

© Н. А. Зиновьева¹,
Н. А. Волкова¹, В. А. Багиров¹,
Г. Брем²

¹ВИЖ им. Л.К. Эрнста, Москов-
ская обл., Россия

²Институт животноводства и гене-
тики, ветеринарно-медицинский
университет, Вена, Австрия

Создание трансгенных сельско-
хозяйственных животных пред-
ставляет огромный интерес для
решения ряда фундаментальных
и прикладных задач современной
науки. В статье рассматривают-
ся методы создания трансгенных
сельскохозяйственных животных,
дискутируются их преимущества и
недостатки. Описаны современные
достижения в различных направ-
лениях генетической инженерии
домашних животных: создании
животных с измененным обменом
веществ для повышения качества
и эффективности производства
продукции, генетически устойчивых
к инфекционным заболеваниям,
являющихся продуцентами био-
логически активных рекомбинан-
тных белков, доноров внутренних
органов для пересадки человеку
(ксенотрансплантация) и живот-
ных-моделей.

✿ **Ключевые слова:**

рекомбинантная ДНК; трансгенез;
генетически модифицированные
сельскохозяйственные животные;
животные-биореакторы.

ТРАНСГЕННЫЕ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫЕ ЖИВОТНЫЕ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПЕРСПЕКТИВЫ

В этом году исполняется 30 лет с момента получения первых трансгенных (генетически модифицированных, ГМ) сельскохозяйственных животных, о создании которых независимо друг от друга сообщили две лаборатории в США и Германии (Brem et al., 1985; Hammer et al., 1985). За этот период были достигнуты значительные успехи, как в области совершенствования методов геномной инженерии животных, так и в расширении спектра направлений генетической модификации. ГМ-технологии применительно к объектам сельскохозяйственного назначения не потеряли своей актуальности и рассматриваются в качестве одного из приоритетных направлений развития научно-технологического комплекса, как в России, так и в мире.

По сравнению с лабораторными животными проведение геномной инженерии практически для всех видов сельскохозяйственных животных связано с повышенными трудностями, обусловленными физиологическими особенностями объектов генетической модификации, а также относительно высокими материальными затратами. В этой связи, ведется постоянный поиск новых и совершенствование существующих методов трансгенеза, как в направлении повышения их технической доступности, так и эффективности.

Если цели генетической модификации лабораторных животных ориентированы, главным образом, на решение фундаментальных задач, то в определении направлений трансгенеза сельскохозяйственных животных значительную роль играют возможности потенциального развития существующих или создания новых сегментов рынка. Лимитирующим фактором в широком распространении ГМ-технологий применительно к домашним животным зачастую выступают высокие материальные затраты на их создание.

1. МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ ТРАНСГЕННЫХ ЖИВОТНЫХ

Для получения трансгенных сельскохозяйственных животных находит применение целый ряд методов (рис. 1).

Остановимся более подробно на наиболее значимых из них.

1.1. Метод микроинъекции, первоначально разработанный для получения трансгенных мышей (Gordon et al., 1980; Palmiter et al., 1982), стал первым приемом, успешно примененным для создания трансгенных сельскохозяйственных животных (Brem et al., 1985; Hammer et al., 1985). Суть метода заключается во введении раствора генных конструкций в форме линейных молекул ДНК в мужской пронуклеус зигот (обзор Серов, 2013). Обычно инъецируют 1–2 пкл раствора ДНК в концентрации, соответствующей 1000 копий/пкл. По завершении микроинъекции эмбрионы культивируют несколько часов и пересаживают в яйцевод синхронизированных реципиентов. Несмотря на достигнутые в области трансгенеза успехи, эффективность (число полученных трансгенных животных от числа пересаженных эмбрионов) классического метода микроинъекции остается очень низкой и варьирует от 0,5 % у крупного рогатого скота до 1,0–2,0 % у кроликов. У свиней, овец и коз результативность метода микроинъекции составляет 0,5–1,0 %.

Метод микроинъекции в пронуклеус оставался доминирующим в создании трансгенных сельскохозяйственных животных до середины 90-х годов XX века и был практически полностью вытеснен методом пересадки ядер соматичес-

Поступила в редакцию 16.04.2015
Принята к публикации 19.05.2015



Рис. 1. Основные методы создания трансгенных сельскохозяйственных животных

ких клеток, генетически трансформированных *in vitro*. В последние годы, благодаря достижениям в развитии сайт-специфических эндонуклеаз метод микроинъекции в зиготы с некоторыми модификациями получает свое новое развитие (раздел 1.5).

1.2. Пересадка ядер соматических клеток (SCNT), генетически трансформированных *in vitro*, является сегодня наиболее часто используемым способом получения трансгенных сельскохозяйственных животных. Достижения в SCNT у животных разных видов обобщены в обзоре Сингиной Г.Н. с соавторами (2014). Возможность получения жизнеспособного потомства посредством SCNT, культивируемых *in vitro*, впервые была продемонстрирована на овцах с использованием в качестве доноров ядер клеток молочной железы (Campbell et al., 1997). Несколько позже та же группа сообщила о получении трансгенных овец посредством пересадки ядер стабильно трансформированных первичных фетальных (эмбриональных) фибробластов (Schnieke et al., 1997). Эффективность трансгенеза составляла 100 %, в то время как применение метода микроинъекции в той же лаборатории позволяло получать лишь 4,35 % трансгенных потомков от числа родившихся животных. Для получения одного трансгенного ягненка посредством SCNT в среднем требовалось 20,8 овец, в то время как при использовании метода микроинъекции — 51,4 овцы. Генетически трансформированные фетальные фибробласты и сегодня остаются наиболее часто используемым типом клеток для получения трансгенных сельскохозяйственных животных. Преимуществом метода является возможность тестирования интеграции, а в ряде случаев и экспрессии трансгена в культуре клеток. Это означает, что все эмбрионы, полученные после пересадки ядер, будут трансгенными. Используемые клеточные линии могут быть кариотипированы в культуре, что позволяет зара-

нее предопределять пол трансгенных животных. Другим преимуществом метода SCNT является возможность целенаправленного воздействия на геном посредством генного таргетинга (Савченкова с соавт., 1996).

1.3. Ретровирусные и лентивирусные вектора являются еще одним эффективным инструментом для введения генов в эмбриональные линии животных: они способны стабильно интегрироваться в геном клеток хозяев; относительно небольшие размеры генома вирусов позволяют легко с ними манипулировать *in vitro*; внутренние последовательности генома могут быть удалены таким образом, что все функции, необходимые для репликации, будут предоставлены *in trans*; используя поверхностные гликопротеины вируса, тропные к широкому спектру хозяев, можно инфицировать гибридными вирионами практически любой вид и тип клеток позвоночных (Эрнст с соавт., 2007). Принципиальные отличия между двумя вышеназванными типами векторов заключаются в том, что ретровирусные векторы могут интегрироваться только в активно делящиеся клетки, в то время как лентивирусы способны реплицироваться, как в делящихся, так и в неделящихся клетках.

Преимуществом использования ретровирусных векторов является возможность достижения 100 % эффективности трансгенеза (Chan et al., 1998), недостатком — их ограниченная емкость (размер вставки не должен превышать 8 тысяч п.н.). Кроме того, в результате сплайсинга из ретровирусов вырезаются интронные последовательности, которые, как и другие дистальные или проксимальные элементы играют важную роль в эффективной экспрессии генов (Palmiter et al., 1991).

К недостаткам ретровирусных и лентивирусных векторов следует также отнести возможное подавление экспрессии трансгенов *in vivo* вследствие инактивации

вирусных промоторов в клетках. В качестве главного механизма, лежащего в основе сайленсинга рассматриваются *de novo* метилирование вирусных промоторных последовательностей и хозяйской ДНК, фланкирующей сайт интеграции вируса (Jahner, Jaenisch, 1985). Кроме того, подавление экспрессии трансгенов может достигаться посредством α - и γ -интерферонов, действующих на вирусные LTR (Ghazizadeh et al., 1999). Хотя лентивирусные векторы, по всей видимости, менее чувствительны генному сайленсингу, ДНК-метилирование также играет важную роль в подавлении экспрессии лентивирусных трансгенов у сельскохозяйственных животных (Hofmann et al., 2006). В качестве потенциального недостатка использования лентивирусных векторов следует рассматривать множественную интеграцию (Ritchie et al., 2009), в результате которой возрастает вероятность побочных эффектов, обусловленных активацией онкогенов или инсерционным мутагенезом.

Успехи в получении трансгенного крупного рогатого скота (Chan et al., 1998; Haskell, Bowen, 1995) показали, что ретровирусные векторы могут служить хорошей альтернативой для эффективного трансгенеза у сельскохозяйственных животных. Хотя лентивирусные векторы были эффективно использованы для получения трансгенных свиней (Hofmann et al., 2003; Whitelaw et al., 2004), коров (Hofmann et al., 2003) и кур (McGrew et al., 2004), их широкое применение на сельскохозяйственных животных рассматривается, главным образом, в области генотерапии.

1.4. Использование спермиев в качестве переносчиков ДНК (обусловленный спермиями перенос генов, SMGT) рассматривается как один из перспективных подходов генетической модификации животных (Gandolfi, 1998). Уже в 1971 году была показана возможность переноса ДНК SV40 в яйцеклетки кроликов после искусственного осеменения спермой, предварительно инкубируемой с ДНК (Brackett et al., 1971). Perry и др. (1999, 2001) предложили способ, основанный на интрацитоплазматической инъекции (ICSI) головок сперматозоидов, несущих чужеродную ДНК, в ооциты мышей, однако на сельскохозяйственных животных данная технология не получила дальнейшего развития. Chang и др. (2002) сообщили об успешном получении потомства трансгенных свиней с результативностью 37,5 % посредством SMGT, используя в качестве линкерного белка моноклональные антитела, обладающие реактивностью к антигену спермиев многих видов животных (LB-SMGT). Следует отметить, в большинстве случаев использование сперматозоидов в качестве векторов характеризуется относительно низкой эффективностью и/или нестабильностью получаемых результатов (Maione et al., 1998). Механизм интеграции экзогенной ДНК в геном сперматозоидов до настоящего времени не установлен.

Большое внимание привлекают манипуляции со стволовыми клетками семенников — сперматогониями

(Brinster, Nagano, 1998). Их успешное длительное культивирование *in vitro* делает возможным проведение трансформации экзогенной ДНК с последующей селекцией. Однако несмотря на хорошие результаты в использовании мужских половых клеток для получения трансгенных мышей, а также отдельные успешные попытки получения трансгенных свиней и крупного рогатого скота (Gandolfi et al., 1989; Schelander et al., 1995; Sperandio et al., 1996; Chang et al., 2002), каких-либо значительных успехов в получении трансгенных сельскохозяйственных животных с помощью трансформированных сперматогониев и спермиев до настоящего времени достигнуто не было.

1.5. Прогресс в области геномной инженерии сельскохозяйственных животных в настоящее время связывают с развитием технологий так называемого *активного трансгенеза*, которые посредством экзогенных ферментов или кодирующих их ДНК обеспечивают возможность направленной (сайт-специфической) интеграции с целью привнесения новых функций (*gain-of-function*) или, наоборот, утери функций (*loss-of-function*) (Bosch et al., 2015). В качестве инструментов в технологиях активного трансгенеза находят применение системы *ДНК-транспозонов* и *сайт-специфических эндонуклеаз*.

ДНК-транспозоны или транспозоны второго типа — это мобильные генетические элементы, которые перемещаются по геному хозяина, используя механизм «вырезать — вставить». Они включают последовательность белка транспозазы, которая фланкирована инвертированными терминальными повторами (ITRs), несущими сайты связывания транспозазы. Любые последовательности ДНК, фланкированные ITRs, будут узнаваться транспозазой и энзиматически интегрироваться в ядерную ДНК. Транспозазы нашли широкое применение для трансгенеза и инсерционного мутагенеза беспозвоночных. Первым транспозоном, обладающим достаточной активностью для использования на позвоночных, был разработанный в Университете Миннесота в 1997 году транспозон «Спящая красавица», получивший свое название из-за флуоресценции, которую обеспечивает ген, включенный в транспозон дополнительно к целевому гену (Ivics et al., 1997). В последующие годы были найдены еще ряд транспозонов, функционирующих у высших эукариот, включая *piggyBac*, *FrogPrince*, *Tol2* и *Passport* (обзор Clark et al., 2007). Основным преимуществом использования транспозонов для трансгенеза является их интеграция в области эухроматина, что предотвращает сайленсинг трансгенов, наблюдаемый при случайной интеграции в области гетерохроматина. Кроме того, использование транспозонов характеризуется высокой эффективностью и однокопийностью интеграции. Результативное получение трансгенных свиней с использованием транспозонов (Kues et al., 2010; Garrels et al., 2010) было достигнуто как при использовании метода микроинъекции (Iqbal et al., 2009), так и метода SCNT (Jakobsen et al., 2010). Однако если поро-

сята, полученные методом микроинъекции несли только специфические транспозоны, то в геноме клонированных порослят выявлялись множественные интеграционные события (8–13), а также случайно интегрированные плазмидные копии, что ограничивает потенциальную значимость таких животных.

Среди сайт-специфических нуклеаз первоначально для трансгеноза животных, главным образом, с целью нокаута генов получили распространение так называемые нуклеазы «цинковых пальцев» (ZFN) (Porteus, Carroll, 2005), эффекторные нуклеазы, подобные активаторам транскрипции (TALEN) (Miller et al., 2011) и хоминг-мега-нуклеазы (Delacote et al., 2013), индуцирующие в целевых последовательностях генома мутации в форме инсерций или делеций небольшого размера посредством репарации разрывов ДНК негомологичным соединением концов (NHEJ) или гомологичной рекомбинацией. Используя технологии ZNF и TALEN, был успешно «выключен» ген $\alpha 1,3$ -галактозилтрансферазы (GGTA1) у свиней, что является первым шагом в создании трансгенных свиней — доноров (Hauschild et al., 2011; Xin et al., 2013). Следует, однако, отметить, что существенным недостатком ZFN и TALEN является высокая трудоемкость конструирования рекомбинантных векторов и дороговизна на фоне несущественного преимущества по сравнению с традиционной технологией нокаута.

Дальнейшее развитие технологии TALEN связывают с разработкой так называемой KI-стратегии (KI — knock-in), направленной на интеграцию целевых генов в определенные участки генома. Результативность KI-стратегии была продемонстрирована на примере эндогенного локуса α_{s1} -казеина крупного рогатого скота ($b\alpha_{s1}$ CAS) и гена эритропоэтина человека (hEPO) (Lee et al. 2013). Стратегия состоит из двух компонентов: TALEN-пары для введения двухпочечных разрывов в локус $b\alpha_{s1}$ CAS и интеграционного вектора (так же называемого донорским вектором). Последний несет кодирующую последовательность (CDS) целевого гена, фланкированную двумя универсальными плечами, гомологичными последовательностям длиной около 500 бпв направлении, соответственно, 5'- и 3'-от трансляционного старт-кодона гена $b\alpha_{s1}$ CAS. В конец CDS встраивают сайт полиаденилирования для обеспечения независимого созревания транскрибируемой мРНК и трансляции белка. KI-стратегия позволяет интегрировать CDS целевого гена непосредственно перед старт-кодоном гена $b\alpha_{s1}$ CAS, обеспечивая тем самым экспрессию интегрированных генов под контролем эндогенных *cis*-элементов гена $b\alpha_{s1}$ CAS. Два из десяти трансформированных клонов фетальных фибробластов, в которых было доказано ожидаемое интеграционное событие, были использованы для клонирования посредством SCNT. В настоящее время имеются многочисленные стельности от пересадки таких эмбрионов. Аналогичный подход был недавно применен для замещения гена сывороточного альбумина

крупного рогатого скота (BSA) двумя минигенами hSA с целью их специфической экспрессии в печени и молочной железе (Moghaddassi et al. 2014). KI-стратегия рассматривается сегодня как перспективный способ создания коров-продуцентов рекомбинантных терапевтических белков с молоком.

Новую эпоху в области трансгеноза животных связывают с применением для геномной инженерии млекопитающих системы CRISPR/Cas9, включающей короткие палиндромные повторы, расположенные группами равномерно удаленными друг от друга (CRISPR), и CAS9-нуклеазы (CRISPR-ассоциированные нуклеазы) (Cong et al., 2013; Mali et al., 2013). Узнавание целевого участка ДНК в системе CRISPR/Cas9 основано на использовании малых некодирующих направляющих РНК (gRNA), которые комплементарно взаимодействуют с мишенью, маркируя тем самым специфический участок чужеродной ДНК для последующего разрезания нуклеазой (Wiedenheft et al., 2012). В отличие от других мега-нуклеаз при использовании системы CRISPR/Cas9 для таргетинга целевого гена требуется конструирование короткого олигомера, в то время как для сборки ZNF и TALEN необходимы несколько последовательных шагов клонирования. Благодаря своей высокой эффективности, а также простоте и малой трудоемкости, технология находит все более широкое применение. Кроме того, она может быть использована для одноступенчатой генерации мутаций в нескольких генах одновременно (Wang et al., 2013), что невозможно ни одним из ранее используемых методов. Высокая эффективность системы CRISPR/Cas9 позволяет идентифицировать колонии клеток, несущие множественные мутации генов посредством прямого скрининга без использования при создании системы селективных маркеров, что в последующем исключает необходимость удаления последних посредством реклонирования или скрещивания (Wang et al., 2009).

Сравнение систем ZNF, TALEN и CRISPR/Cas9, а также настоящие и потенциальные области применения последних представлены в обзоре Harrison M. M. с соавторами (2014). Возможности конструирования, применения и анализа действия TALEN и CRISPR/Cas9 на примере различных модельных систем подробно описаны в обзоре Немудрого А. А. с соавторами (2014).

Технология CRISPR/Cas9 для трансгеноза животных находит применение во взаимосвязи, как с методом микроинъекции, так и SCNT-методом. Сопоставляя три способа микроинъекции (1) ДНК в пронуклеус, (2) РНК в пронуклеус и (3) РНК в цитоплазму NojiT. с соавторами (2014) показали, наибольшую эффективность последнего, как с точки зрения выживаемости бластоцист и получения потомства, так и общей эффективности создания трансгенных мышей. Показано, что цитоплазматическая инъекция Cas9 mRNA/sgRNA не оказывает существенного влияния на развитие эмбрионов свиней (Hai et al., 2014, Whitworth et al., 2014). Хотя непосредственная модифи-

кация генома на уровне зигот имеет ряд преимуществ, данная стратегия может приводить к получению гипоморфных мутаций, не способных передаваться потомству, или животных-мозаиков, требующих дополнительного шага разведения для получения гомозиготных особей. Метод SCNT, напротив, делает возможным выделение мутантных клеток перед началом дорогостоящих экспериментов на животных и позволяет гарантировать получение животных с запланированными модификациями генов.

В настоящее время посредством CRISPR/Cas9 созданы генетически модифицированные линии фетальных фибробластов практически всех основных видов сельскохозяйственных животных (крупного рогатого скота, свиней, коз) с нокаутом и вставками целого ряда генов (Carlson et al., 2012; Neo et al., 2014; Ni et al., 2014; Tan et al., 2013; Xu et al., 2013). Однако в литературе имеется лишь три примера получения жизнеспособного потомства сельскохозяйственных животных, используя данную технологию. Используя метод микроинъекции *NaiT* с соавторами (2014) получили трансгенных свиней с нокаутом гена *vWF*, являющегося причиной болезни Виллибранта у человека. Нокаут в гене *vWF* был доказан у 63 % (10 из 16) полученных потомков, в т.ч. у шести поросят — в диаллельном состоянии. Общая эффективность трансгенеза составила 13,2 %. Whitworth K. M. с соавторами (2014) получили трансгенных свиней с нокаутом генов *CD163* и *CD1D*, используя, как метод

SCNT, так и цитоплазматической инъекции в зиготы, полученные *in vitro*. Эффективность таргетинга в обоих случаях составила 100 %. Ni W. с соавторами (2014) показали возможность успешной индукции в первичных фибробластах коз прецизионных мутаций с эффективностью 9–70 %. Котрансфекция с использованием пула из двух или четырех различных Cas9/gRNAs позволила получать колонии клеток, несущих разрывы одновременно в двух или четырех генах с эффективностью 20 и 2 %, соответственно. Фибробласты с диаллельным нокаутом гена миостатина были использованы для SCNT и получения жизнеспособного потомства.

Бесспорно, технология CRISPR/Cas9 в ближайшее время станет доминирующей в создании трансгенных сельскохозяйственных животных. Немногочисленность публикаций по получению домашних животных в настоящее время, на наш взгляд, связана с длительностью получения потомства у сельскохозяйственных животных. Принимая во внимание, что клонирование с использованием пересадки ядер соматических клеток (SCNT) является тривиальной процедурой в целом ряде лабораторий во всем мире, в т.ч. и в России (Сингинаи др., 2013), в ближайшее время можно прогнозировать экспоненциальный рост получения трансгенных сельскохозяйственных животных с использованием технологии CRISPR/Cas9.

Результаты анализа развития трансгенеза у сельскохозяйственных животных обобщены в таблице 1.

Таблица 1

Развитие трансгенеза у сельскохозяйственных животных (по Kues и Niemann, 2011 с дополнениями)

Год	Событие	Стратегия	Ссылка
1985	Получение первых трансгенных овец, свиней и кроликов	Микроинъекция ДНК в пронуклеус	Hammer et al., 1985 Brem et al., 1985
1995	Ретровирусный трансгенез у коров	Перивителиновая инъекция клеток-упаковщиц	Haskell, Bowen, 1995
1997	SCNT-опосредованный трансгенез у овец	ГМ-фетальные фибробласты (случайная интеграция) и SCNT	Schnieke et al., 1997
1998	SCNT-опосредованный трансгенез у коров	ГМ-фетальные фибробласты (случайная интеграция) и SCNT	Cibelli et al., 1998
	Ретровирусный трансгенез у коров с 100 % эффективностью	Перивителиновая инъекция вирусных частиц	Chan et al., 1998
2000	Генный таргетинг у овец	Замена гена в ГМ-фибробластах SCNT	McCreath et al., 2000
2002	Трансхромосомный трансгенез у коров	Искусственные хромосомы	Kuroiwa et al., 2002
	Нокаут генов у свиней	Гетерологичный нокаут фибробластах и SCNT	Dai et al., 2002 Lai et al., 2002
	Спермий-опосредованный трансгенез у свиней	Линкер-опосредованный SMGT	Chang et al., 2002
2003	Лентивирусный трансгенез у свиней	Перивителиновая инъекция лентивирусов	Hofmann et al., 2003
2007	Нокаут генов у крупного рогатого скота	ГМ-фибробласты и SCNT	Richt et al., 2007
2010	Транспозон-опосредованный трансгенез у свиней	ГМ-фибробласты и SCNT	Jakobsen et al., 2010
		Инъекция транспозонов в зиготу	Garrels et al., 2010
2011	Диаллельный нокаут у свиней посредством ZNF	ГМ-фибробласты и SCNT	Hauschild et al., 2011
2013	Диаллельный нокаут у свиней посредством TALEN	ГМ-фибробласты и SCNT	Xin et al., 2013
2014	Диаллельный нокаут у свиней посредством CRISPR/Cas9	Микроинъекция РНК в цитоплазму	Hai et al., 2014
		ГМ-фибробласты и SCNT	Whitworth et al., 2014

Наряду с созданием трансгенных сельскохозяйственных животных — млекопитающих (коров, коз, овец, свиней, кроликов), не меньший интерес представляет создание генетически модифицированных кур (раздел 2.3.2). Однако трудности в точности определения овуляции, большое количество желтка в яйцеклетке, сильное уплотнение цитоплазмы около пронуклеусов не позволяют использовать для трансгенеза этого вида животных классический метод микроинъекции (Muramatsu et al., 1997).

Эффективным способом создания трансгенных кур является трансформация бластодермальных клеток на стадии X с использованием лентивирусных и ретровирусных векторов (Byun et al., 2011; Chapman et al., 2005; Kamihira et al., 2009; Kodama et al., 2012; Kwon et al., 2008, 2010; Lillico et al., 2007; McGrew et al., 2004; Scott et al., 2010; Smith et al., 2009). Как перспективное в последние годы рассматривается также направление трансгенеза птиц, связанное с использованием в качестве клеток-мишеней примордиальных зародышевых клеток (Miyahara et al., 2014; Nakamura et al., 2013; Tuack et al., 2013). Данные клетки являются предшественниками половых клеток, что позволяет проводить целенаправленную генетическую модификацию гонад, повышая тем самым эффективность получения трансгенного потомства.

2. НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННЫХ ГМ-ЖИВОТНЫХ

Данные направления включают создание животных (1) с измененным обменом веществ для повышения качества и эффективности производства продукции, (2) генетически устойчивых к инфекционным заболеваниям, (3) являющихся продуцентами биологически активных рекомбинантных белков, (4) доноров внутренних органов для пересадки человеку (ксенотрансплантация) и (5) животных-моделей (Melo et al., 2007; Эрнст, Зиновьева, 2008; Kues, Niemann, 2011; Bagle et al., 2013).

2.1. Трансгенные животные с измененным обменом веществ. Наиболее ранним направлением явилось получение особей с генами, продукты экспрессии которых являются регуляторами обмена веществ животных, обеспечивая достижение высокой продуктивности, экономного расхода кормов и изменение качественных характеристик продукции. Данный подход основан на введении в геном животного отдельного гена или группы генов, определяющих конкретный признак, не комбинируя, как при естественном спаривании, с множеством неизвестных и часто нежелательных вариантов других генов. Предполагалось, что ГМ-технологии позволят получать селекционный эффект по отдельным признакам значительно быстрее, чем при использовании классических методов селекции. Однако уже первые эксперименты, направленные на повышения интенсивности

роста животных посредством введения в их геном генов, кодирующих белки каскада гормона роста (соматотропин, релизинг-фактор гормона роста), оказались не состоятельными. Существенных различий в привесах между трансгенными контрольными животными, как овцами (Rexroad et al., 1989, 1990; Ward et al., 1989), так и свиньями (Ebert et al., 1988; Pursel et al., 1990; Wieghart et al., 1990) не наблюдалось. Кроме того, у трансгенных животных зачастую наблюдались проблемы со здоровьем (вялость, различные аномалии скелета и внутренних органов) (Pursel et al., 1990; Wieghart et al., 1990). Последующие эксперименты были направлены на повышение бактерицидных свойств молока коров посредством дополнительной экспрессии лизоцима, снижение аллергенных свойств молока посредством нокаута основного аллергена — β -лактоглобулина, изменение качества шерсти овец, однако все они не нашли практического применения. Принимая во внимание возможность направленной интеграции генов посредством сайт-специфических нуклеаз (раздел 1.5), можно ожидать нового развития работ в данном направлении.

2.2. Животные, генетически устойчивые к заболеваниям. Повышение генетической устойчивости животных к инфекционным заболеваниям является одной из главных задач современного животноводства. Это связано с тем, что инфекционные заболевания наносят существенный вред здоровью животных, могут быть опасными для здоровья человека (зоонозы), обуславливают производственные потери и снижение качества и безопасности продукции животноводства, являются причиной серьезных экономических потерь. Несмотря на то что в настоящее время получены последовательности полных геномов многих видов сельскохозяйственных животных (deKoning et al., 2007), гены и механизмы генетической устойчивости к заболеваниям остаются до настоящего времени не выясненными. Задача защиты животных от инфекций во всем мире решается сегодня, главным образом, методами ветеринарной медицины (вакцины, лекарственные препараты, антибиотики и даже выбраковка и убой). Это, разумеется, неизбежно для функционирования животноводства, но искусственная защита животных от инфекций одновременно создает условия для репродукции животных с ослабленной иммунной системой. Одним из путей решения проблемы может стать генетическая модификация животных. Разрабатываемые в этой связи стратегии создания могут быть глобально разделены на два направления: (1) введение генов устойчивости в геном хозяина («gain-of-function») и (2) специфический таргетинг эндогенных или экзогенных генов чувствительности к заболеваниям («loss-of-function» или «exchange-of-function»). Подробный анализ результатов исследований в области создания трансгенных сельскохозяйственных животных, генетически устойчивых к заболеваниям, с использованием обеих стратегий дан в обзоре Bagle T.R. с соавт. (2013) и Lassnig C. и Mueller M.

Таблица 2

Сравнение различных систем, используемых для производства рекомбинантных белков (Wang et al., 2013)

Оцениваемый показатель	Производственная система		
	Бактерии	Клетки млекопитающих	Трансгенные животные
Уровень производства	++	+	++++
Инвестиционные затраты	+++++	+	+++
Затраты на производство	+++++	++	++++
Наращивание производства	+++++	+	++++
Сбор продукции	+++++	+++++	++++
Очистка продукта	+++	++++	+++
Посттрансляционные модификации	+	++++	++++
Гликозилирование	+	++++	++++
Стабильность продукта	+++++	+++	++++
Контаминация патогенами	+++++	++++	++++
Вывод продукта на рынок	++++	+++++	+++

Относительная величина показателя: «+» — минимальная, «+++++» — максимальная

(2013). Суммируя, следует отметить, что до настоящего времени не было достигнуто каких-либо существенных результатов в направлении повышения устойчивости животных к заболеваниям посредством трансгенеза. Однако экспоненциальный рост экспериментов по секвенированию полных геномов, увеличение плотности SNP-матриц, с одной стороны, и повышение эффективности и технической доступности геномной инженерии животных (раздел 1.5), с другой стороны, могут стать новым импульсом в развитии данного направления трансгенных технологий в животноводстве.

2.3. Развитие исследований по получению ГМ-животных — биореакторов обусловлено необходимостью создания технологических платформ, которые способны эффективно производить рекомбинантные белки, мировая потребность в которых составляет 100 кг в год и более (данные FDA). При уровне производства 50 кг в год затраты на получение 1 грамма рекомбинантного белка оцениваются в 147 USD для производственной платформы на основе эукариотических клеток и лишь в 20 USD — для животных-продуцентов, а при уровне производства 100 кг в год, соответственно, в 48 и 6 долларов США (Duck et al., 2003). Другими движущими факторами развития технологий животных-продуцентов являются, прежде всего, возможности синтеза практически любых белков с проявлением их полной биологической функциональности, достижения существенно более высоких уровней производства рекомбинантных белков по сравнению с бактериальными и эукариотическими клеточными системами, гибкого регулирования объемов производимой продукции простым изменением численности животных (табл. 2).

В качестве среды для синтеза и накопления рекомбинантных белков находят применение молоко, кровь, семенная плазма, моча, секрет слюнных желез, белок куриных яиц (Houdebine, 2009), однако идеальными биореакторами являются молочная железа домашних жи-

вотных (коров, коз, овец) и яйца кур (табл. 3). Обе эти системы физиологически обладает огромным синтетическим потенциалом. Кроме того, молоко и куриные яйца, содержащие рекомбинантные белки, имеют высокий гигиенический стандарт и могут быть легко получены с использованием имеющихся технологий.

Необходимым условием для направленной экспрессии рекомбинантных белков в *молочной железе* трансгенных животных является использование в генных конструкциях регуляторных элементов генов белков молока: α_{s1} -, α_{s2} -, β - и κ -казеинов, β -лактоглобулина или α -лактальбумина (Серов, 2013). Анализ результатов многочисленных экспериментов, показывает, что даже при использовании одних и тех же регуляторных элементов уровень синтеза рекомбинантных белков между отдельными животными сильно варьирует и зависит, главным образом, от числа интегрированных копий генной конструкции и места интеграции (Зиновьева, Эрнст, 2006).

Первыми трансгенными сельскохозяйственными животными-продуцентами стали овцы, синтезирующие с молоком фактор свертывания крови IX или α_1 -антитрипсин под контролем промотора β -лактоглобулина (Simmons et al., 1988). Первым лекарственным средством, разрешенным к использованию в Европе (2006 г.), а затем и в США (2009 г.), стал препарат АТгуп, действующее вещество которого — антитромбин III человека — получают с молоком трансгенных коз (Jim, 2009).

В настоящее время с молоком трансгенных животных получают более 100 различных белков фармакологического и более 200 белков диагностического назначения, находящихся на различных стадиях исследований, предклинических или клинических испытаний. Так, только компания Genzyme Transgenics Corporation (GTC, США) производит с молоком животных около 50 рекомбинантных белков и моноклональных антител. Компания Pharming Group NV (Голландия) зани-

Таблица 3

Сравнительный анализ различных систем производства рекомбинантных белков трансгенными животными (Houdebine, 2009)

Оцениваемый показатель	Системы производства						
	Молоко	Кровь	Белок яйца	Семенная жидкость	Моча	Шелковы кокон	Другие
Уровень производства	+++++	+++++	+++++	+++	++	++	++
Инвестиционные затраты	+++	+++	+++	+	+	+++	+++
Затраты на производство	++++	++++	++++	++	+	+++++	++++
Наращивание производства	++++	++++	++++	++	+	++++	+++
Сбор продукции	+++++	++++	+++++	+++	+++	+++++	+++++
Очистка продукта	+++	++	+++	++	++	+++	++
Влияние на организм	+++	++	+++	+++	+++	++++	++++
Посттрансляционные модификации	++++	+++++	+++	+++	+++	++	++
Гликозилирование	++++	++++	+++	+++	+++	++	++
Контаминация патогенами	+++	++	+++	+++	++	++++	++++
Вывод продукта на рынок	++++	+	++	+	+	++	+

Относительная величина показателя: «+» — минимальная, «+++++» — максимальная

мается выводом на рынок ингибитора С1 и лактоферрина человека, производимых с молоком трансгенных животных.

Одной из перспективных целей создания животных-биореакторов является синтез биспецифических антител для иммунотерапии опухолей. Биспецифические антитела в отличие от моноклональных (моноспецифических) имеют два специфических участка связывания, один из которых узнает и связывается с клеткой-мишенью (тумор-специфическое антитело), а другой — с рецептором CD28 Т-клеток. В результате такого связывания с рецептором происходит активация Т-клеток и разрушение опухолевой клетки (Grosse-Novest et al., 2003). Таким образом, происходит не только узнавание клеток-мишеней антителами, но и их разрушение за счет мобилизации для этих целей иммунных клеток самого организма. Использование для производства биспецифических антител клеточных систем, которые с успехом применяются для получения моноклональных антител, позволяет добиться лишь незначительного выхода продукта и сопряжено с большими временными затратами при разработке и апробации подходящей клеточной производственной системы. Имеются сообщения о получении трансгенных животных, в частности, кроликов и крупного рогатого скота, продуцирующих в крови биспецифические антитела r28M против меланом-ассоциированного протеогликана и рецептора CD28 на Т-клетках человека в концентрации до 100 мг/л (Grosse-Novest et al., 2004, 2005). Предварительные эксперименты показали функциональную активность полученного рекомбинантного продукта. Исследования паттерна экспрессии и биологической функциональности биспецифических антител, синтезируемых в крови трансгенных кроликов, с целью оценки возможности их использования для иммунотерапии меланомы кожи проводятся в РОНЦ им. Н. Н. Бло-

хина совместно сВИЖ им. Л. К. Эрнста в рамках выполнения гранта РФ № 14-35-00107. В частности, изучены линии трансгенных кроликов с интегрированной рекомбинантной ДНК, кодирующей биспецифические антитела. Установлена экспрессия рекомбинантного продукта в В-клетках селезенки и лимфоузлов трансгенных животных. Начаты исследования по оптимизации методики очистки рекомбинантного продукта.

Еще одним привлекательным источником производства рекомбинантных белков, включая белки со сложной структурой, которые могут синтезироваться только клетками позвоночных, являются *яйца кур*. Существенные физиологические различия между птицами и млекопитающими являются значительным преимуществом использования птиц в качестве производственной платформы. Птицы являются иммунными к потенциальным терапевтическим протеинам, таким как эритропоэтин человека, экспрессия которых может убивать трансгенных млекопитающих, продуцирующих этот белок. Трансгенные птицы делают возможным существенное снижение стоимости и увеличение продуктивной мощности по сравнению с другими методами производства, такими как микробиологическая ферментация *E. coli*, дрожжи или клетки млекопитающих (Ivarie, 2003). Очистка рекомбинантных белков из яичного белка менее сложна, чем из молока, так как белок яйца представляет собой менее сложный биохимический комплекс. Кроме того, присутствие натуральных ингибиторов протеазы в содержимом яйца, а также природное стерильное микроокружение системы яйца обеспечивает идеальную среду с точки зрения стабилизации биологической активности чужеродных белков (Mozdziaik, Petite, 2004; Rapp et al., 2003). По сравнению с млекопитающими паттерн гликозилирования некоторых белков птицы сходен с аналогичными белками человека (Raju et al., 2000).

Для достижения высоких уровней экспрессии рекомбинантного белка (до нескольких миллиграммов белка на миллилитр в сыворотке крови и белке яиц) используют конститутивные промоторы-энхансеры, такие как, промотор-энхансер ранних генов цитомегало вируса человека (CMV) и промотор-энхансер гена β -актина птиц. Однако в ряде случаев отмечается снижение уровня экспрессии рекомбинантного продукта у потомков по сравнению с родоначальниками, причины которого остаются пока невыясненными (Kamihira et al., 2005). Возможно, высокий уровень экспрессии чужеродного белка в различных органах и тканях действует как селективный фактор. Кроме того, было замечено, что уровни экспрессии прямо коррелируют с «дозой гена» (количеством копий в расчете на клеточный геном), т. е. вероятность различных физиологических дефектов у наиболее перспективных продуцентов значительно возрастает (Furlan-Magaril et al., 2011; Kamihira et al., 2005; McGrew et al., 2004; Scott et al., 2010).

Предпринимались также попытки тканеспецифической экспрессии трансгенов с использованием регуляторных элементов, контролирующих синтез овальбумина яиц (Byun et al., 2011; Dougherty, Sanders, 2005; Lillico et al., 2007; Scott, Lois, 2005; Shimizu et al., 2005). Для этих целей использовали хромосомальные фрагменты ДНК, примыкающие на 5'-конце к гену овальбумина длиной 7,5 и 2,8 kb (Lillico et al., 2007; Zhu et al., 2005). Как отмечают авторы, тканеспецифическая экспрессия трансгенов у нескольких поколений птиц была относительно стабильной, однако уровни синтеза белка были в 20–50 раз снижены по сравнению с результатами, полученными с использованием конститутивных промоторов (Cheng et al., 2012; Kodama et al., 2012). Очевидно, природная система регуляции синтеза овальбумина зависит от ряда регуляторных элементов, расположенных, как внутри или рядом со структурным геном, так и вне его, и может иметь несколько уровней.

На сегодняшний день с использованием конститутивных и тканеспецифических промоторов получены трансгенные птицы, экспрессирующие репортерные гены LacZ (Mozdziak et al., 2003) и GFP (Волкова с соавт., 2012, 2013; Byun et al., 2011), бактериальный ген β -лактамазы (Harvey et al., 2002), интерферон человека $\alpha 2b$ (Rapp et al., 2003), β -интерферон человека (Lillico et al., 2007), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека (Kwon et al., 2008), моноклональные антитела (Kamihira et al., 2009), антагонист рецептора β -интерлейкина (Kwon et al., 2010) и гормон роста человека (Kodama et al., 2012).

2.4. Создание животных-доноров рассматривается в качестве одного из перспективных путей решения проблемы нехватки внутренних органов и тканей для пересадки человеку (ксенотрансплантации). Наиболее подходящим видом животных — потенциальных доноров являются свиньи (Шумаков, Тоневицкий, 1999). Одна-

ко до последнего времени использование свиней в качестве доноров рассматривалось только теоретически, так как пересадка их органов и тканей приматам сопровождалась отторжением в течение нескольких дней или даже часов после трансплантации (сверхострая реакция отторжения). Решением проблемы снятия такой сверхострой реакции отторжения может стать создание GAL-KO трансгенных свиней с нокаутом гена *GGTA1*.

Впервые о создании GAL-KO свиней сообщили две лаборатории в США, одна из которых получила линию на основе обычных домашних свиней (Dai et al., 2002; Phelps et al., 2003), а вторая — на основе минипиггов (Kolber-Simonds et al., 2004; Lai et al., 2002). В настоящее время обе линии активно используются в различных доклинических исследованиях, а также в качестве доноров клеток для проведения дополнительных генетических манипуляций.

Принимая во внимание перспективы использования GAL-KO трансгенных свиней в трансплантационной медицине, и в связи с разработкой более совершенных методов нокаута генов млекопитающих (раздел 1.5), еще, по крайней мере, шесть исследовательских групп во всем мире сообщили о создании таких свиней (обзор Зиновьева Н. А. с соавт., 2014).

Дальнейший прогресс в использовании свиней в качестве доноров для ксенотрансплантации связывают с проведением дополнительных манипуляций, в частности, с экспрессией у GAL-KO свиней белков-регуляторов комплемента человека, таких как CD46, CD55 и CD59 (Luo et al., 2012, обзор). Для предотвращения острого гуморального отторжения пересаженных органов и тканей рассматриваются технологии генетической модификации свиней с целью экспрессии белков человека: эндотелиальной экто-аденозиновой фосфатазы CD39 (экто-АДФазы), эндотелиального рецептора протеина С (EPCR), гемоксигеназы 1, тромбомодулина 1 и ингибитора пути тканевого фактора (TFPI) (d'Apice, Cowan, 2009, обзор). Дальнейшие модификации свиней связывают с дополнительной экспрессией генов, препятствующих процессу клеточного отторжения (Weiss et al., 2009).

Несмотря на то, что достижение вышеназванных целей требует проведения новых широкомасштабных исследований, достигнутые успехи в нокауте *GGTA1* позволяют уже сегодня говорить о потенциальной значимости GAL-KO свиней в решении некоторых задач трансплантационной медицины. В частности, рассматривается их использование в качестве источника кожи в терапии ожоговых ран и как доноров сердечных клапанов (Зиновьева с соавт., 2014, обзор).

2.5. Трансгенные сельскохозяйственные животные-модели. Крупные сельскохозяйственные животные, в частности, свиньи и овцы играют все возрастающую роль в трансляционных биомедицинских исследованиях. Генетическая модификация свиней позволяет создавать животных, моделируя у них механизмы болезней

человека на молекулярном уровне (Aigner et al., 2010). В настоящее время уже получены свиньи-модели для изучения цистического фиброза (Rogers et al., 2008; Wine, 2010), диабета (Repper et al., 2010), *дистрофии* макулярной области сетчатки Штаргардта (Sommer et al., 2011), вызывающие огромный интерес у биомедицинского сообщества. Klumiuk с соавторами (2012) созданы трансгенные свиньи с индуцированной экспрессией трансгенов, основанной на бинарной tet-on системе. Экспрессионная система активируется доксициклином через tet-контролируемый трансактиватор (ТА). Связывание ТА с ответным элементом трансактиватора (TRE) приводит к транскрипции downstream генов. Такие свиньи рассматриваются в качестве идеальных моделей для экспериментальной физиологии и трансляционной медицины.

Таким образом, приведенные в настоящем обзоре данные убедительно демонстрируют, что трансгенные технологии находят все большее применение для решения задач, как фундаментальной, так и прикладной науки. Лимитирующим фактором массового создания трансгенных сельскохозяйственных животных до недавнего времени оставались высокие материальные затраты, обусловленные, главным образом, относительно низкой эффективностью трансгенеза. Принимая во внимание решение данной проблемы за счет развития технологий сайт-специфических нуклеаз, можно прогнозировать рост числа исследований в области геномной инженерии домашних животных.

Работа выполнена при поддержке государства в лице ФАНО России, № госрегистрации НИР01201455101 и Российского научного фонда, проект № 14-35-00107.

ЛИТЕРАТУРА

1. Волкова Н.А., Волкова Л.А., Фомин И.К. с соавт. (2013) Интеграция и экспрессия маркерных генов в эмбрионах кур при использовании ретровирусных экспрессирующих векторов. *Сельскохозяйственная биология*. № 2: С. 58–61.
2. Волкова Н.А., Волкова Л.А., Фомин И.К. с соавт. (2012) Оптимизация условий введения рекомбинантной ДНК в сперматогенные клетки семенников петухов *in vivo*. *Сельскохозяйственная биология*. № 6: С. 56–61.
3. Зиновьева Н.А., Мелерзанов А.В., Петерсен Е.В. с соавт. (2014) Использование трансгенных GAL-КО свиней в ксенотрансплантации: проблемы и перспективы. *Сельскохозяйственная биология*. № 2: С. 42–49.
4. Зиновьева Н.А., Эрнст Л.К. (2006) Проблемы биотехнологии и селекции сельскохозяйственных животных. Изд. 2-ое, дополненное. Дубровицы: ВИЖ.
5. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П. с соавт. (2014) Системы редактирования геномов TALEN и CRISPR/Cas — инструменты открытий. *Acta Naturae*. Т. 6. № 3 (22): С. 20–42.
6. Савченкова И.П., Зиновьева Н.А., Булла Й., Брем Г. (1996) Эмбриональные стволовые клетки, их генетическое изменение путем гомологичной рекомбинации и использование в получении трансгенных животных. *Успехи современной биологии*. Т. 116(1): С. 78–91.
7. Серов О.Л. (2013) Трансгенные животные: фундаментальные и прикладные аспекты. *Вавиловский журнал генетики и селекции*. 2013. Т. 17. № 4/2: С. 1055–1064.
8. Сингина Г.Н., Волкова Н.А., Багиров В.А., Зиновьева Н.А. (2014) Криобанки соматических клеток как перспективный способ сохранения генетических ресурсов животных. *Сельскохозяйственная биология*. № 6: С. 3–14.
9. Сингина Г.Н., Лопухов А.В., Зиновьева Н.А. с соавт. (2013) Оптимизация параметров энуклеации и слияния ооцита с соматической клеткой при получении клонированных эмбрионов млекопитающих. *Сельскохозяйственная биология*. № 2: С. 46–51.
10. Шумаков В., Тоневицкий А. (1999) Ксенотрансплантация: научные и этические проблемы. *Журнал «Человек»*. № 6. Дата обращения: 14.04.2015. URL: <http://vivovoco.astronet.ru/VV/PAPERS/MEN/TRANSPLANT.HTM>.
11. Эрнст Л.К., Волкова Н.А., Зиновьева Н.А. (2008) Фенотипический эффект экспрессии рекомбинантных генов в организме трансгенных животных разных видов. М.: РАСХН. 251 с.
12. Эрнст Л.К., Зиновьева Н.А. (2008) Биологические проблемы животноводства в XXI веке // М.: РАСХН. 501 с.
13. Bagle T.R., Kunkulol R.R., Baig M.S., More S.Y. (2013) Transgenic animals and their application in medicine. *Int. J. Med. Res. Health Sci*. V. 2 (1): P. 107–116.
14. Bosch P., Forcato D.O., Alustiza F.E. et al. (2015) Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cell. Mol. Life Sci*. V. 72: P. 1907–1929. DOI 10.1007/s00018–015–1842–1.
15. Brackett B.G., Baranska W., Sawicki W., Korpowski H. (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci*. V. 68: P. 353–357.
16. Brem G., Brenig B., Goodman H.M. et al. (1985) Production of transgenic mice, rabbits and pig by microinjection into pronuclei. *Zuchtkunde*. V. 20: P. 251–252.
17. Brinster R., Nagano M. (1998) Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin. Cell. Dev. Biol*. V. 9 (4): P. 401–409.
18. Byun S.J., Kim S.W., Kim K.W. et al. (2011) Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expres-

- sion in transgenic chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* V. 75 (4): P. 646–9.
19. Campbell K.H., McWhir J., Ritchie W.A., Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* V. 380: P. 64–66.
 20. Carlson D.F., Tan W., Lillico S.G. et al. (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *PNAS.* V. 109(43): P. 17382–17387. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1073/pnas.1211446109.
 21. Chan A., Homan E., Ballou L. et al. (1998) Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *PNAS USA.* V. 95: P. 14 028–14 033.
 22. Chang K., Qian J., Jiang M. et al. (2002) Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol.* V. 2: P. 5. DOI doi:10.1186/1472-6750-2-5.
 23. Chapman S.C., Lawson A., Macarthur W.C. et al. (2005) Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentivira vector. *Development.* V. 132: P. 935–940.
 24. Cibelli J.B., Campbell K.H., Seidel G.E. et al. (2002) The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol.* V. 20: P. 13–14.
 25. Clark K.J., Carlson D.F., Fahrenkrug S.C. (2007). Pigs taking wings with transposons and recombinases. *Genome Biol.* V. 8, Suppl 1: S13.
 26. Cong, L., Ran FA, Cox D. et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science.* V. 339 (6121): P. 819–823.
 27. d'Apice A.J., Cowan P.J. (2009) Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. *Transp Immunol.* V. 21: P. 111–115.
 28. Dai Y., Vaught T.D., Boone J. et al. (2002) Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology.* V. 20: P. 251–255.
 29. de Koning D.J., Archibald A., Haley C.S. (2007) Livestock genomics: bridging the gap between mice and men. *Trends Biotechnol.* V. 25: P. 483–489
 30. Delacote F., Perez C., Guyot V. et al. (2013) High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS one.* V. 8 (1): e53217.
 31. Dougherty D.C., Sanders M.M. (2005) Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. *Trends EndocrinolMetab.* V. 16: P. 414–419.
 32. Dyck M.K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M.A. (2003) Making recombinant proteins in animals — different systems, different applications. *Trends in Biotechnology.* V. 21 (9): P. 394–409.
 33. Ebert K.M., Low M.J., Overstrom E.W. et al. (1988) Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *MolEndocrinol.* V. 2 (3): P. 277–83.
 34. Furlan-Magaril M., Rebollar E., Guerrero G. et al. (2011) An insulator embedded in the chicken β -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucleic Acids Res.* V. 39(1): P. 89–103.
 35. Gandolfi F., Lavitrano M., Camaioni A. et al. (1989) The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fert.* V. 81: P. 23–28.
 36. Gandolfi F. (1998) Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Trans. Res.* V. 7: P. 147–155.
 37. Garrels W., Mates L., Holler S. et al. (2010). Generation of transgenic pigs by the Sleeping Beauty transposition in zygotes. *Reprod. Dom. Anim.* V. 45: P. 65
 38. Ghazizadeh S., Harington R., Taichmann L. (1999) In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: implications for cutaneous gene therapy. *Gene Ther.* V. 7: P. 1267–1275.
 39. Gordon, J.W., Scangos, D.J., Plotkin, J.A. et al. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77: P. 7380–7384.
 40. Grosse-Hovest L., Hartlapp I., Marwan W. et al. (2003) A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur J Immunol.* V. 33 (5): P. 1334–1340.
 41. Grosse-Hovest L., Müller S., Minoia R. et al. (2004) Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci.* V. 101 (18): P. 6858–6863.
 42. Grosse-Hovest L., Wick W., Minoia R. et al. (2005) Supraagonistic, bispecific single-chain antibody purified from the serum of cloned, transgenic cows induces T-cell-mediated killing of glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* V. 117 (6): P. 1060–1064.
 43. Hai T., Teng F., Guo R. et al. (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* V. 24: P. 372–375. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1038/cr.2014.11.
 44. Hammer R., Pursel V., Rexroad J. et al. (1985) Production of trans-genie rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.* V. 315: P. 680–683.
 45. Harrison M.M., Jenkins B.V., O'Connor-Giles K.M., Wildonger J. A (2014) CRISPR view of development. *Genes & Dev.* V. 28: P. 1859–1872. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI: 10.1101/gad.248252.114.
 46. Harvey A.J., Speksnijder, Baugh L.R. et al. (2002) Expression of exogenous protein in G. the egg white of transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.* V. 20: P. 396–399.
 47. Haskell R., Bowen R. (1995) Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* V. 40 (3): P. 386–390
 48. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., et al. (2011) Efficient generation of a biallelic knockout in pigs us-

- ing zincfinger nucleases. *Proc Natl Acad Sci.* V. 108: P. 12013–12017.
49. Heo Y., Quan X., Xu Y. et al. (2014) CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine pluripotent stem cells and embryos. *Stem Cells Dev.* Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1089/scd.2014.0278.
 50. Hofmann A., Kessler B., Ewerling S. et al. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* V. 4 (11): P. 1054–1060. DOI: 10.1038/sj.embor.7400007.
 51. Hofmann A., Kessler B., Ewerling S. et al. (2006) Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *Mol Ther.* V. 13: P. 59–66.
 52. Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M. et al. (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod.* V. 71 (2): P. 405–409.
 53. Horii T., Arai Y., Yamazaki M. et al. (2014) Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Rep.* V.4: P.4513. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI: 10.1038/srep04513.
 54. Houdebine L. (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* V. 32: P. 107–121.
 55. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S. et al. (2009). Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques.* V. 47: P. 959–968.
 56. Ivarie R. (2003) Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.* V. 21: P. 14–19
 57. Ivics Z., Hackett P.B., Plasterk R.H., Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-616 like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell.* V. 91: P. 501–510.
 58. Jacobsen J.C., Bawden C.S., Rudiger S.R. et al. (2010) An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet.* V. 19: P. 1873–1882.
 59. Jahner D., Jaenisch R. (1985) Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature.* V. 315: P. 594–597.
 60. Jim K. (2009) First US approval for a transgenic animal drug. *Nature Biotechnology.* V. 27 (4): P. 302–304.
 61. Kamihira M., Ono K., Esaka K. et al. (2005) High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. *J. Virol.* V. 79 (17): P. 10864–10874.
 62. Kues W.A., Garrels W., Mates L. et al. (2010) Production of transgenic pigs by the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research.* V. 19: P. 336.
 63. Kues W.A., Niemann H. (2011) Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med.* V. 102: P. 146–156. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.009.
 64. Klymiuk N., Böcker W., Schönitzer V. et al. (2012) First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB Journal.* V. 26 (3). P. 1086–1099.
 65. Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K. et al. (2012) Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *J Biosci Bioeng.* V. 113 (2): P. 146–53.
 66. Kolber-Simonds D., Lai L., Watt S.R. et al. (2004) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* V. 101 (19): P. 7335–7340.
 67. Kuroiwa Y., Kasinathan P., Choi Y.J. et al. (2002) Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol.* V. 20: P. 889–894.
 68. Kwon M.S., Koo B.C., Choi B.R. et al. (2008) Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Molecular Reproduction and Development.* V. 75: P. 1120–1126.
 69. Kwon S.C., Choi J.W., Jang H.J. et al (2010) Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biology of Reproduction.* V. 82: P. 1057–1064.
 70. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K.W. et al. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science.* V. 295(5557): P. 1089–1092.
 71. Lassnig C., Mueller M. (2013) Disease-Resistant Transgenic Animals. In: Christou P. et al. (eds.), *Sustainable Food Production*, Springer Science+Business Media New York. P. 747–760. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI 10.1007/978-1-4614-5797-8.
 72. Lee S, Park H, Kong I, Wang Z (2013) 30 a transcription activatorlike effector nuclease (Talen)-mediated universal gene knock-in strategy for mammary gland-specific expression of recombinant proteins in dairy cattle. *ReprodFertil Dev.* V. 26: P. 129–129
 73. Lillico S.G., A. Sherman M.J. McGrew C.D. et al. (2007) Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS.* V. 104 (6): P. 1771–1776.
 74. Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T.G., Sørensen C.B. Genetically modified pigs for biomedical research // *J Inherit Metab Dis.*, 2012, 35 (4), p. 695–713.
 75. Maione B., Lavitrano M., Spadatoro C., Kiessling A.A. (1998) Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol. Reprod. Dev.* V. 50: P. 406–409.
 76. Mali P., Yang L., Esvelt K.M. et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science.* V. 339: P. 823–826.
 77. McCreath K.J., Howcroft J., Campbell K.H. et al. (2000) Production of genetargeted sheep by nuclear

- transfer from cultured somatic cells. *Nature*. V. 405: P. 1066–1069.
78. McGrew M.J., Sherman A., Ellard F.M. et al. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*. V. 5: P. 728–733.
 79. Melo E.O., Canavessi A.M., Franco M.M., Rumpf R. (2007) Animal transgenesis: state of the art and applications. *J. Appl. Genet*. V. 48 (1). P. 47–61.
 80. Miller J.C., Tan S, Qiao G. et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. V. 29 (2): P. 143–148.
 81. Miyahara D., Mori T., Makino R. et al. (2014) Culture Conditions for Maintain Propagation, Long-term Survival and Germline Transmission of Chicken Primordial Germ Cell-Like Cells *J. Poult. Sci*. V. 51: P. 87–95
 82. Moghaddassi S., Eyestone W., Bishop C.E. (2014) TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLoS One*. V. 9 (2): e89631.
 83. Mozdziak P.E., Borwornpinyo S., McCoy D.W., Pettitte J.N. (2003) Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase. *Dev. Dyn*. V. 226: P. 439–445.
 84. Mozdziak P.E., Pettitte J.N. (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dyn*. V. 229: P. 414–421.
 85. Muramatsu T., Mizutani Y., Ohmori Y., Okumura J. (1997) Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. V. 230: P. 376–380.
 86. Nakamura Y. Kagami H., Tagami T. (2013) Development, differentiation and manipulation of chick germ cells *Develop. Growth Differ*. V. 55: P. 20–40.
 87. Ni W., Qiao J., Hu S. et al. (2014) Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. *PLoS ONE*. V. 9 (9): e106718. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1371/journal.pone.0106718.
 88. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. et al. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature*. V. 300: P. 611–615.
 89. Palmiter R., Sandgren E., Avarbock M. et al. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *PNAS USA*. V. 88: P. 478–482.
 90. Phelps C.J., Koike C, Vaught T.D. et al. (2003) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*. V. 299 (5605): P. 411–414.
 91. Perry A.C.F., Wakayama T., Kishikawa H. et al. (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*. V. 284: P. 1180–1183
 92. Perry A.C., Rothman A., de las Heras J.I. et al. (2001) Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nat Biotechnol*. V. 19: P. 1071–1073.
 93. Porteus M.H., Carroll D. (2005) Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotech*. V. 23: P. 967–973.
 94. Pursel V.G., Hammer R.E., Bolt D.J. et al. (1990) Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*. V. 41: P. 77–87.
 95. Raju T.S., Briggs J.B., Borge S.M., Jones A.J. (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. V. 10: P. 477–486.
 96. Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L. et al. (2003) Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res*. V. 12: P. 569–575.
 97. Renner S., Fehlings C., Herbach N. et al. (2010) Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*. V. 59. P. 1228–1238.
 98. Rexroad C.E.Jr., Hammer R.E., Behringer R.R. et al. (1990) Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. V. 41: P. 119–124.
 99. Rexroad C.E.Jr., Hammer R.E., Bolt D.J. et al. (1989) Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol Reprod Dev*. V. 1 (3): 164–169.
 100. Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N. et al. (2007) Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology*. V. 25: P. 132–138.
 101. Ritchie W.A., King T., Neil C. et al. (2009) Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol. Reprod. Dev*. V. 76: P. 61–64.
 102. Rogers C.S., Stoltz D.A., Meyerholz D.K. et al. (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. V. 321. P. 1837–1841.
 103. Schelander K., Peli J., Small F., Brem G. (1995) Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Anim. Biotechnol*. V. 6: P. 41–50
 104. Schnieke A., Kind A., Ritchie W. et al. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. V. 278: P. 2130–2133
 105. Scott B.B., Lois C. (2005) Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *PNAS*. V. 102 (45): P. 16443–16447.
 106. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. (2010) Applications of avian transgenesis. *ILAR J*. V. 51 (4): P. 353–61.
 107. Shimizu M., Losos J.K., Gibbins A.M. (2005) Analysis of an approach to oviduct-specific expression of modified chicken lysozyme genes. *Biochem Cell Biol*. V. 83 (1): P. 49–60.

108. Simons J., Wilmut I., Clark A. et al. (1988) Gene transfer into sheep. *Bio/Technol.* V. 6: P. 179–183.
109. Smith C.A., Roeszler K.N., Sinclair A.H. (2009) Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation.* V. 77 (5): P. 473–82.
110. Sommer J.R., Estrada J.L., Collins E.B. et al. (2011) Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration. *Br J Ophthalmol.* V. 95 (12). P. 1749–1754. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011–300417.
111. Sperandio S., Lulli V., Bacci M. et al. (1996) Sperm mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim. Biotechnol.* V. 7: P. 59–77.
112. Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A. et al. (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *PNAS.* V. 110 (41): P. 16526–16531 Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1073/pnas.1310478110/-/DCSupplemental.
113. Tyack S.G., Jenkins K.A., O’Neil T.E. et al. (2013) A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Reserch.* V. 22: P. 1257–1264
114. Wang S., Sun X., Ding F. et al. (2009) Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on recloned embryo development. *Theriogenology.* V. 72: P. 535–541.
115. Wang Y., Zhao S., Bai L. et al. (2013) Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. *BioMed Research International.* V. 2013, Article ID 580463, 9 pages. URL: [http:// dx.doi.org/10.1155/2013/580463](http://dx.doi.org/10.1155/2013/580463).
116. Ward K.A., Nancarrow C.D., Murray J.D. et al. (1989) The physiological consequences of growth hormone fusion gene expression in transgenic sheep. *J. Cell Biochem.* V. 13: P. 164
117. Weiss E.H., Lilienfeld B.G., Muller S. et al. (2009) HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: Protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation.* V. 87: P. 35–43.
118. Whitelaw C.B., Radcliffe P.A., Ritchie W.A. et al. (2004) Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett.* V. 571: P. 233–236.
119. Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A. et al. (2014) Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biology of Reproduction.* V. 91(3): P. 78–90.
120. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* V. 482: P. 331–338.
121. Wiegart M., Hoover J.L., McGrane M.M. et al. (1990) Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene. *J ReprodFertil Suppl.* V. 41: P. 89–96.
122. Wine J.J. (2010) The development of lung disease in cystic fibrosis pigs. *Sci. Transl. Med.* V. 2, 29ps20.
123. Xin J., Yang H., Fan N. et al. (2013) Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One* 8 (12): e84250.

TRANSGENIC FARM ANIMALS: STATUS OF THE CURRENT RESEARCHES AND THE FUTURE

Zinovieva N. A., Volkova N. A., Bagirov V. A., Brem G.

✿ **SUMMARY:** The production of transgenic farm animals is of great interest of modern basic and applied researches. This article reviews methods for production of transgenic farm animals including pronuclear microinjection, nuclear transfer of genetically transformed somatic cells, retrovirus and lentivirus mediated gene transfer, the application of spermatogonia as a target for gene transfer. Using site-specific endonucleases (ZNF, TALEN, CRISPR/Cas9) as modern techniques allowing significantly to improve the gene transfer efficiency in farm animals are briefly described. The particular attention is focused on method for genetic modifications of chicken. The advances in various areas of genetic engineering domestic animals are discussed including creating animals with altered metabolism status to improve the quality and efficiency of production, which are genetically resistant to infectious diseases, producers of biologically active recombinant proteins, donors of organs for human transplantation (xenotransplantation) and animals-models for translation biomedical researches. The innovative immune therapy assay as an example of practical application of transgenic animals-bioreactor technology is characterized.

✿ **KEY WORDS:** recombinant DNA; transgenesis; genetically modified farm animals; animals-bioreactors.

✿ REFERENCES (TRANSLITERATED)

1. Volkova N. A., Volkova L. A., Fomin I. K. s soavt. (2013) Integratsiya i ekspressiya markernykh genov v embri-onakh kur pri ispol'zovanii retrovirusnykh ekspressiruyushchikhsya vektorov [Integration and expression of marker genes in chicken embryos using retrovirhim-plasia vectors]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* N 2: S. 58–61.
2. Volkova N. A., Volkova L. A., Fomin I. K. s soavt. (2012) Optimizatsiya usloviy vvedeniya rekombinantnoy DNK v spermatogennye kletki semennikov petukhov *in vivo* [Optimization of conditions for introduction of recombinant DNA in spermatogenic cells of the testes of cocks *in vivo*]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya.* N 6: S. 56–61.
3. Zinov'yeva N. A., Melerzanov A. V., Petersen E. V. s soavt. (2014) Ispol'zovanie transgennykh GAL-KO sviney v ksenotransplantatsii: problemy i perspektivy [The use of transgenic GAL-KO pigs in xenotransplantation:

- problems and prospects]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. N 2: S. 42–49.
4. Zinov'yeva N. A., Ernst L. K. (2006) Problemy biotekhnologii i seleksii sel'skokhozyaystvennykh zhivotnykh [Problems of biotechnology and breeding of farm animals]. Izd. 2-oe, dopolnennoe. Dubrovitsy: VIZh.
 5. Nemudryy A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P. s soavt. (2014) Sistemy redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas — instrumenty otkrytiy [System editing genomes TALEN and CRISPR/Cas tools of discovery]. *Acta Naturae*. T. 6. № 3 (22): S. 20–42.
 6. Savchenkova I. P., Zinov'yeva N. A., Bulla Y., Brem G. (1996) Embrional'nye stvolovye kletki, ikh geneticheskoe izmenenie putem gomologichnoy rekombinatsii i ispol'zovanie v poluchenii transgennykh zhivotnykh [Embryonic stem cells and their genetic modification by homologous recombination and the use in the production of transgenic animals]. *Uspekhi sovremennoy biologii*. T. 116(1): S. 78–91.
 7. Serov O. L. (2013) Transgennyye zhivotnye: fundamental'nye i prikladnyye aspekty [Transgenic animals: fundamental and applied aspects]. *Vavilovskiy zhurnal genetiki i seleksii*. 2013. T. 17. N 4/2: S. 1055–1064.
 8. Singina G. N., Volkova N. A., Bagirov V. A., Zinov'yeva N. A. (2014) Kriobanki somaticheskikh kletok kak perspektivnyy sposob sokhraneniya geneticheskikh resursov zhivotnykh [Cryobanks somatic cells as a promising way to preserve animal genetic resources]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. N 6: S. 3–14.
 9. Singina G. N., Lopukhov A. V., Zinov'yeva N. A. s soavt. (2013) Optimizatsiya parametrov enukleatsii i sliyaniya ootsita s somaticheskoy kletkoy pri poluchenii klonirovannykh embrionov mlekoopitayushchikh [Optimization of parameters enucleation and fusion of the oocyte and somatic cell upon receipt of cloned mammalian embryos]. *Sel'skokhozyaystvennaya biologiya*. N 2: S. 46–51.
 10. Shumakov V., Tonevitskiy A. (1999) Ksenotransplantatsiya: nauchnye i eticheskie problemy. *Zhurnal "Chelovek"* [Xenotransplantation: scientific and ethical issues]. N 6. Data obrashcheniya: 14.04.2015. URL: <http://vivovoco.astronet.ru/VV/PAPERS/MEN/TRANSPLANT.HTM>.
 11. Ernst L. K., Volkova N. A., Zinov'yeva N. A. (2008) Fenotipicheskiy effekt ekspressii rekombinantnykh genov v organizme transgennykh zhivotnykh raznykh vidov [Phenotypic effects of expression of recombinant genes in an organism transgenic animals of different species]. *M.: RASKhN*. 251 s.
 12. Ernst L. K., Zinov'yeva N. A. (2008) Biologicheskie problemy zhivotnovodstva v XXI veke [Biological problems of livestock in the twenty-first century] // *M.: RASKhN*. 501 s.
 13. Bagle T. R., Kunkulol R. R., Baig M. S., More S. Y. (2013) Transgenic animals and their application in medicine. *Int. J. Med. Res. Health Sci*. V. 2 (1): P. 107–116.
 14. Bosch P., Forcato D. O., Alustiza F. E. et al. (2015) Exogenous enzymes upgrade transgenesis and genetic engineering of farm animals. *Cell. Mol. Life Sci*. V. 72: P. 1907–1929. DOI 10.1007/s00018–015–1842–1.
 15. Brackett B. G., Baranska W., Sawicki W., Korpowski H. (1971) Uptake of heterologous genome by mammalian spermatozoa and its transfer to ova through fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci*. V. 68: P. 353–357.
 16. Brem G., Brenig B., Goodman H. M. et al. (1985) Production of transgenic mice, rabbits and pig by microinjection into pronuclei. *Zuchtkunde*. V. 20: P. 251–252.
 17. Brinster R., Nagano M. (1998) Spermatogonial stem cell transplantation, cryopreservation and culture. *Semin. Cell. Dev. Biol*. V. 9 (4): P. 401–409.
 18. Byun S. J., Kim S. W., Kim K. W. et al. (2011) Oviduct-specific enhanced green fluorescent protein expression in transgenic chickens. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. V. 75 (4): P. 646–9.
 19. Campbell K. H., McWhir J., Ritchie W. A., Wilmut I. (1996) Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature*. V. 380: P. 64–66.
 20. Carlson D. F., Tan W., Lillico S. G. et al. (2012) Efficient TALEN-mediated gene knockout in livestock. *PNAS*. V. 109(43): P. 17382–17387. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1073/pnas.1211446109.
 21. Chan A., Homan E., Ballou L. et al. (1998) Transgenic cattle produced by reverse-transcribed gene transfer in oocytes. *PNAS USA*. V. 95: P. 14028–14033.
 22. Chang K., Qian J., Jiang M. et al. (2002) Effective generation of transgenic pigs and mice by linker based sperm-mediated gene transfer. *BMC Biotechnol*. V. 2: P. 5. DOI doi:10.1186/1472–6750–2-5.
 23. Chapman S. C., Lawson A., Macarthur W. C. et al. (2005) Ubiquitous GFP expression in transgenic chickens using a lentivira vector. *Development*. V. 132: P. 935–940.
 24. Cibelli J. B., Campbell K. H., Seidel G. E. et al. (2002) The health profile of cloned animals. *Nat Biotechnol*. V. 20: P. 13–14.
 25. Clark K. J., Carlson D. F., Fahrenkrug S. C. (2007). Pigs taking wings with transposons and recombinases. *Genome Biol*. V. 8, Suppl 1: S13.
 26. Cong, L., Ran FA, Cox D. et al. (2013) Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas system. *Science*. V. 339 (6121): P. 819–823.
 27. d'Apice A. J., Cowan P. J. (2009) Xenotransplantation: The next generation of engineered animals. *Transpl Immunol*. V. 21: P. 111–115.
 28. Dai Y., Vaught T. D., Boone J. et al. (2002) Targeted disruption of the alpha1,3-galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature Biotechnology*. V. 20: P. 251–255.

29. de Koning D. J., Archibald A., Haley C. S. (2007) Livestock genomics: bridging the gap between mice and men. *Trends Biotechnol.* V. 25: P. 483–489
30. Delacote F., Perez C., Guyot V. et al. (2013) High frequency targeted mutagenesis using engineered endonucleases and DNA-end processing enzymes. *PLoS one.* V. 8 (1): e53217.
31. Dougherty D. C., Sanders M. M. (2005) Estrogen action: revitalization of the chick oviduct model. *Trends EndocrinolMetab.* V. 16: P. 414–419.
32. Dyck M. K., Lacroix D., Pothier F., Sirard M. A. (2003) Making recombinant proteins in animals — different systems, different applications. *Trends in Biotechnology.* V. 21 (9): P. 394–409.
33. Ebert K. M., Low M. J., Overstrom E. W. et al. (1988) Moloney MLV-rat somatotropin fusion gene produces biologically active somatotropin in a transgenic pig. *MolEndocrinol.* V. 2 (3): P. 277–83.
34. Furlan-Magaril M., Rebollar E., Guerrero G. et al. (2011) An insulator embedded in the chicken β -globin locus regulates chromatin domain configuration and differential gene expression. *Nucleic Acids Res.* V. 39(1): P. 89–103.
35. Gandolfi F., Lavitrano M., Camaioni A. et al. (1989) The use of sperm-mediated gene transfer for the generation of transgenic pigs. *J. Reprod. Fert.* V. 81: P. 23–28.
36. Gandolfi F. (1998) Spermatozoa, DNA binding and transgenic animals. *Trans. Res.* V. 7: P. 147–155.
37. Garrels W., Mates L., Holler S. et al. (2010). Generation of transgenic pigs by the Sleeping Beauty transposition in zygotes. *Reprod. Dom. Anim.* V. 45: P. 65
38. Ghazizadeh S., Harington R., Taichmann L. (1999) In vivo transduction of mouse epidermis with recombinant retroviral vectors: implications for cutaneous gene therapy. *Gene Ther.* V. 7: P. 1267–1275.
39. Gordon, J. W., Scangos, D. J., Plotkin, J. A. et al. (1980) Genetic transformation of mouse embryos by microinjection of purified DNA (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 77: P. 7380–7384.
40. Grosse-Hovest L., Hartlapp I., Marwan W. et al. (2003) A recombinant bispecific single-chain antibody induces targeted, supra-agonistic CD28-stimulation and tumor cell killing. *Eur J Immunol.* V. 33 (5): P. 1334–1340.
41. Grosse-Hovest L., Müller S., Minoia R. et al. (2004) Cloned transgenic farm animals produce a bispecific antibody for T cell-mediated tumor cell killing. *Proc Natl Acad Sci.* V. 101 (18): P. 6858–6863.
42. Grosse-Hovest L., Wick W., Minoia R. et al. (2005) Supraagonistic, bispecific single-chain antibody purified from the serum of cloned, transgenic cows induces T-cell-mediated killing of glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Int J Cancer.* V. 117 (6): P. 1060–1064.
43. Hai T., Teng F., Guo R. et al. (2014) One-step generation of knockout pigs by zygote injection of CRISPR/Cas system. *Cell Res.* V. 24: P. 372–375. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1038/cr.2014.11.
44. Hammer R., Pursel V., Rexroad J. et al. (1985) Production of trans-genie rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature.* V. 315: P. 680–683.
45. Harrison M. M., Jenkins B. V., O'Connor-Giles K. M., Wildonger J. A (2014) CRISPR view of development. *Genes & Dev.* V. 28: P. 1859–1872. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI: 10.1101/gad.248252.114.
46. Harvey A. J., Speksnijder, Baugh L. R. et al. (2002) Expression of exogenous protein in G. the egg white of transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.* V. 20: P. 396–399.
47. Haskell R., Bowen R. (1995) Efficient production of transgenic cattle by retroviral infection of early embryos. *Mol. Reprod. Dev.* V. 40 (3): P. 386–390
48. Hauschild J., Petersen B., Santiago Y., et al. (2011) Efficient generation of a biallelic knockout in pigs using zincfinger nucleases. *Proc Natl Acad Sci.* V. 108: P. 12013–12017.
49. Heo Y., Quan X., Xu Y. et al. (2014) CRISPR/Cas9 nuclease-mediated gene knock-in in bovine pluripotent stem cells and embryos. *Stem Cells Dev.* Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1089/scd.2014.0278.
50. Hofmann A., Kessler B., Ewerling S. et al. (2003) Efficient transgenesis in farm animals by lentiviral vectors. *EMBO Rep.* V. 4 (11): P. 1054–1060. DOI: 10.1038/sj.embor.7400007.
51. Hofmann A., Kessler B., Ewerling S. et al. (2006) Epigenetic regulation of lentiviral transgene vectors in a large animal model. *MolTher.* V. 13: P. 59–66.
52. Hofmann A., Zakhartchenko V., Weppert M. et al. (2004) Generation of transgenic cattle by lentiviral gene transfer into oocytes. *Biol. Reprod.* V. 71 (2): P. 405–409.
53. Horii T., Arai Y., Yamazaki M. et al. (2014) Validation of microinjection methods for generating knockout mice by CRISPR/Cas-mediated genome engineering. *Scientific Rep.* V.4: P.4513. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI: 10.1038/srep04513.
54. Houdebine L. (2009) Production of pharmaceutical proteins by transgenic animals. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases.* V. 32: P. 107–121.
55. Iqbal K., Barg-Kues B., Broll S. et al. (2009). Cytoplasmic injection of circular plasmids allows targeted expression in mammalian embryos. *BioTechniques.* V. 47: P. 959–968.
56. Ivarie R. (2003) Avian transgenesis: progress towards the promise. *Trends Biotechnol.* V. 21: P. 14–19
57. Ivics Z., Hackett P. B., Plasterk R. H., Izsvák Z. (1997) Molecular reconstruction of Sleeping Beauty, a Tc1-

- 616 like transposon from fish, and its transposition in human cells. *Cell*. V. 91: P. 501–510.
58. Jacobsen J. C., Bawden C. S., Rudiger S. R. et al. (2010) An ovine transgenic Huntington's disease model. *Hum Mol Genet*. V. 19: P. 1873–1882.
 59. Jahner D., Jaenisch R. (1985) Retrovirus-induced de novo methylation of flanking host sequences correlates with gene inactivity. *Nature*. V. 315: P. 594–597.
 60. Jim K. (2009) First US approval for a transgenic animal drug. *Nature Biotechnology*. V. 27 (4): P. 302–304.
 61. Kamihira M., Ono K., Esaka K. et al. (2005) High-Level Expression of Single-Chain Fv-Fc Fusion Protein in Serum and Egg White of Genetically Manipulated Chickens by Using a Retroviral Vector. *J. Virol*. V. 79 (17): P. 10864–10874.
 62. Kues W.A., Garrels W., Mates L. et al. (2010) Production of transgenic pigs by the Sleeping Beauty transposon system. *Transgenic Research*. V. 19: P. 336.
 63. Kues W.A., Niemann H. (2011) Advances in farm animal transgenesis. *Prev Vet Med*. V. 102: P. 146–156. doi: 10.1016/j.prevetmed.2011.04.009.
 64. Klymiuk N., Böcker W., Schönitzer V. et al. (2012) First inducible transgene expression in porcine large animal models. *The FASEB Journal*. V. 26 (3). P. 1086–1099.
 65. Kodama D., Nishimiya D., Nishijima K. et al. (2012) Chicken oviduct-specific expression of transgene by a hybrid ovalbumin enhancer and the Tet expression system. *J Biosci Bioeng*. V. 113 (2): P. 146–53.
 66. Kolber-Simonds D., Lai L., Watt S. R. et al. (2004) Production of alpha-1,3-galactosyltransferase null pigs by means of nuclear transfer with fibroblasts bearing loss of heterozygosity mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. V. 101 (19): P. 7335–7340.
 67. Kuroiwa Y., Kasinathan P., Choi Y. J. et al. (2002) Cloned transchromosomal calves producing human immunoglobulin. *Nat Biotechnol*. V. 20: P. 889–894.
 68. Kwon M. S., Koo B. C., Choi B. R. et al. (2008) Generation of transgenic chickens that produce bioactive human granulocyte-colony stimulating factor. *Molecular Reproduction and Development*. V. 75: P. 1120–1126.
 69. Kwon S. C., Choi J. W., Jang H. J. et al (2010) Production of biofunctional recombinant human interleukin 1 receptor antagonist (rhIL1RN) from transgenic quail egg white. *Biology of Reproduction*. V. 82: P. 1057–1064.
 70. Lai L., Kolber-Simonds D., Park K. W. et al. (2002). Production of alpha-1,3-galactosyltransferase knockout pigs by nuclear transfer cloning. *Science*. V. 295(5557): P. 1089–1092.
 71. Lassnig C., Mueller M. (2013) Disease-Resistant Transgenic Animals. In: Christou P. et al. (eds.), *Sustainable Food Production*, Springer Science+Business Media New York. P. 747–760. Cited 10.04.2015.
 72. Lee S, Park H, Kong I, Wang Z (2013) 30 a transcription activatorlike effector nuclease (Talen)-mediated universal gene knock-in strategy for mammary glands-specific expression of recombinant proteins in dairy cattle. *ReprodFertil Dev*. V. 26: P. 129–129
 73. Lillico S. G., A. Sherman M. J. McGrew C. D. et al. (2007) Oviduct-specific expression of two therapeutic proteins in transgenic hens. *PNAS*. V. 104 (6): P. 1771–1776.
 74. Luo Y., Lin L., Bolund L., Jensen T. G., Sørensen C. B. Genetically modified pigs for biomedical research // *J Inherit Metab Dis.*, 2012, 35 (4), p. 695–713.
 75. Maione B., Lavitrano M., Spadatoro C., Kiessling A. A. (1998) Sperm-mediated gene transfer in mice. *Mol. Reprod. Dev*. V. 50: P. 406–409.
 76. Mali P., Yang L., Esvelt K. M. et al. (2013) RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*. V. 339: P. 823–826.
 77. McCreath K. J., Howcroft J., Campbell K. H. et al. (2000) Production of genetargeted sheep by nuclear transfer from cultured somatic cells. *Nature*. V. 405: P. 1066–1069.
 78. McGrew M. J., Sherman A., Ellard F. M. et al. (2004) Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep*. V. 5: P. 728–733.
 79. Melo E. O., Canavessi A. M., Franco M. M., Rumpf R. (2007) Animal transgenesis: state of the art and applications. *J. Appl. Genet*. V. 48 (1). P. 47–61.
 80. Miller J. C., Tan S, Qiao G. et al. (2011) A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat Biotechnol*. V. 29 (2): P. 143–148.
 81. Miyahara D., Mori T., Makino R. et al. (2014) Culture Conditions for Maintain Propagation, Long-term Survival and Germline Transmission of Chicken Primordial Germ Cell-Like Cells *J. Poult. Sci*. V. 51: P. 87–95
 82. Moghaddassi S., Eyestone W., Bishop C. E. (2014) TALEN-mediated modification of the bovine genome for large-scale production of human serum albumin. *PLoS One*. V. 9 (2): e89631.
 83. Mozdziak P. E., Borwornpinyo S., McCoy D. W., Petite J. N. (2003) Development of transgenic chickens expressing bacterial betagalactosidase. *Dev. Dyn*. V. 226: P. 439–445.
 84. Mozdziak P. E., Petite J. N. (2004) Status of transgenic chicken models for developmental biology. *Dev. Dyn*. V. 229: P. 414–421.
 85. Muramatsu T., Mizutani Y., Ohmori Y., Okumura J. (1997) Comparison of three nonviral transfection methods for foreign gene expression in early chicken embryos in ovo. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. V. 230: P. 376–380.
 86. Nakamura Y. Kagami H., Tagami T. (2013) Development, differentiation and manipulation of chick germ cells *Develop. Growth Differ*. V. 55: P. 20–40.

87. Ni W., Qiao J., Hu S. et al. (2014) Efficient Gene Knockout in Goats Using CRISPR/Cas9 System. *PLoS ONE*. V. 9 (9): e106718. Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1371/journal.pone.0106718.
88. Palmiter R.D., Brinster R.L., Hammer R.E. et al. (1982) Dramatic growth of mice that develop from eggs micro-injected with metallothionein-growth hormone fusion gene. *Nature*. V. 300: P. 611–615.
89. Palmiter R., Sandgren E., Avarbock M. et al. (1991) Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice. *PNAS USA*. V. 88: P. 478–482.
90. Phelps C.J., Koike C., Vaught T.D. et al. (2003) Production of alpha 1,3-galactosyltransferase-deficient pigs. *Science*. V. 299 (5605): P. 411–414.
91. Perry A.C.F., Wakayama T., Kishikawa H. et al. (1999) Mammalian transgenesis by intracytoplasmic sperm injection. *Science*. V. 284: P. 1180–1183.
92. Perry A.C., Rothman A., de las Heras J.I. et al. (2001) Efficient metaphase II transgenesis with different transgene archetypes. *Nat Biotechnol*. V. 19: P. 1071–1073.
93. Porteus M.H., Carroll D. (2005) Gene targeting using zinc finger nucleases. *Nat Biotech*. V. 23: P. 967–973.
94. Pursel V.G., Hammer R.E., Bolt D.J. et al. (1990) Integration, expression and germ-line transmission of growth-related genes in pigs. *J Reprod Fertil Suppl*. V. 41: P. 77–87.
95. Raju T.S., Briggs J.B., Borge S.M., Jones A.J. (2000) Species-specific variation in glycosylation of IgG: evidence for the species-specific sialylation and branch-specific galactosylation and importance for engineering recombinant glycoprotein therapeutics. *Glycobiology*. V. 10: P. 477–486.
96. Rapp J.C., Harvey A.J., Speksnijder G.L. et al. (2003) Biologically active human interferon a-2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res*. V. 12: P. 569–575.
97. Renner S., Fehlings C., Herbach N. et al. (2010) Glucose intolerance and reduced proliferation of pancreatic beta-cells in transgenic pigs with impaired glucose-dependent insulinotropic polypeptide function. *Diabetes*. V. 59: P. 1228–1238.
98. Rexroad C.E.Jr., Hammer R.E., Behringer R.R. et al. (1990) Insertion, expression and physiology of growth-regulating genes in ruminants. *J Reprod Fertil Suppl*. V. 41: P. 119–124.
99. Rexroad C.E.Jr., Hammer R.E., Bolt D.J. et al. (1989) Production of transgenic sheep with growth-regulating genes. *Mol Reprod Dev*. V. 1 (3): 164–169.
100. Richt J.A., Kasinathan P., Hamir A.N. et al. (2007) Production of cattle lacking prion protein. *Nature Biotechnology*. V. 25: P. 132–138.
101. Ritchie W.A., King T., Neil C. et al. (2009) Transgenic sheep designed for transplantation studies. *Mol. Reprod. Dev*. V. 76: P. 61–64.
102. Rogers C.S., Stoltz D.A., Meyerholz D.K. et al. (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science*. V. 321: P. 1837–1841.
103. Schelander K., Peli J., Small F., Brem G. (1995) Artificial insemination in cattle with DNA-treated sperm. *Anim. Biotechnol*. V. 6: P. 41–50.
104. Schnieke A., Kind A., Ritchie W. et al. (1997) Human factor IX transgenic sheep produced by transfer of nuclei from transfected fetal fibroblasts. *Science*. V. 278: P. 2130–2133.
105. Scott B.B., Lois C. (2005) Generation of tissue-specific transgenic birds with lentiviral vectors. *PNAS*. V. 102 (45): P. 16443–16447.
106. Scott B.B., Velho T.A., Sim S., Lois C. (2010) Applications of avian transgenesis. *ILAR J*. V. 51 (4): P. 353–61.
107. Shimizu M., Losos J.K., Gibbins A.M. (2005) Analysis of an approach to oviduct-specific expression of modified chicken lysozyme genes. *Biochem Cell Biol*. V. 83 (1): P. 49–60.
108. Simons J., Wilmut I., Clark A. et al. (1988) Gene transfer into sheep. *Bio/Technol*. V. 6: P. 179–183.
109. Smith C.A., Roeszler K.N., Sinclair A.H. (2009) Robust and ubiquitous GFP expression in a single generation of chicken embryos using the avian retroviral vector, RCASBP. *Differentiation*. V. 77 (5): P. 473–82.
110. Sommer J.R., Estrada J.L., Collins E.B. et al. (2011) Production of ELOVL4 transgenic pigs: a large animal model for Stargardt-like macular degeneration. *Br J Ophthalmol*. V. 95 (12). P. 1749–1754. doi: 10.1136/bjophthalmol-2011-300417.
111. Sperandio S., Lulli V., Bacci M. et al. (1996) Sperm mediated DNA transfer in bovine and swine species. *Anim. Biotechnol*. V. 7: P. 59–77.
112. Tan W., Carlson D.F., Lancto C.A. et al. (2013) Efficient nonmeiotic allele introgression in livestock using custom endonucleases. *PNAS*. V. 110 (41): P. 16526–16531 Cited 10.04.2015. Access for registered users. DOI:10.1073/pnas.1310478110/-/DCSupplemental.
113. Tyack S.G., Jenkins K.A., O'Neil T.E. et al. (2013) A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Reserch*. V. 22: P. 1257–1264.
114. Wang S., Sun X., Ding F. et al. (2009) Removal of selectable marker gene from fibroblast cells in transgenic cloned cattle by transient expression of Cre recombinase and subsequent effects on recloned embryo development. *Theriogenology*. V. 72: P. 535–541.
115. Wang Y., Zhao S., Bai L. et al. (2013) Expression Systems and Species Used for Transgenic Animal Bioreactors. *BioMed Research International*. V. 2013, Article ID 580463, 9 pages. URL: [http:// dx.doi.org/10.1155/2013/580463](http://dx.doi.org/10.1155/2013/580463).

116. Ward K.A., Nancarrow C.D., Murray J.D. et al. (1989) The physiological consequences of growth hormone fusion gene expression in transgenic sheep. *J. Cell Biochem.* V. 13: P. 164
117. Weiss E. H., Lilienfeld B. G., Muller S. et al. (2009) HLA-E/human beta2-microglobulin transgenic pigs: Protection against xenogeneic human anti-pig natural killer cell cytotoxicity. *Transplantation.* V. 87: P. 35–43.
118. Whitelaw C.B., Radcliffe P.A., Ritchie W.A. et al. (2004) Efficient generation of transgenic pigs using equine infectious anaemia virus (EIAV) derived vector. *FEBS Lett.* V. 571: P. 233–236.
119. Whitworth K.M., Lee K., Benne J.A. et al. (2014) Use of the CRISPR/Cas9 System to Produce Genetically Engineered Pigs from In Vitro-Derived Oocytes and Embryos. *Biology of Reproduction.* V. 91 (3): P. 78–90.
120. Wiedenheft B., Sternberg S.H., Doudna J.A. (2012) RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature.* V. 482: P. 331–338.
121. Wieghart M., Hoover J.L., McGrane M.M. et al. (1990) Production of transgenic pigs harbouring a rat phosphoenolpyruvate carboxykinase-bovine growth hormone fusion gene. *J. Reprod Fertil Suppl.* V. 41: P. 89–96.
122. Wine J.J. (2010) The development of lung disease in cystic fibrosis pigs. *Sci. Transl. Med.* V. 2, 29ps20.
123. Xin J., Yang H., Fan N. et al. (2013) Highly efficient generation of GGTA1 biallelic knockout inbred mini-pigs with TALENs. *PLoS One* 8 (12): e84250.

✿ Информация об авторах

Зиновьева Наталья Анатольевна — д. б. н., академик, директор. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л. К. Эрнста. 142132, Московская область, Подольский р-н, п. Дубровицы, д. 60. E-mail: n_zinovieva@mail.ru.

Волкова Наталья Александровна — д. б. н., заведующая, лаборатория клеточной инженерии. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л. К. Эрнста. 142132, Московская область, Подольский р-н, п. Дубровицы, д. 60. E-mail: natavolkova@inbox.ru.

Багиров Вугар Алиниязович — д. б. н., зав. лабораторией репродуктивной криобиологии. Всероссийский научно-исследовательский институт животноводства им. Л. К. Эрнста. 142132, Московская область, Подольский р-н, п. Дубровицы, д. 60. E-mail: vugarbagirov@mail.ru.

Брем Готтфрид — ординарус. Институт животноводства и генетики, ветеринарно-медицинский университет, Вена, Австрия. E-mail: gottfried.brem@agrobiogen.de.

Zinovieva Natalia Anatolyevna — doctor of biology science, academician, director. The All-Russian research institute of animal husbandry of L. K. Ernst. 142132, Moscow region, Podolsk district, Dubrovitsa, 60. E-mail: n_zinovieva@mail.ru

Volkova Natalya Aleksandrovna — doctor of biology science, head of the laboratory of cellular engineering. The All-Russian research institute of animal husbandry of L. K. Ernst. 142132, Moscow region, Podolsk district, item of Dubrovitsa, 60. E-mail: natavolkova@inbox.ru.

Bagirov Vugar Aliniyazovich — doctor of biology science, head of the laboratory of a reproductive cryobiology. The All-Russian research institute of animal husbandry of L. K. Ernst. 142132, Moscow region, Podolsk district, item of Dubrovitsa, 60. E-mail: vugarbagirov@mail.ru.

Brem Gottfried — University of Veterinary Medicine, Vienna Veterinaerplatz 1, 1210 Vienna, Austria. E-mail: gottfried.brem@agrobiogen.de.