constructs. Among the new important applications of new technologies is the production of animals, which express monoclonal antibodies, β -interferon, lactoferrin, G-CSF and human lactoferrin in milk. In Russia, an embargo on the cultivation and breeding of genetically modified plants and animals for food production was introduced. However, if some version of the "easing" of this ban, in the light of obvious progress in genetic editing technologies, will not be adopted in the short term, the need to obtain animals that produce biologically active proteins of diagnostic and therapeutic use remains relevant.

Keywords: β -lactoglobulin gene, genome editing, site-specific nuclease, hybrid gene constructs, production of recombinant proteins with milk

Problemy biologii produktivnykh zhivotnykh - Problems of Productive Animal Biology, 2018, 3: 15-34.

Поступило в редакцию: 10.08.2018

Получено после доработки: 3.09.2018

Трубицина Татьяна Петровна, к.б.н., с.н.с.; 8(906)641-15-72; trubitsina.tp@yandex.ru

Рябых Владимир Павлович, д.б.н., зав. лаб., 8(484)386-64-31, vlt03@kaluga.ru

Колоскова Елена Михайловна, к.б.н., с.н.с.; 8(910)590-92-83; heleko3@yandex.ru

Езерский Вадим Александрович, с.н.с.; 8(906)642-59-92; ez.vadim@yandex.ru

Максименко Сергей Васильевич, к.б.н., с.н.с.; 8(906)645-02-52; vx136@rambler.ru