

Ген бета-лактоглобулина крупного рогатого скота – объект для модификаций с использованием технологии геномного редактирования

Колоскова Е.М., Езерский В.А.

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

Внесение модификаций в геном с/х животных **для увеличения объёмов производства и получения продуктов питания** с заданными свойствами – перспективное направление биотехнологии.

За последние 30 лет были созданы трансгенные коровы для:

- увеличения доли бета- и каппа-казеина в молоке,
- повышения устойчивости к болезням,
- увеличение мясной продуктивности.
- **экспрессии с молоком белков фармацевтического назначения.**

Основной недостаток классического трансгенеза –

непредсказуемость места интеграции трансгена в геном и количество встроенных копий.

Трудности, связанные с получением трансгенного домашнего скота:

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

Появление идеи животных-продуцентов биологически активных белков с молоком (**молочная железа – биореактор**) связано с исследованиями генов белков молока.

Генная конструкция для тканеспецифической экспрессии рекомбинантных белков в молочной железе содержит:

- 5'-область гена белка молока с промотором, тканеспецифичными энхансерами, первыми некодирующими экзонами и расположенными между ними интронами;
- 3'-нетранслируемую область, содержащую последние некодирующие экзоны и интроны, сайт полиаденилирования и прилежащие последовательно-сти, потенциально способные усиливать терминацию транскрипции.

Ген **β -лактоглобулина (BLG)** овец, коз, крупного рогатого скота - удобный объект для оценки видо-, тканеспецифичности его экспрессии, изучения роли его регуляторных регионов в эффективности как собственной экспрессии в качестве трансгена, так и экспрессии генов других белков.

Регуляторные элементы гена BLG КРС мы использовали при создании генных конструкций, содержащих кДНК лактоферрина человека или геномную копию Г-КСФ человека. С целью селекции трансгенных эмбрионов на предимплантационной стадии в плазмиды вводили ген зеленого флуоресцентного белка под цитомегаловирусным промотором.

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

Современные технологии редактирования генов (ZFN, TALEN, CRISPR/Cas9) становятся инструментом в **эволюции селекции животных** за счет уменьшения интервалов генерации необходимых мутаций в гаметах in vitro.

Цели редактирования генома у сельскохозяйственных животных:

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

Технология **CRISPR/Cas9** с использованием механизма прямой гомологичной рекомбинации (HDR) и негомологичного соединения концов (NHEJ) – эффективный метод изменения и коррекции состава молока замещением или нокаутом генов эндогенных молочных белков у сельскохозяйственных животных.

Коровье молоко - наиболее распространенный пищевой аллерген. Сенсибилизация к белкам молока является началом формирования ряда патологических процессов, таких как бронхиальная астма, крапивница, атопический дерматит, дисфункции желудочно-кишечного тракта. Пищевая аллергия в ряде случаев предшествует развитию выраженной пыльцевой аллергии.

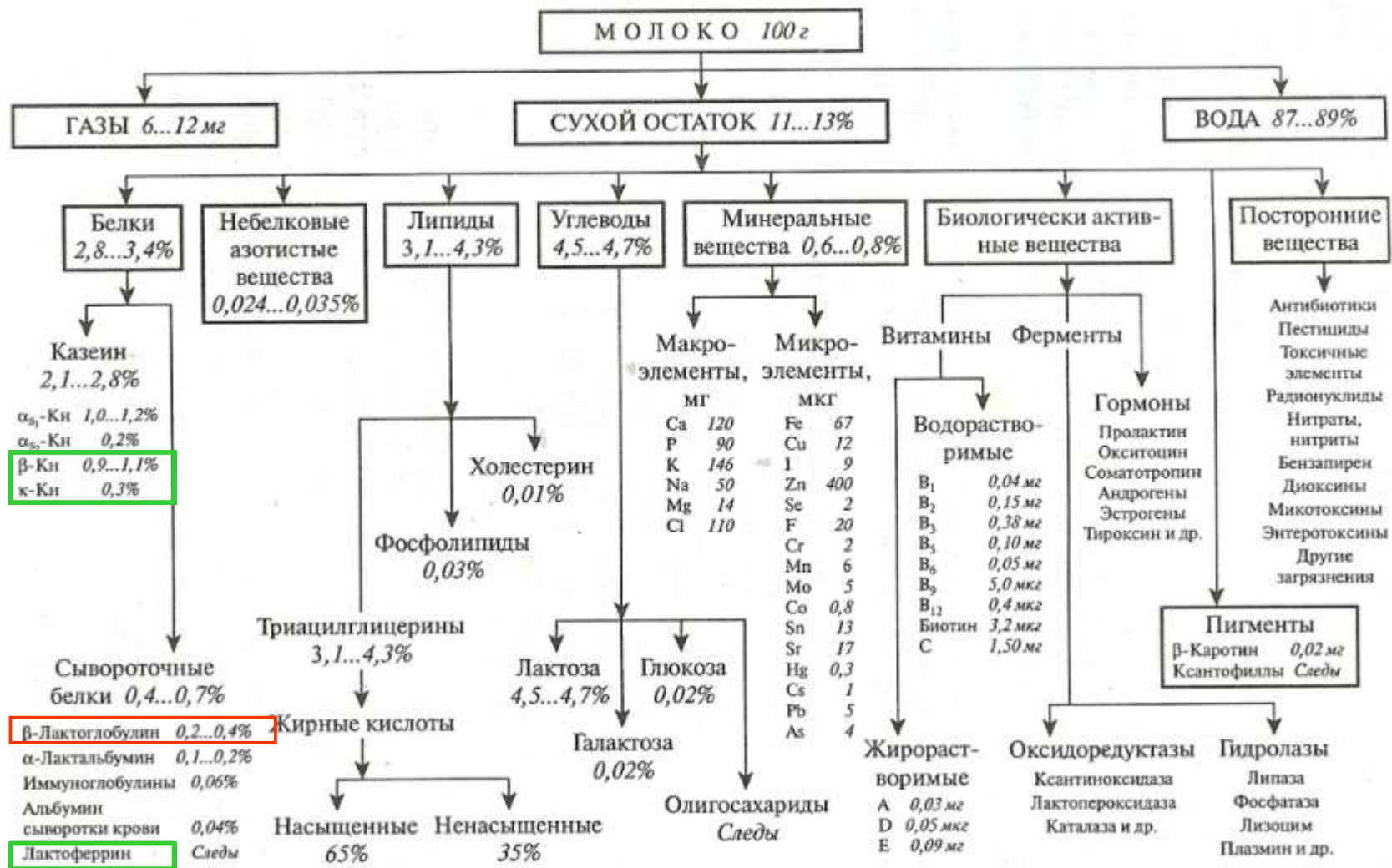
β-Лактоглобулин, белок молочной сыворотки, - основной молочный аллерген. Нокаут гена БЛГ с помощью технологий генного редактирования полностью решает проблему создания гипоаллергенных молочных продуктов.

В 2017 году посредством микроинъекции зигот CRISPR/Cas9-компонентов были созданы *BLG*-нокаутные козы.

Сообщений о получении КРС с модифицированным геном *BLG* с применением системы CRISPR/Cas9 пока не найдено.



Химический состав коровьего молока



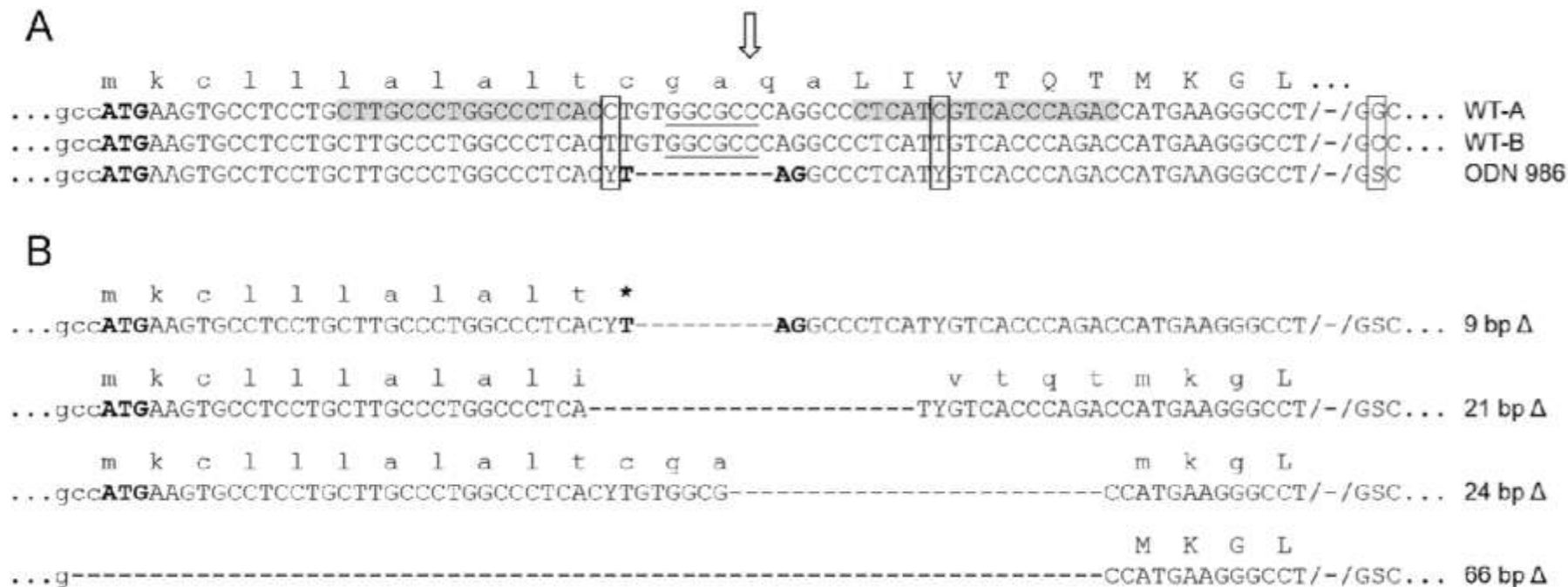
Концентрация БЛГ в молоке КРС – до 4,6 г/л.

Работы по модификации гена бета-лактоглобулина КРС и коз, завершившиеся получением редактированного потомства

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

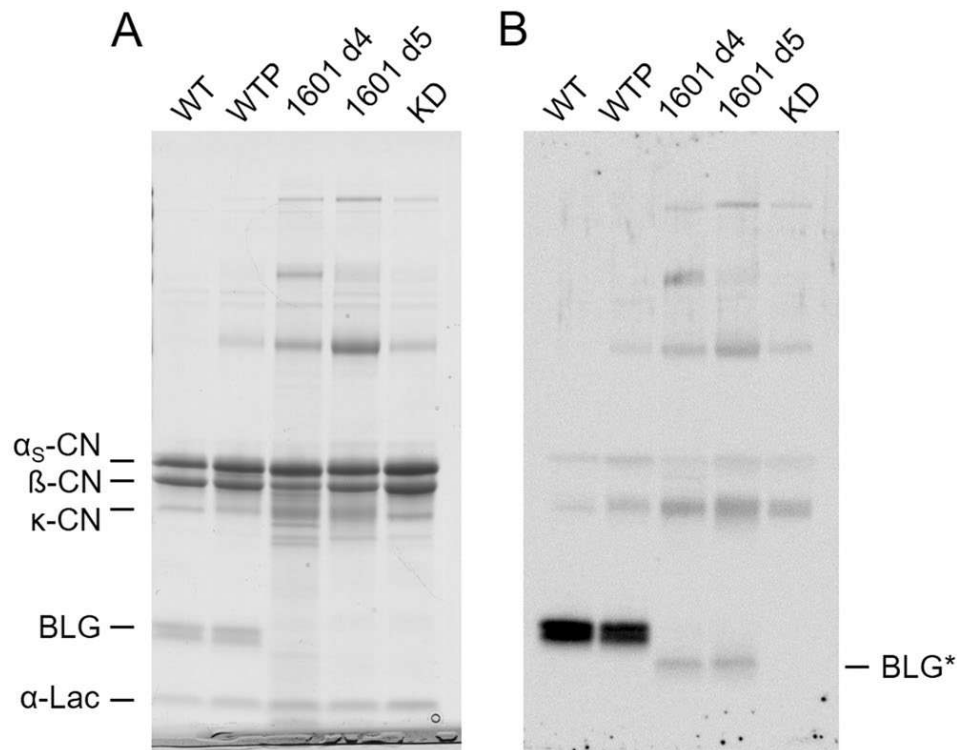
Примечание. ФФБ - фетальные фибробласты; УФБ – ушные фибробласты; SCNT (Somatic cell nuclear transfer) - перенос ядра соматической клетки; ЦПМИ – цитоплазматическая инъекция; NHEJ – Негомологичное соединение концов; HDR – гомологией направленная репарация; ssODN – одноцепочечный олигонуклеотид; KO – нокаут; KI – введение генов; ZFN,TALEN, CRISPR/Cas9 – эндонуклеазные методы редактирования генов.

TALEN-модификация гена BLG



А) Последовательности гена BLG основных полиморфов: А и В с сайтами связывания TALEN и местом расщепления (стрелка). Выровненная HDR-матрица (ODN 986) содержит два Y- и один S-нуклеотид в трех сайтах полиморфизма. Сайт распознавания рестриктазы SfoI. Выделены **ATG** и стоп-кодон (**TGA**).

В) Выровненные последовательности отредактированных аллелей, показывающие конечные точки четырех идентифицированных делеций (9, 21, 24 и 66Δ). Сверху - соответствующие аминокислотные последовательности в однобуквенном коде: аминокислоты сигнального пептида, АМИНОКИСЛОТЫ зрелого белка.



Содержание BLG в молоке КО BLG телочки №1601.

А) SDS-ПААГ-электрофорез;

В) вестерн-блотт анализ SDS-ПААГ разных проб молока:

WT – молоко от одной коровы дикого типа;

WTP - объединенная проба молока от нескольких коров дикого типа;

1601 d4 и d5: образец молока от 1601 года на четвертый и пятый день индуцированной лактации;

KD - молоко линии КО BLG КРС.

Наблюдаются все основные молочные белки и укороченные формы BLG (BLG*).

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



1601

[Wei J. et al., 2018]

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

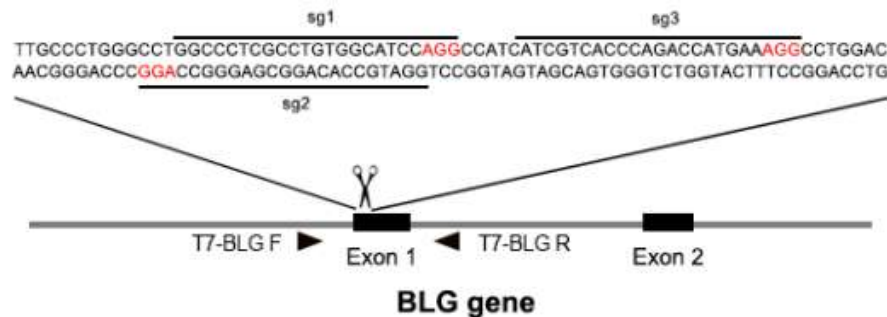
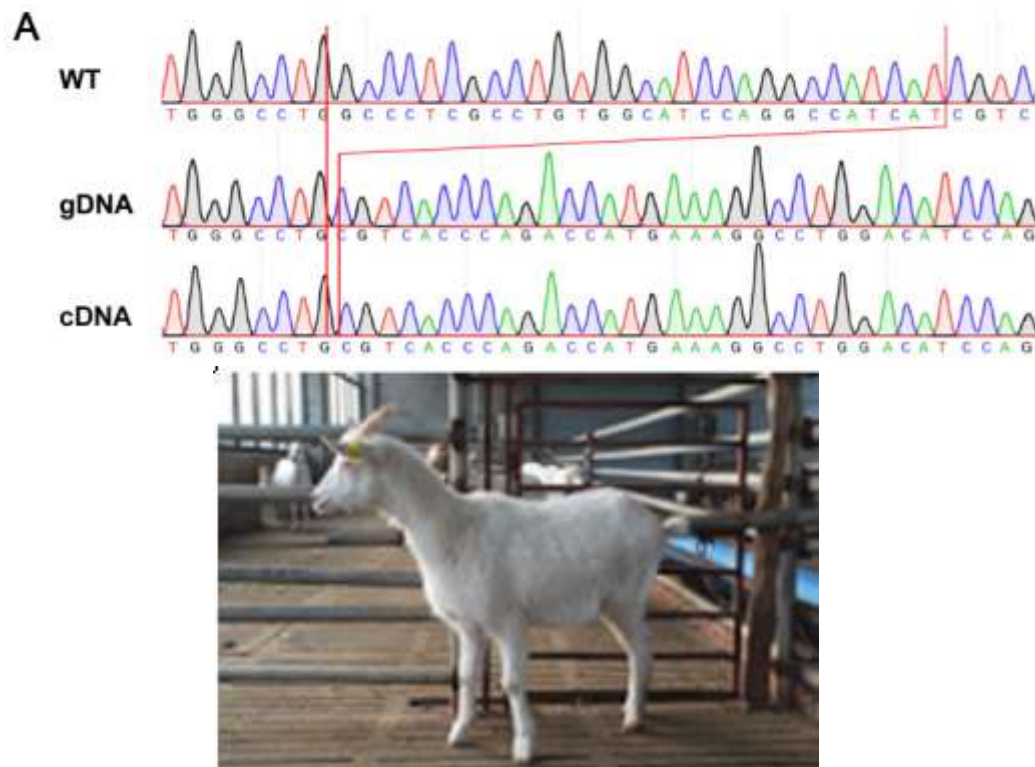


Схема - конструкция sgRNA для локуса BLG козы.

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

Результаты секвенирования BLG-модифицированных козлят

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

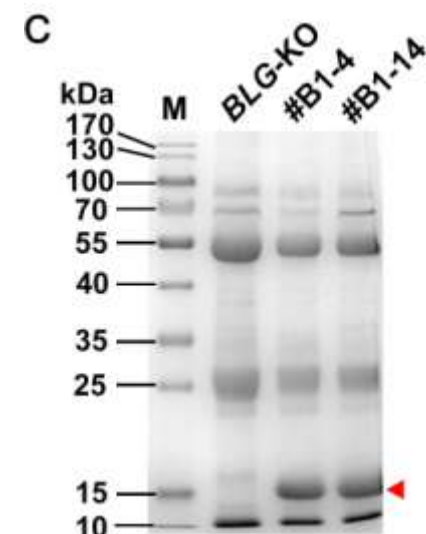
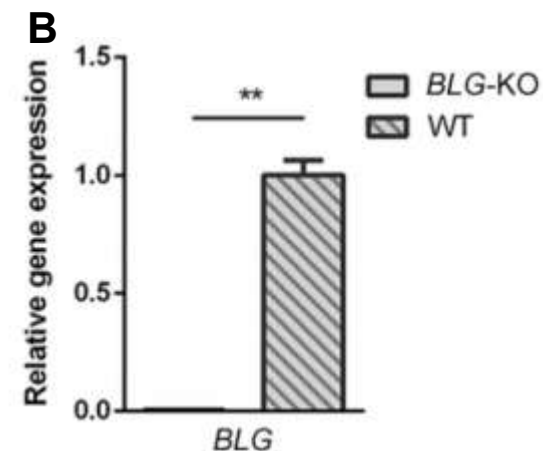


Анализ генотипа и экспрессии BLG в молоке и молочной железе.

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

В) анализ экспрессии BLG при индуцированной лактации.

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



Сообщений о получении КРС с модифицированным геном *BLG* с применением системы CRISPR/Cas9 не найдено.

Точное встраивание трансгена в составе генной конструкции, содержащей плечи гомологии к гену *BLG*, обеспечит его экспрессию под управлением полноразмерных эндогенных регуляторных последовательностей.

Цели и задачи наших исследований:

1. Создать плазмиду, содержащую плечи гомологии к областям гена *BLG* КРС с тем, чтобы в нее можно было интегрировать ДНК-последовательность целевого белка.
 - создать модельную генетическую конструкцию, содержащую ген GFP под CMV промотором для интеграции гомологичной рекомбинацией в локус гена *BLG* при совместной микроинъекции в зиготы с сайт-специфичными компонентами системы CRISPR/Cas9.
2. Разработать **стратегию модификации** гена *BLG* КРС с использованием технологии CRISPR/Cas9 с целью нокаута и сайт-специфической интеграции гена маркерного белка.
3. Разработать **стратегию анализа** возможных генетических модификаций (NHEJ, HDR), возникших в результате работы компонентов системы CRISPR/Cas9 и ГИК, у эмбрионов в условиях *in vitro*.

Для достижения цели требовалось:

- подобрать последовательности направляющих РНК (нРНК) к гену BLG КРС.

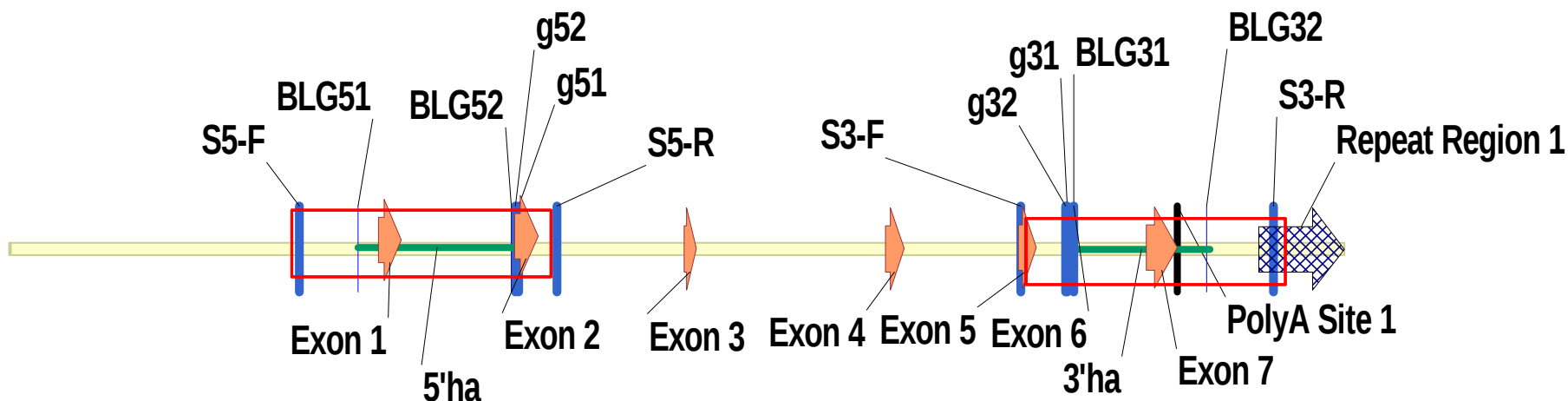
*Сиквенс и рестриктный анализ клонированных последовательностей гена BLG быка «Мороз» черно-пестрой породы показал наличие **А-аллеля**, тогда как опубликованные в базе данных GenBank записи X14710 и Z48305 (*B.taurus* gene for beta-lactoglobulin variant B) соответствуют В-аллелю.*

- разработать систему ПЦР-анализа возможных вариантов внесенных изменений для конкретного аллельного варианта BLG для осуществления его модификаций (нокаут гена локальными инделями или крупной делецией)

*Подбор протоспейсерных последовательностей для создания направляющих РНК подбирали с использованием on-line программ CHOPCHOP <<http://chopchop.cbu.uib.no/>>, CRISPR direct <<http://crispr.dbcls.jp/>>, CRISPOR v.4.8. <http://crispor.tefor.net/> с учетом секвенированной последовательности (**А-аллеля гена BLG**).*

Полиморфизм гена *BLG* может стать причиной низкой эффективности работы компонентов CRISPR/ Cas9: на мясокомбинатах яичники КРС отбирают от коров разных пород. В экспериментах *in vitro* оплодотворение яйцеклеток, как правило, производится спермой одного быка.

Схема гена BLG КРС: подбор плечей гомологии для создания ДНК-матрицы гомологичной рекомбинации.



Указаны сайты связывания используемых праймеров, локализация протоспейсерных последовательностей.

Красными рамками выделены последовательности для секвенирования.

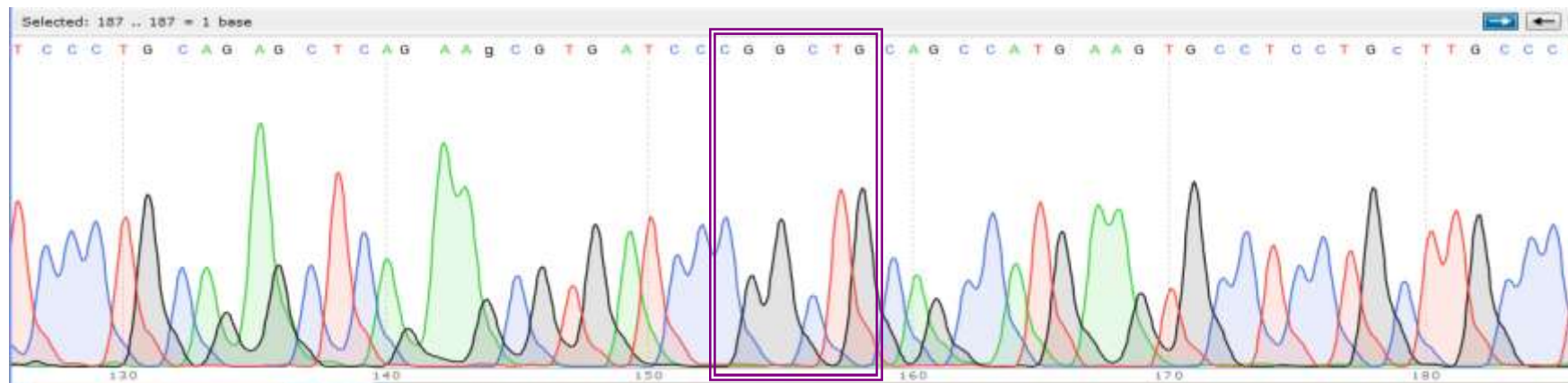
Классический способ генотипирования гена BLG KPC – поиск полиморфизма, в области 1-го экзона и интрона, в 4-м экзоне.

Полиморфизм гена BLG геномной ДНК быка «Мороз» определяли с использованием одной из пар наших праймеров и рестриктазы PvuII. ПЦР-амплификат размером 1195 п.н. после обработки PvuII на электрофореze в агарозном геле показал два фрагмента, соответствующие 743, 452 п.н. – **А-аллель**

Определение полиморфизма гена BLG быка «Мороз»

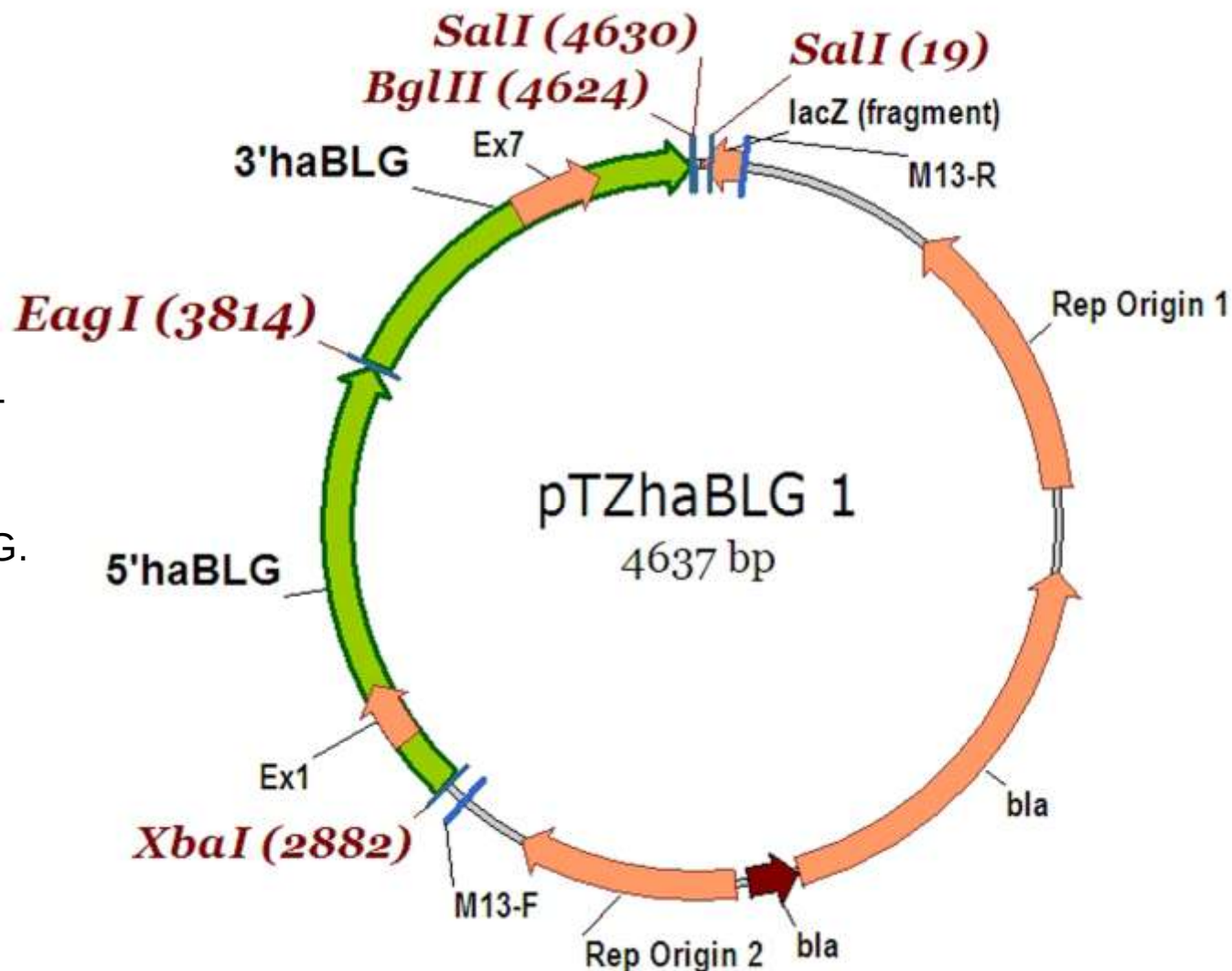
Фрагменты	Размеры фрагментов, п.н.	
	Праймер1/Праймер2 [из: <i>Гладырь, 2001</i>]	BLG51/S5-R (использовали)
ПЦР-амплификат	1248	1195
PvuII рестрикты для А -аллеля	774, 474	743, 452
PvuII рестрикты для В -аллеля	774, 297, 177	155, 297, 743

Фрагмент секвенированной последовательности pTZhaBLG, содержащий участок полиморфизма в области 1-го экзона гена BLG (выделен рамкой).



Сиквенс и рестриктный анализ клонированных последовательностей гена *BLG* быка «Мороз» черно-пестрой породы показал А-аллель, тогда как опубликованные в базе данных GenBank записи X14710 и Z48305 (*B.taurus* gene for beta-lactoglobulin variant B) соответствуют В-аллелю.

Схема плазмиды-матрицы pTZhaBLG, созданной на основе pTZ57R/T.

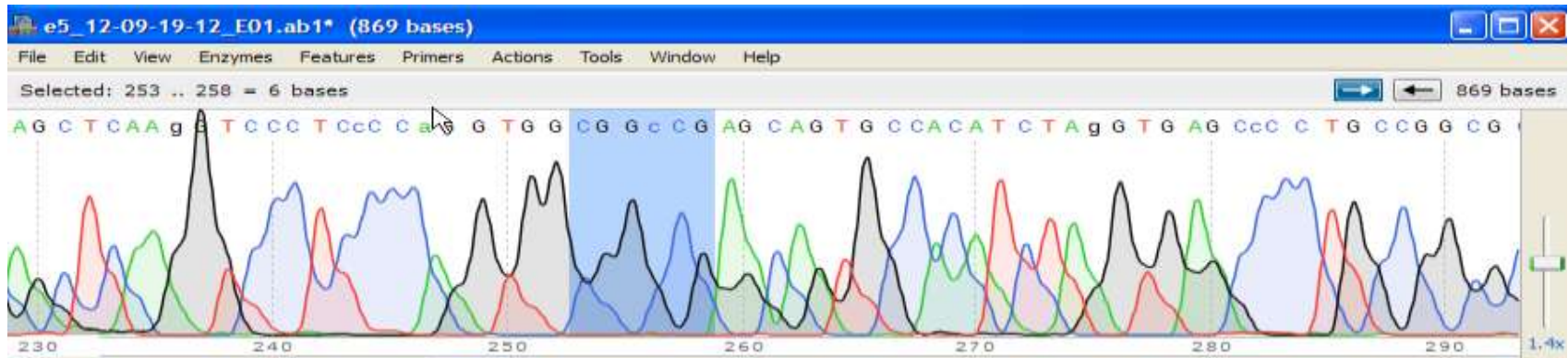


Плазмида содержит плечи гомологии к гену BLG KPC: 5'haBLG и 3'haBLG. Указаны основные элементы конструкции, сайты рестрикции.

Рекомбинантная плазмида ***pTZhaBLG***, содержащая плечи гомологии к гену BLG крупного рогатого скота, может быть использована для клонирования по *EagI* сайту ДНК целевого биологически активного белка с перспективой получения относительно простым **методом микроинъекции** зигот трансгенного КРС, продуцирующего рекомбинантные белки с молоком вместо β -лактоглобулина – при использовании ***CRISPR/Cas9*** технологии.



Фрагмент секвенированной последовательности pTZhaBLG, содержащий участок соединения 5'- и 3'- плечей гомологии к гену BLG.



Плазмида **pTZhaBLG** содержит уникальный сайт для *EagI*, который можно использовать для клонирования ДНК целевого белка

Схема модельной плазмиды pBLGcmvEGFP, созданной на основе pTZhaBLG.

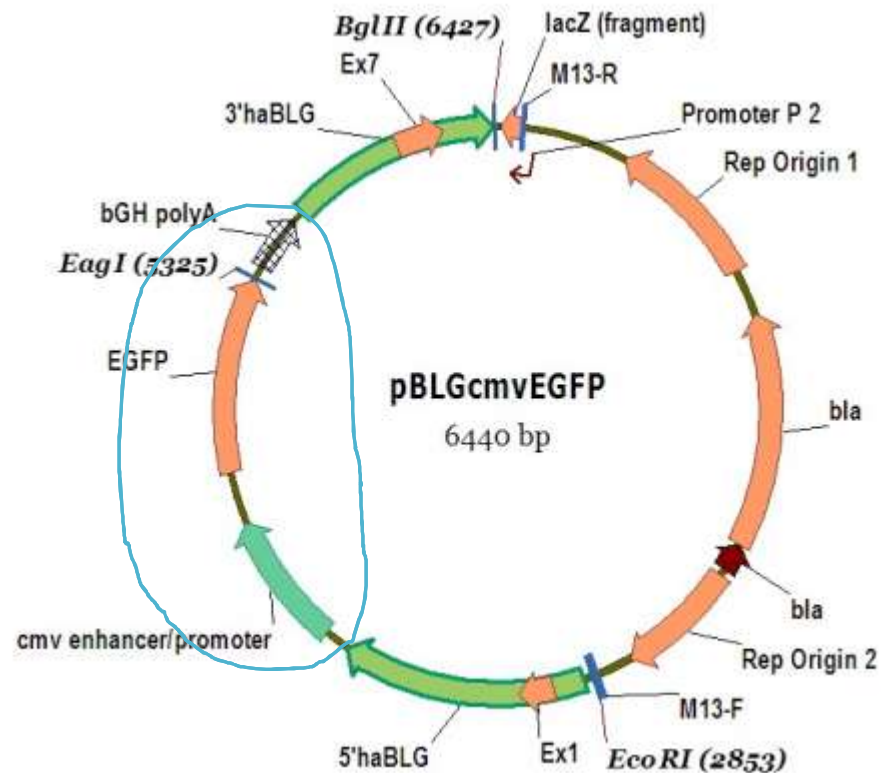
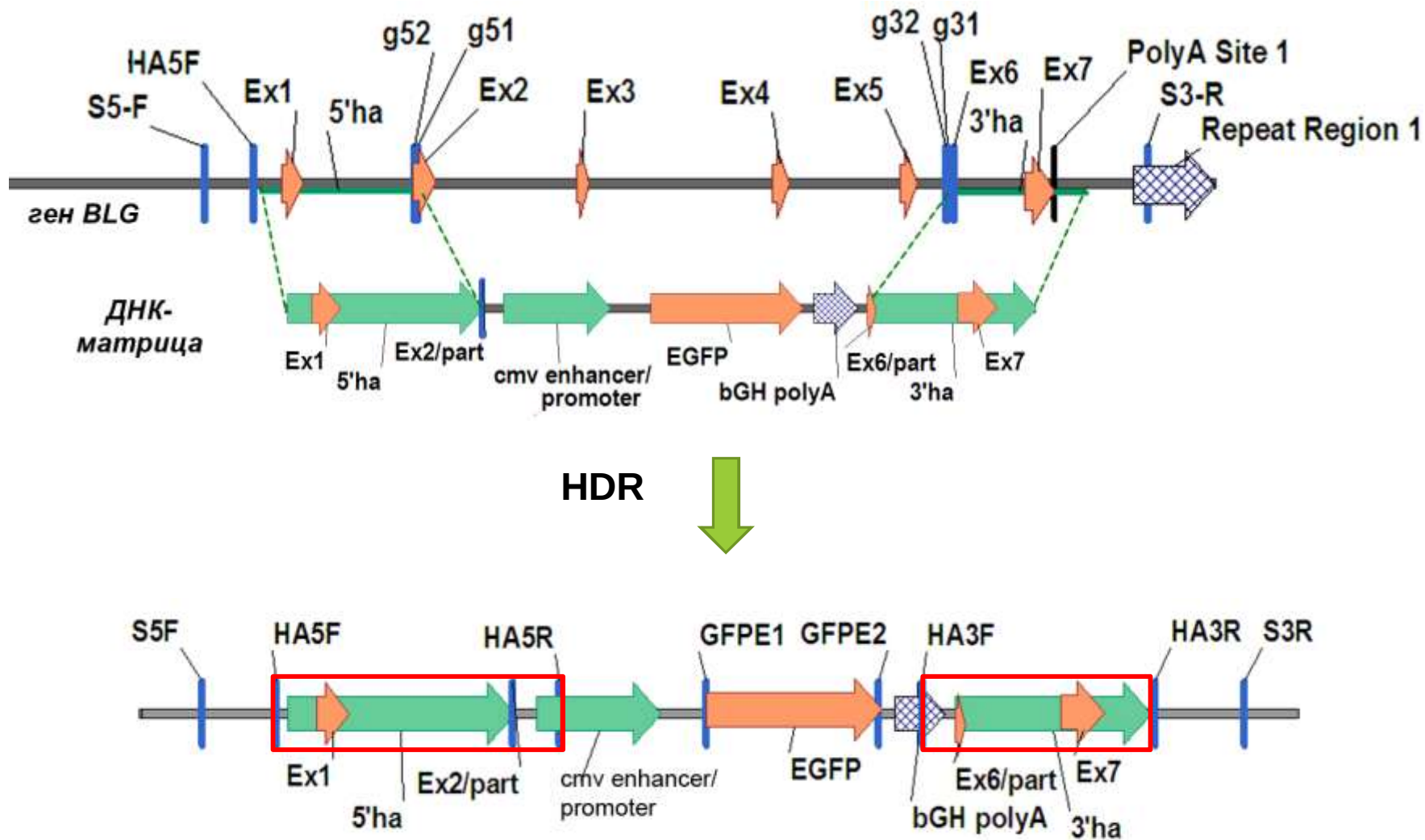
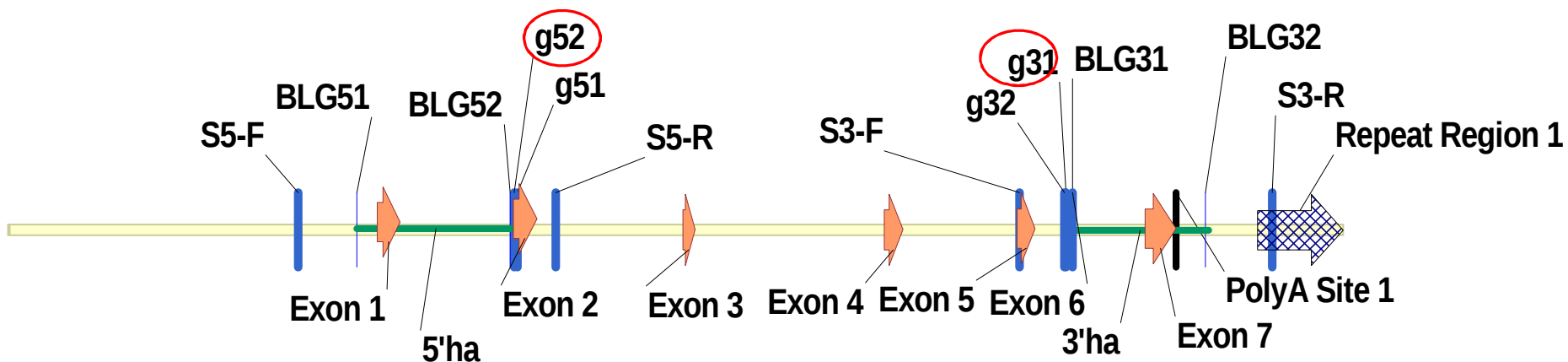


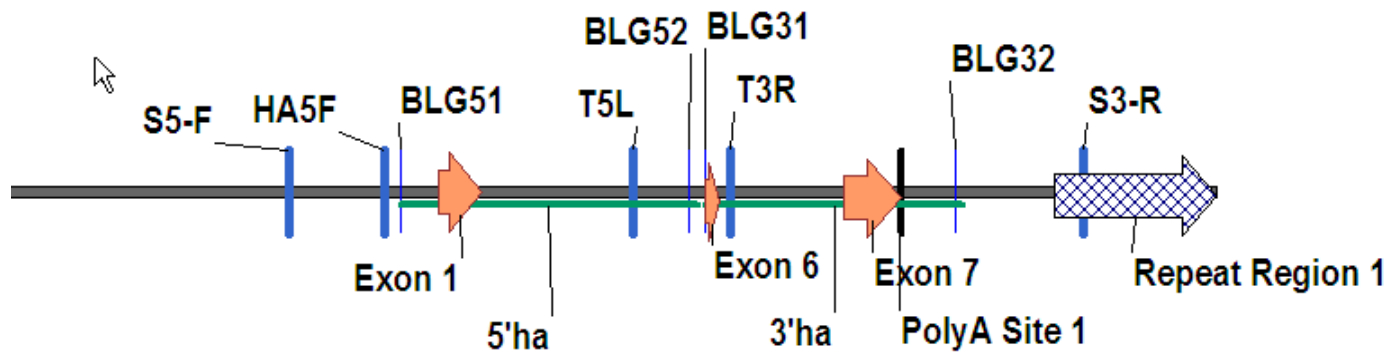
Схема гомологичной рекомбинации генной конструкции BLGcmvEGFP с геном BLG.



Вариант репарации негомولوجичным соединением концов.



NHEJ
(большая делеция g52-g31)



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

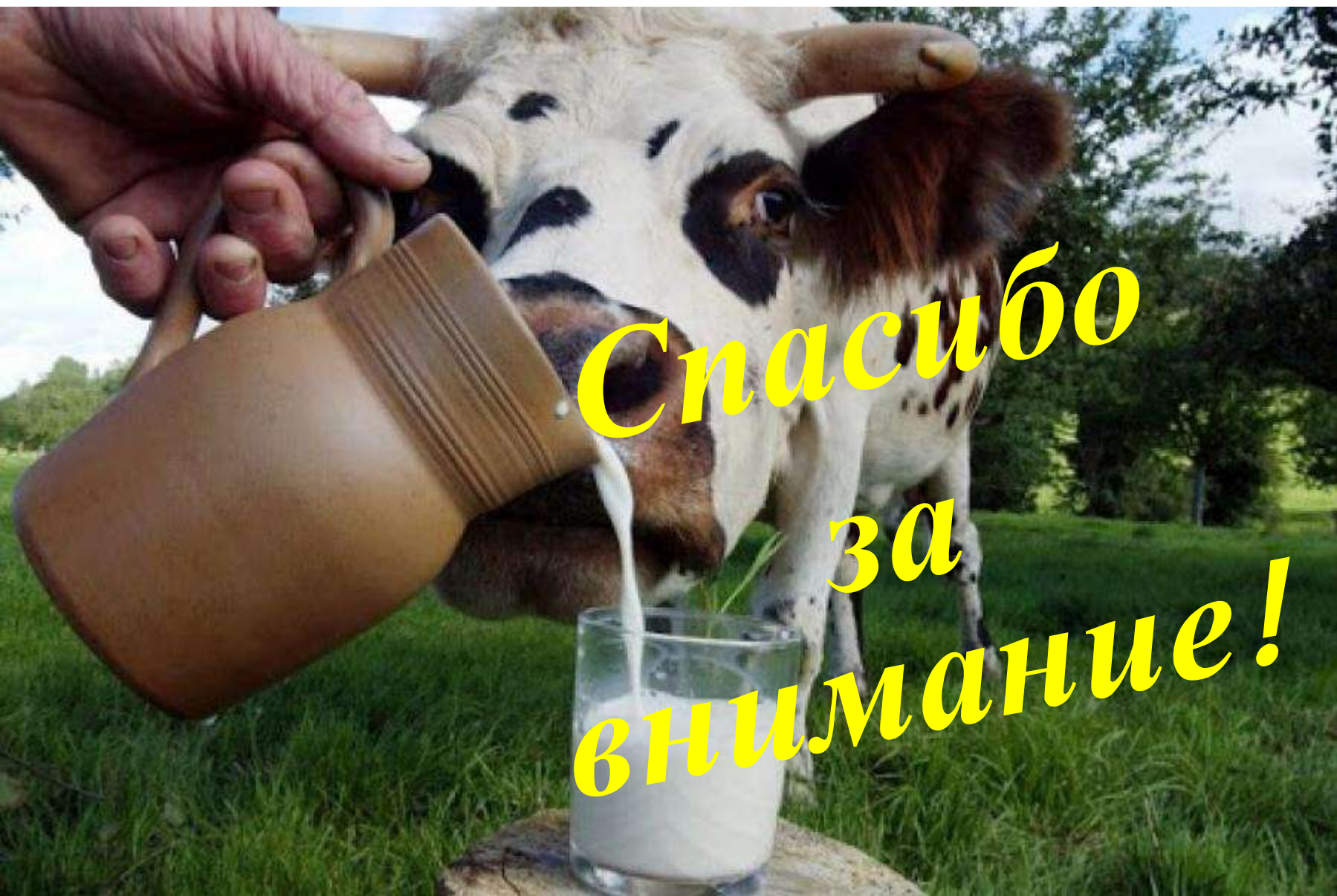
A pair of primers	Amplification product size, bp		Detection
	WT animal	Genetically modified animal	
T5L / T5R	490	< 490 (Δ G51/G52)	Small deletions, PAAG
T3L / T3R	397	< 397 (Δ G31/G33)	
T5L / T3R	3598	$\approx$ 320 for Δ G51(G52)/G31(G32)	Large deletions, AG
HA5F / HA5R	-	1179 (5'HA for HDR)	AG
HA3F/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

Результаты

1. Разработана **стратегия модификации** гена *BLG* КРС для его нокаута и сайт-специфической интеграции гена маркерного белка с использованием технологии CRISPR/Cas9 .
2. Разработана **стратегия анализа** возможных генетических модификаций, возникших в результате работы компонентов системы CRISPR/Cas9 и ГИК, микроинъецированных в зиготы (NHEJ, HDR).

Получены генетические конструкции:

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



Спасибо
за
внимание!