

## ОБЗОРЫ

УДК 636.2:636.034

**НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ СОВРЕМЕННЫХ ГЕНОМНЫХ И ГЕННО-ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ В МОЛОЧНОМ СКОТОВОДСТВЕ****Бурсаков С.А., Ковальчук С.Н.***ФГБНУ «Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктивных биотехнологий», Москва, e-mail: sergey@ceerb.ru*

В ближайшие десятилетия мир столкнется с вопросами перенаселения, выдвигая задачу интенсификации производства продуктов питания. Возможности повышения эффективности традиционных селекционных программ в области молочного животноводства ограничены продолжительностью генерационного интервала у крупного рогатого скота, поэтому приобретают актуальность концепции вмешательства человека на генетическом уровне. В области молочного животноводства быстрое наращивание производства молока и продуктов его переработки возможно с использованием новейших геномных и генно-инженерных технологий. Современные технологии и инструменты модификации генов и редактирования генома решают эти проблемы экономически выгодным способом. Их использование в молочном животноводстве, вместе со способностью создавать гораздо более продуктивные фенотипы при соответствующем управлении, может привести к устойчивому и быстрому улучшению генома и стабильному обеспечению растущих потребностей человека в будущем. Учитывая высокую эффективность и низкую себестоимость инструментов редактирования генома, в частности CRISPR / Cas9, можно предполагать получение в скотоводстве значительного количества генетически измененных животных в ближайшем будущем. Однако, только всесторонне оценивая позитивные и негативные стороны новых технологий, возможно полностью воспользоваться их преимуществами в животноводстве.

**Ключевые слова:** крупный рогатый скот, *Bos taurus*, молочное скотоводство, геномные и генно-инженерные технологии, репродуктивные технологии

**SOME ASPECTS OF MODERN GENOMIC AND GENE-ENGINEERING TECHNOLOGIES IN DAIRY CATTLE****Bursakov S.A., Kovalchuk S.N.***Federal State Budget Scientific Institution Center of Experimental Embryology and Reproductive Biotechnologies, Moscow, e-mail: sergey@ceerb.ru*

In the coming decades, the world will face overpopulation issues, putting forward the task of intensifying food production. The possibilities of increasing the effectiveness of traditional breeding programs in the field of dairy farming are limited by the duration of the generation interval in cattle, and therefore the concept of human intervention at the genetic level is becoming relevant. In the field of dairy farming, a rapid increase in the production of milk and its products is possible using the latest genomic and genetic engineering technologies. Modern technologies and tools for gene modification and genome editing solve these problems in a cost-effective way. Their use in dairy farming, together with the ability to create much more productive phenotypes with appropriate management, can lead to sustainable and rapid improvement of the genome and the stable provision of growing human needs in the future. Considering the high efficiency and low cost of genome editing tools, in particular CRISPR / Cas9, it can be assumed that a significant number of genetically modified animals will be acquired in cattle breeding in the near future. However, only by comprehensively assessing the positive and negative aspects of new technologies is it possible to fully take advantage of them in animal husbandry.

**Keywords:** cattle, *Bos taurus*, dairy husbandry, genomic and gene-engineering technologies, reproductive technology

Молочные продукты являются одними из важных составляющих сбалансированного питания человека, источником незаменимых для организма веществ в наиболее эффективно усвояемой форме. В результате интенсивного экономического развития, сопровождаемого ростом населения и улучшением его благосостояния, а также изменениями в диетологии, происходит активный рост потребления молочной продукции. Производство молока, его стоимость и импорт постоянно растут в последние годы, особенно в Азии, Африке и Латинской Америке. По прогнозам экспертов (International Farm Comparison Network – IFCN), к 2030 г.

спрос на молоко и молочную продукцию в мире вырастет на 35%, или на 304 млн т. Прогнозируемый IFCN рост может быть обеспечен в том числе за счет России, уровень потребления молочной продукции в которой сейчас находится на достаточно низком уровне. В связи с этим очевидна важность развития молочного скотоводства как одной из приоритетных и перспективнейших отраслей экономики страны. Биологические ограничения в настоящее время пока еще не стали лимитирующими факторами ее развития, и потенциал для увеличения удоев все еще остается существенным [1]. Тем не менее быстрые и рассчитанные на перспек-

титу результаты в развитии отечественного агропромышленного комплекса могут быть достигнуты с помощью невозможных ранее вмешательств на генетическом уровне. Генетические улучшения включают изменения кодирующего генома крупного рогатого скота (КРС), а также микробиома, управление которыми, как ожидается, станет частью рутинного управления стадом [1].

Значительный вклад в улучшение генома КРС и в конечном итоге в управление процессом генетического совершенствования популяции (его продуктивности, здоровья, повышения фертильности, обеспечения продуктивного долголетия, сокращения расходов за счет уменьшения заболеваемости и снижения вероятности врожденных дефектов и других параметров), вносят развиваемые в настоящее время ускоренными темпами геномные и генно-инженерные технологии. Для достижения генетического улучшения популяции КРС необходима надежная оценка племенных и продуктивных качеств быков-производителей и маточно-поголовья, высокая степень наследования изменяемого признака и сокращение генерационного интервала, чему может способствовать использование технологий модификации генома и ускоренного воспроизводства КРС. Генно-инженерные и геномные технологии, направленные помимо повышения продуктивности молочного скота на улучшение его репродуктивной эффективности, остаются наряду с технологией трансплантации эмбрионов наиболее перспективными подходами, способными сыграть важнейшую роль в решении проблемы продовольственного снабжения населения [2, 3].

Примерами новых возможностей этих технологий могут служить уже имеющиеся результаты получения трансгенных животных, устойчивых к серьезным инфекционным заболеваниям за счет интегрирования в геном генных конструкций, связанных с усилением иммунитета, с улучшенными важнейшими хозяйственно ценными признаками, а также продуцентов биологически активных веществ [4–6]. Следует особо отметить, что практика применения геномных технологий найдет свое положительное отражение в процессе формирования высокопродуктивного поголовья КРС отечественной селекции.

Современные технологии и инструменты модификации генов и редактирования генома КРС имеют огромный экономический потенциал [7–9]. Однако крупномасштабные программы по разведению КРС достаточно сложны, поскольку для них требуется непрерывный отбор. Поэтому,

насколько это известно, пока не появилось долгосрочных программ разведения генетически модифицированных животных для производства продуктов питания [10]. Такие программы представляют интерес, даже если модифицирование генов или редактирование генома может улучшить один или несколько хозяйственно ценных признаков. Учитывая высокую эффективность и низкую себестоимость инструментов редактирования генома, в частности CRISPR/Cas9 [11], можно предполагать получение в ближайшем будущем популяций элитных молочных коров с измененными характеристиками.

В данном обзоре основное внимание сфокусировано на актуальных направлениях геномных и генно-инженерных технологий в молочном скотоводстве, направленных на улучшение на долгосрочной основе широкого спектра характеристик, для получения элитных животных с улучшенными генетическими свойствами [12–14].

Цель исследования: обзор перспективных направлений геномных и генно-инженерных технологий, которые могут быть востребованы в молочном скотоводстве в относительно краткосрочной перспективе.

#### *Генетические модификации*

Возможно выделить три уровня генетических изменений: (1) редактирование генома путем замены нескольких нуклеотидов на варианты, уже известные для данного вида; (2) использование векторов для передачи генетического материала для создания более обширных изменений внутри вида; (3) введение генетического материала другого вида.

Европейским органом по безопасности пищевых продуктов генетические модификации определяются как «генетические изменения животного, связанные с изменением его генетического материала путем добавления, изменения или удаления определенной последовательности ДНК, не встречающимся в природе способом. Оно имеет целью изменение конкретных характеристик животного или введение новой характеристики, такой как устойчивость к болезням или усиление роста» [15]. Получение трансгенного животного подразумевает введение последовательностей ДНК из другого организма с использованием генной инженерии, что ранее было невозможно осуществить методами традиционной селекции. Для генетической модификации, чтобы быть унаследованной, она должна присутствовать в гаметах и быть интегрированной в хромосому.

В случае геномного редактирования, никакая чужая ДНК не включается в геном, однако отсутствует консенсус относительно признания «генетически модифицированными» организмов с отредактированным геном [16, 17]. Подобные генетические изменения могут как иметь место, так и не случиться в естественных условиях у того же вида или породы.

#### *Генная инженерия*

Генная инженерия является инструментом для получения генетически модифицированных организмов с желательными признаками с использованием рекомбинантной ДНК [18]. Инструментами генной инженерии в животноводстве являются: пронуклеарная микроинъекция, характеризующаяся низкой эффективностью и случайной интеграцией ДНК в целевой геном [19], использование вирусных векторов [20] и пересадка ядер соматических клеток (SCNT) [21]. Несмотря на недостатки SCNT (проблема вынашивания, аномалии и низкое количество жизнеспособных потомков [22] и отсутствие истинных плюрипотентных клеток крупных домашних животных [23], использование SCNT и микроинъекции рекомбинантной ДНК в пронуклеус зиготы эмбрионов остаются основными методами создания генетически модифицированного скота [8].

Применение генной инженерии в молочном скотоводстве концентрируется в первую очередь вокруг изменения свойств молока с использованием известных генов для улучшения его состава и обеспечения здоровья вымени лактирующих коров, а также их устойчивости к заболеваниям, что благоприятно отражается в целом на жизнеспособности популяции [24].

Работа с КРС имеет дополнительные трудности из-за низкой эффективности воспроизводства и длительного периода беременности. Тем не менее, благодаря методам генной инженерии, уже были получены трансгенные линии КРС, экспрессирующие в молоке рекомбинантный человеческий лактоферрин [25]. Получены генетически модифицированные животные с измененным белковым составом молока, а именно с увеличенным содержанием бета- и альфа-казеинов [26]; с экспрессией лизоцима человека [27], со сниженным количеством бета-лактоглобулина [28]; с устойчивостью к маститу, вызываемому *Staphylococcus aureus*, за счет введения гена лизоцимина (антибактериальной глицилглицин эндопептидазы) [24]. При этом генетическую модификацию животных с целью их использования в качестве биореакторов для

производства фармакологических препаратов осуществляют чаще, нежели для получения продуктов питания. Описание других успехов, достигнутых с использованием технологий генной инженерии КРС, можно найти в ряде обзоров [7, 29]. Использование генной инженерии в молочной промышленности может привести ко многим улучшениям, ранее невозможным при традиционных методах селекции.

Улучшение здоровья, устойчивость к инфекционным заболеваниям и увеличение продуктивности КРС, ограничение использования антибиотиков и уменьшение воздействия животноводства на окружающую среду являются одними из важнейших целей и перспектив использования генно-инженерных технологий в молочном скотоводстве [7].

Существующий в ряде стран запрет на использование генетически модифицированных животных и произведенных ими продуктов в связи с их воздействием на окружающую среду, проблема безопасности пищевых продуктов, неизвестность последствий предполагаемых изменений генома, этическими проблемами и общей готовностью общества остаются до сегодняшнего дня серьезными препятствиями, ограничивающими применение этой технологии в животноводстве.

#### *Редактирование генома*

Технология геномного редактирования представляет собой изменение генома организмов посредством адресного манипулирования нуклеотидными последовательностями генов для достижения целенаправленной модификации эндогенных генов или интеграции экзогенных генов, приводя к изменению их функционального статуса. Новая технология редактирования генома позволяет не только редактировать или «исправлять» нежелательные мутации, но также создавать новые аллельные варианты в геноме [30]. Она позволяет генерировать практически все типы мутаций, в результате которых животные могут получить новые характеристики, отсутствующие в естественных популяциях, а также значительно улучшить имеющиеся. Геномное редактирование отличается от генной инженерии тем, что не связано с использованием рекомбинантной ДНК и способствует использованию новым способом существующих вариаций внутри вида. Существующие параллели между традиционными методами отбора и геномным редактированием выражаются в увеличении частоты благоприятных аллелей у видов. Преимущества редактирования генов при этом проявляются в способности быстро и без ошибок

передавать соответствующие аллельные варианты генов, не полагаясь на случайную передачу благоприятных комбинаций аллелей.

Включение, удаление или перемещение фрагментов ДНК в геноме организма происходит с использованием специфически спроектированных, высокоэффективных эндонуклеаз, или «молекулярных ножниц». В настоящее время инструменты для редактирования генома включают ZFN (zinc finger nuclease – цинк-пальцевые нуклеазы), TALEN (Transcription activator-like effector nucleases – эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции) и CRISPR/Cas9 (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats – сгруппированные короткие промежуточные палиндромные повторы, разделенные промежутками и ассоциированные с нуклеазой Cas9) [31–33], которые успешно применяются для изменения геномов растений и животных. TALE – это белки протеобактерии рода *Xanthomonas* используемые для подавления транскрипционной активности в клетках растений-хозяев, состоящий из множества ДНК-связывающих компонентов, способных к взаимодействию лишь с одним основанием ДНК в соотношении 1:1. Это свойство было использовано для создания комплексов, способных связывать практически любую последовательность в геноме. Аналогично ZFN, комплекс TALE сливается с нуклеазой FokI для получения TALEN, тем самым обеспечивая димеризацию FokI для целенаправленного разрезания ДНК. TALEN более широко используются в исследованиях в животноводстве, чем ZFN, в основном из-за их относительной простоты проектирования и синтеза [34, 35]. Cas9 позволяет расщеплять практически любую нуклеотидную последовательность, комплементарную направляющей РНК, но в отличие от TALEN и ZFN, ее избирательность является следствием комплементарности направляющей РНК и ДНК, а не модификации самого белка. Поэтому для новых ДНК-мишеней возможна выработка специфических Cas9 [36].

Все эти современные инструменты редактирования геномов позволяют осуществлять сайт-специфичные разрывы двухцепочечной ДНК генома в нужном месте, после чего система репарации ДНК восстанавливает эти двухцепочечные разрывы путем негомологичного соединения концов (NHEJ – Non-homologous end joining) или гомологичной рекомбинации (HDR – homology directed repair), что позволяет получать направленные мутации [37]. NHEJ – это путь восстановления ДНК в клетках, который соединяет разорванные

концы непосредственно без участия гомологичной матрицы. Во время процесса восстановления путем NHEJ происходит удаление или вставка нуклеотидов, что приводит вследствие этого к ошибкам, связанным со сдвигом рамки считывания. Таким образом, с помощью NHEJ с вовлечением нуклеазы может быть получен нокаут целевого гена [38]. В противоположность NHEJ, HDR происходит в клетках с более низкой частотой, но восстановление осуществляется через гомологичную рекомбинацию между донорской матрицей ДНК и целевым геномным локусом, в результате чего происходит вставка донорской ДНК. Следовательно, HDR с использованием нуклеазы применяется для получения направленного нокаута или замены аллеля [39].

На сегодняшний день почти любая лаборатория может проводить эксперименты по редактированию генома, охватывая любые виды, представляющие интерес. Для улучшения хозяйственно ценных признаков сельскохозяйственных животных с помощью генетических манипуляций необходимо точное редактирование генома в нескольких локусах, поскольку важные в производственном отношении свойства часто контролируются несколькими генами [37]. Различные сайты мутаций или типы мутаций в одном и том же гене могут также сильно влиять на важные признаки, имеющие значение, например, для воспроизводства [37]. Следовательно, значительное улучшение продуктивных признаков скота требует точного редактирования во множестве мест генома. Разработка жизнеспособной линии скота на основе множественных изменений генома не является тривиальной задачей, поскольку необходимо производить множество редактирований для сохранения генетических вариаций и избежать чрезмерного уровня инбридинга [30]. Способность осуществлять несколько изменений генома одновременно сделает технику более полезной для улучшения количественных признаков и ожидается, что это станет реальностью в короткой перспективе [30]. Достижения в понимании влияния различных генов и геномных вариантов на фенотипы и повышение эффективности мультиплексного редактирования генома будет способствовать открытию новых возможностей для улучшения количественных характеристик в молочном животноводстве, а также повышению эффективности разведения животных и выведению животноводства на новый уровень.

Примерами могут служить успешное получение нокаута гена  $\beta$ -лактоглобулина у КРС – основного белка и одного из важ-

нейших аллергенов в сыворотке коровьего молока – с использованием технологии ZFN [40]; введение гена лизоцима человека (Hlyz) в локус генома КРС, кодирующего б-казеин с применением ZFNs, в результате чего молочная железа трансгенного животного может секретировать лизоцим человека, убивающий в молоке *S. aureus*, тем самым защищая его от самого распространенного заболевания молочного скота – мастита [41]; получение трансгенных животных, менее восприимчивых к туберкулезу с помощью технологии TALEN путем введения гена SP110 в геном КРС [42]; совместная ZFN и TALEN модификация эмбрионов КРС, приводящая к введению мутаций, приводящих к разрушению локуса б-лактоглобулина у видов домашнего скота [43]; получение КРС с успешным нокаутом гена миостатина MSTN, сдерживающего рост мышц для предотвращения их дистрофии, с использованием TALEN [34]; применение метода редактирования генома TALEN для введения аллеля POLLED, связанного с отсутствием рогов у молочного голштинского КРС, что привело к получению комолых животных [44].

Технология редактирования генома позволяет быстро изменять ключевые гены, влияющие на целевые признаки, и получать требуемые генотипы через одно поколение, тем самым значительно ускоряя селекционный процесс [7].

С продолжающимся снижением стоимости секвенирования генома [45], возможно ожидать получения новой информации о генетических вариациях, влияющих на производственно-важные признаки КРС. Например, потенциал идентификации генетической изменчивости, контролирующей лактацию, может быть проиллюстрирован сравнением генетических отличий, контролирующих значительные различия в выработке молока у крупного рогатого скота *Bos taurus* и *Bos indicus*. Соответственно, редактирование генома может позволить интродуцировать благоприятные аллели, что может иметь большие преимущества в отношении производства молока *Bos indicus* в тропических регионах мира [46].

Недостатком всех современных инструментов редактирования генома (ZFN, TALEN и CRISPR / Cas9) является вероятность мутаций в нецелевом участке генома [37]. Хотя эти мутации могут и не оказывать влияния на здоровье отдельных животных, они несут потенциальный риск и могут сдерживать широкое использование технологии редактирования генома. В большинстве случаев нецелевые мутации будут либо отбракованы в будущем, если они па-

губны или, скорее всего, исчезнут, если они нейтральны. Тем не менее в процессе изменения геномов следует учитывать нецелевое редактирование [37].

Инструменты редактирования генома могут эффективно дополнять существующие методы отбора в молочном скотоводстве. Наиболее востребованный вариант их использования – это приобретение контролируемых свойств за счет изменения единичных генов или локусов, оказывающих большое влияние на фенотип. С помощью информации о ключевых локусах SNP, полученных из молекулярного скрининга, возможно выполнять точные одиночные модификации в геномах животных, используя технологию редактирования генома и непосредственно редактировать эти локусы, чтобы получить генотип с желаемыми качествами [47]. Применение генетического модифицирования или редактирования генома, возможно, будет более простым в случае моногенных аллелей с известными последовательностями. В частности, было предложено использовать редактирование генома для фиксации благоприятных аллелей для признаков, связанных, например, с устойчивостью к болезням [48]. Одним из наиболее очевидных потенциальных применений редактирования генома у сельскохозяйственных животных может быть удаление известных вредных рецессивных аллелей, которые ухудшают рождаемость или здоровье, и в этом смысле восстановить геном после аккумуляции мутаций при разведении животных [49].

Метод редактирования генома позволяет вводить мутации, не оставляя следов, связанных с технологией, что, следовательно, приводит к модификациям генома, которые не поддаются выявлению, поскольку являются неотличимыми от естественных мутаций. Таким образом, используя генетические варианты одного и того же вида, возможно надеяться на принятие этой технологии и уменьшение препятствий к ее внедрению [7, 47].

*Потенциальные риски и факторы, ограничивающие использование технологии геномного редактирования*

Несмотря на то, что использование технологий редактирования генома может решить многие проблемы молочного скотоводства, необходимо с осторожностью относиться к их применению в связи с их масштабностью и долгосрочностью влияния. В отличие от трансгенных животных, обычно содержащих привнесенные последовательности в геном хозяина, в отредактированном геноме животных изме-

нения, проведенные с высокой точностью и эффективностью, часто свободны даже от следов воздействия используемой технологии [7]. Это требует разработки нормативной политики и стандартов, а также существенных технологий и ресурсов для обеспечения надлежащей регистрации и создания системы отслеживания, воспроизведения и использования этих животных и их продуктов [47, 50]. Даже в случае урегулирования технических и юридических препятствий остаются практические и этические вопросы, касающиеся введения и тиражирования модифицированных или отредактированных генетических вариантов в популяции, самыми важными среди которых остаются вопросы последствий генетических изменений. В связи с этим приобретают особое значение меры предосторожности, включающие в себя как определение и оценку рисков, так и управление ими [10]. Соображения безопасности и сложность этических проблем, связанных с использованием технологий геномного редактирования, следует принимать во внимание задолго до того, как генетически модифицированные животные и продукты, полученные от них, могут выйти на рынок, как, например, при производстве пищевых продуктов или фармацевтических препаратов [50]. Поэтому коммерциализация генетически модифицированных продуктов животного происхождения остается сложным вопросом, касающимся задействованных видов, важности конечного продукта, типа используемой технологии, отсутствия или наличия альтернативных способов достижения цели, вовлеченности этических вопросов и необходимости общественного признания.

Учитывать возможные этические проблемы необходимо и в случае генетических модификаций КРС, направленных на улучшение здоровья вымени коров или качества молока, а также использования коров в качестве биореакторов. Важность привлечения этических вопросов хорошо прослеживается в отношении противодействия повышенной скорости инбридинга, приводящего к ухудшению видовых характеристик или снижению приспособляемости к новым условиям. При этом следует особо выделить огромную разницу между использованием редактирования генома в отдельном лабораторном эксперименте и широким применением в крупномасштабных программах селекции животных [10].

### Заключение

Генетические модификации и геномное редактирование рассматривается сейчас

в качестве быстрого решения проблем в области селекции животных и их генетики. Появление в нужное время этих технологий может значительно сократить время воспроизводства, снизить его стоимость и быстро увеличить генетическое разнообразие, при значительном повышении его качества. Редактированием генов уже были продемонстрированы значительные улучшения в отношении, например, устойчивости к болезням и изменения других благоприятных характеристик. Кроме того, управление и содержание генетически модифицированного скота может иметь преимущества, связанные с его изменением.

Несмотря на гигантский потенциал гено-инженерных и геномных технологий для развития животноводства будущего, необходимо принимать в расчет, что на сегодняшний день отсутствует полное понимание ожидаемых комплексных изменений в ответ на генетические манипуляции. Поэтому к ним необходимо подходить с осторожностью, ввиду сложностей, связанных с крупномасштабностью и интегрированием в селекционные схемы, рисками принятия обществом и проблемами этического характера. В какой-то момент население планеты не сможет позволить себе роскошь не использовать такие новые технологии и ресурсы, так как риск их не использовать может быть большим [49].

Таким образом, использование этих новых технологий, вместе со способностью создавать гораздо более продуктивные фенотипы при надлежащем управлении, может привести к устойчивому и быстрому улучшению генома и стабильному обеспечению растущих потребностей человека в будущем.

*Автор выражает признательность А.В. Бабий за предложения по оформлению работы и коррекцию текста.*

### Список литературы

1. Britt J.H., Cushman R.A., Dechow C.D., Dobson H., Humblot P., Hutjens M.F., Jones G.A., Ruegg P.S., Sheldon I.M., Stevenson J.S. Invited review: Learning from the future-A vision for dairy farms and cows in 2067. *Journal Dairy Science*. 2018. vol. 101. no. 5. P. 3722–3741. DOI: 10.3168/jds.2017-14025.
2. Veerkamp R., Beerd B. Genetics and genomics to improve fertility in high producing dairy cows. *Theriogenology*. 2007. vol. 68. suppl. 1. P. S.266–S273. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.034.
3. Murphy B. Research in animal reproduction: quo vadimus? *Animal Reproduction*. 2012. vol. 9. no. 3. P. 217–222.
4. Thompson-Crispi K.A., Sewalem A., Miglior F., Mallard B.A. Genetic parameters of adaptive immune response traits in Canadian Holsteins. *Journal Dairy Science*. 2012. vol. 95. no. 1. P. 401–409. DOI: 10.3168/jds.2011-4452.
5. Long C. Transgenic livestock for agriculture and biomedical applications. *BMC Proceedings*. 2014. vol. 8. suppl. 4. O29. DOI: 10.1186/1753-6561-8-S4-O29.

6. Maksimenko O.G., Deykin A.V., Khodarovich Yu.M. and Georgiev P.G. Use of cransgenic animals in biotechnology: prospects and problems. *Acta Naturae*. 2013. vol. 5. no. 1. P. 33–46.
7. Laible G., Wei J., Wagner S. Improving livestock for agriculture–technological progress form random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnology Journal*. 2015. vol. 10. no. 1. P. 109–120. DOI: 10.1002/biot.201400193.
8. Tan W., Proudfoot C., Lillico S.G., Whitelaw C.B. Gene targeting, genome editing: from Dolly to editors. *Transgenic Research*. 2016. vol. 25. no. 3. P. 273–287.
9. Fleming A., Abdalla E.A., Maltecca C., and Baes C.F. Invited review: reproductive and genomic technologies to optimize breeding strategies for genetic progress in dairy cattle. *Archive Animal Breeding*. 2018. vol. 61. no. 1. P. 43–57. DOI: 10.5194/aab-61-43-2018.
10. Eriksson S., Jonas E., Rydhmer L., Röcklinsberg H. Invited review: breeding and ethical perspectives on genetically modified and genome edited cattle. *Journal of Dairy Science*. 2018. vol. 101. no. 1. P. 1–17. DOI: 10.3168/jds.2017-12962.
11. Shrock E., Güell M. CRISPR in Animals and animal models. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. 2017. vol. 152. P. 95–114. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.07.010.
12. Юдин Н.С., Васильева Л.А., Белявская В.А., Айт-назаров Р.Б., Смирнов П.Н., Хитон М., Легрейд У., Орлова Г.В., Ромашенко А.Г., Воевода М.И. Создание панели ДНК пород крупного рогатого скота России для геномных исследований // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2014. Т. 18. № 3. С. 463–468.
13. Юдин Н.С., Воевода М.И. Молекулярно генетические маркеры экономически важных признаков у молочного скота // *Генетика*. 2015. Т. 51. № 5. С. 600–612.
14. Jonas E., de Koning D.-J. Genomic selection needs to be carefully assessed to meet specific requirements in livestock breeding programs. *Frontiers in Genetics*. 2015. vol. 6. no. 49. P. 1–8. DOI: 10.3389/fgene.2015.00049.
15. EFSA (European Food Safety Authority). Genetically modified animals. 2017. [Electronic resource]. URL: <http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/genetically-modified-animals> (date of access: 08.08.2019).
16. Bruce D.M. Genome editing: moving the goalposts on the GM playing field? in *Food Futures: Ethics, Science and Culture*. I. A. S. Olsson, S. M. Araujo, and M. F. Vieira, ed. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, the Netherlands Conference Proceedings. 2016. P. 518–522. DOI: 10.3920/978-90-8686-834-6\_79.
17. Nuffield Council on Bioethics. Genome editing: An ethical review. in *Exploring Ethical Issues in Biology and Medicine*. J. Montgomery, ed. Nuffield Council on Bioethics, London, UK. 2016. P. 1–128. [Electronic resource]. URL: <http://nuffieldbioethics.org/wp-content/uploads/Genome-editing-an-ethical-review.pdf> (date of access: 08.08.2019).
18. Van Eenennaam A.L. Genetic modification of food animals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2017. vol. 44. P. 27–34. DOI: 10.1016/j.copbio.2016.10.007.
19. Hammer R.E., Pursel V.G., Rexroad C.E., Wall R.J., Bolt D.J., Ebert K.M., and Brinster R.L. Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*. 1985. vol. 315. no. 6021. P. 680–683.
20. Chan A.W., Homan E.J., Ballou L.U., Burns J.C., and Bremel, R.D. Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 1998. vol. 95. no. 24. P. 14028–14033.
21. Wilmut I., Schnieke A.E., McWhir J., Kind A.J., Campbell, K.H.S. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997. vol. 385. no. 6619. P. 810–813.
22. Keefer C.L. Artificial cloning of domestic animals. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2015. vol. 112. no. 29. P. 8874–8878.
23. Petersen B., and Niemann H. Molecular scissors and their application in genetically modified farm animals. *Transgenic Research*. 2015. vol. 24. no. 3. P. 381–396. DOI: 10.1007/s11248-015-9862-z.
24. Wall R.J., Powell A.M., Paape M.J., Kerr D.E., Bannerman D.D., Pursel V.G., Wells K.D., Talbot N., and Hawk H.W. Genetically enhanced cows resist intramammary *Staphylococcus aureus* infection. *National Biotechnology* 2005. vol. 23. no. 4. P. 445–451.
25. van Berkel P.H., Welling M.M., Geerts M., van Veen H.A., Ravensbergen B., Salaheddine M., Pauwels E.K., Pieper F., Nuijens J.H., Nibbering P.H. Large scale production of recombinant human lactoferrin in the milk of transgenic cows. *National Biotechnology*. 2002. vol. 20. no. 5. P. 484–487.
26. Brophy B., Smolenski G., Wheeler T., Wells D., L’Huillier P., and Laible G. Cloned transgenic cattle produce milk with higher levels of beta-casein and kappa-casein. *National Biotechnology*. 2003. vol. 21. no. 2. P. 157–162.
27. Yang B., Wang J., Tang B., Liu Y., Guo C., Yang P., Yu T., Li R., Zhao J., Zhang L., Dai Y., and Li N. Characterization of bioactive recombinant human lysozyme expressed in milk of cloned transgenic cattle. *Plos One*. 2011 vol. 6. no. 3. e17593. DOI: 10.1371/journal.pone.0017593.
28. Javed A., Wagner S., McCracken J., Wells D.N., and Laible G. Targeted microRNA expression in dairy cattle directs production of beta-lactoglobulin-free, high-casein milk. *Proceedings of the National Academy of Science USA*. 2012. vol. 109. no. 42. P. 16811–16816.
29. Lievens A., Petrillo M., Querci M., and Patak A. Genetically modified animals: options and issues for traceability and enforcement. *Trends Food Science Technology*. 2015. vol. 44. no. 2. P. 159–176.
30. Jenko J., Gorjanc G., Cleveland M.A., Varshney R.K., Whitelaw C.B. A., Woolliams J.A., and Hickey J.M. Potential of promotion of alleles by genome editing to improve quantitative traits in livestock breeding programs. *Genetics Selection Evolution*. 2015. vol. 47. P. 55–69.
31. Doyon Y., McCammon J.M., Miller J.C., Faraji F., Ngo C., Katibah G.E., Amora R., Hocking T.D., Zhang L., Rebar E.J., Gregory P.D., Urnov F.D., Amacher S.L. Heritable targeted gene disruption in zebrafish using designed zinc-finger nucleases. *National Biotechnology*. 2008. vol. 26. no. 6. P. 702–708. DOI: 10.1038/nbt1409.
32. 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*. 2010. vol. 186. no. 2. P. 757–761. DOI: 10.1534/genetics.110.120717.
33. Ran F.A., Hsu P.D., Lin C.Y., Gootenberg J.S., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013. vol. 154. no. 6. P. 1380–1389.
34. Proudfoot C., Carlson D.F., Huddart R., Long C.R., Pryor J.H., King T.J., Lillico S.G., Mileham A.J., McLaren D.G., Whitelaw C.B., Fahrenkrug S.C. Genome edited sheep and cattle. *Transgenic Research*. 2015. vol. 24. no. 1. P. 147–153.
35. Wu H, Wang Y, Zhang Y, Yang M, Lv J, Liu J, Zhang Y. TALE nickase-mediated SP110 knock in endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*. 2015. 112(13) P. E1530-E1539.
36. Mali P., Esvelt K.M., Church G.M. Cas9 as a versatile tool for engineering biology. *Nature Methods*. 2013. vol. 10. P. 957–963. DOI: 10.1038/nmeth.2649.
37. Смирнов А.В., Юнусова А.М., Лукьянчикова В.А., Баттулин Н.Р. Система CRISPR/Cas9 – универсальный инструмент геномной инженерии // *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2016. Т. 20. № 4. С. 493–510. DOI: 10.18699/VJ16.175.
38. Zhu L., Mon H., Xu J., Lee J.M., and Kusakabe T. CRISPR / Cas9-mediated knockout of factors in non-homologous end joining pathway enhances gene targeting in silkworm

cells. *Scientific Reports*. 2015. vol. 5. no. 18103. P. 1–13. DOI: 10.1038/srep18103.

39. Masroori N., Cherry P., Merindol N., Li J., Dufour C., Poulain L., Plourde M.B., Berthou L. 2017. Gene knockout shows that PML (TRIM19) does not restrict the early stages of HIV-1 infection in human cell lines. *mSphere*. 2017. vol. 2. no. 3. e00233-17. DOI: 10.1128/mSphereDirect.00233-17.

40. Yu S., Luo J., Song Z., Ding F., Dai Y., and Li N. Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zincfinger nucleases in cattle. *Cell Research*. 2011. vol. 21. no. 11. P. 1638–1640.

41. Liu X., Wang Y., Tian Y., Yu Y., Gao M., Hu G., Su F., Pan S., Luo Y., Guo Z., Quan F., and Zhang Y. Generation of mastitis resistance in cows by targeting human lysozyme gene to betacasein locus using zinc-finger nucleases. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 2014. vol. 281. no. 1780:20133368. P. 1–10. DOI: 10.1098/rspb.2013.3368.

42. Wu H., Wang Y., Zhang Y., Yang M., Lv J., Liu J., and Zhang Y. TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 2015. vol. 112. no. 13. P. E1530–E1539.

43. Wei J., Wagner S., Lu D., Maclean P., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C., and Laible G. Efficient introgression of allelic variants by embryo-mediated editing of the bovine genome. *Science Report*. 2015. vol. 5. no. 11735. DOI: 10.1038/srep11735.

44. Carlson D.F., Lancto C.A. Production of hornless dairy cattle from genome-edited cell lines. *National Biotechnology*. 2016. vol. 34. no. 5. P. 479–482.

45. Desai N., Antonopoulos D., Gilbert J.A., Glass E.M., Meyer F. From genomics to metagenomics. *Current Opinions in Biotechnology*. 2012. Vol. 23. no. 1. P. 72–76.

46. Whitelaw C.B., Joshi A., Kumar S., Lillico S.G., Proudfoot C. Genetically engineering milk. *Journal Dairy Research*. 2016. vol. 83. no. 1. P. 3–11. DOI: 10.1017/S0022029916000017.

47. Ruan J., Xu J., Chen-Tsai R. Y., and Li K. Genome editing in livestock: are we ready for a revolution in animal breeding industry. *Transgenic Research*. 2017. vol. 26. no. 6. P. 715–726. DOI: 10.1007/s11248-017-0049-7.

48. Hickey J. M., Bruce C., Whitelaw A., and Gorjanc G. Promotion of alleles by genome editing in livestock breeding programmes. *Journal of Animal Breeding and Genetics*. 2016. vol. 133. no. 2. P. 83–84. DOI: 10.1111/jbg.12206.

49. Simianer H. Genomic and other revolutions – why some technologies are quickly adopted and others are not. *Animal Front*. 2016. vol. 6. no. 1. P. 53–58. DOI: 10.2527/af.2016-0008.

50. Frewer L.J., Kleter G.A., Brennan M., Coles D., Fischer A.R., Houdebine L.M., Mora C., Millar K., and Salter B. Genetically modified animals from life-science, socio-economic and ethical perspectives: Examining issues in an EU policy context. *New Biotechnology*. 2013. 30. no. 5. P. 447–460. DOI: 10.1016/j.nbt.2013.03.010.