

PRECÍZIÓS NEMESÍTÉSI ELJÁRÁSOK ALKALMAZÁSA A FENNTARTHATÓ ÉS FELELŐS ÁLLATTENYÉSZTÉS ELŐSEGÍTÉSÉRE

LÁZÁR BENCE - GÓCZA ELEN

ÖSSZEFOGLALÁS

Az állattenyésztés célja többek között a háziállatok szelektív keresztezésével a betegségekkel szembeni rezisztenciával, jobb termékenységgel, hosszú élettartammal rendelkező, a takarmányforrásokat jobban felhasználó tenyészállatok létrehozása. Az új generációs genomszerkesztési eljárások lehetővé teszik a célzott szelekciót és a szelekciós idő lerövidítését. A precíziós genomszerkesztési technikák, mint a cink-ujj nukleázok, a TALEN és a CRISPR/Cas9 segítségével pontosan tervezhető a génszerkesztés helye, és jóval hatékonyabban lehet célzott genetikai változtatásokat létrehozni, mint a hagyományos génmódosítási eljárásokkal. Haszonállatok esetén is ezek a módszerek a legelterjedtebbek, ha a cél specifikus genomi módosítások létrehozása. A genomszerkesztés területén azonban számos technológiai, etikai és jogalkotási kérdés is felvetődik. Ahhoz, hogy ezt az új technológiát aggályok nélkül lehessen alkalmazni és az Európai Unió jogi környezetben is változás következhesen be, elengedhetetlen a genomeditálási technológiák további alapos vizsgálata és tökéletesítése, valamint a folyamatos és hatékony párbeszéd is. Jelen munkában jellemezzük a precíziós nemesítés során alkalmazott módszereket, áttekintjük a technológia helyét napjaink állattenyésztésében és példákkal szemléltetjük a felhasználási módokat, lehetőségeket.

SUMMARY

Lázár, B. – Gócza, E.: THE USE OF PRECISION BREEDING TECHNIQUES TO PROMOTE SUSTAINABLE AND RESPONSIBLE LIVESTOCK PRODUCTION

The aim of animal husbandry is to produce animals with improved disease resistance, fertility, longevity and better use of feed resources by selective cross-breeding. New genome editing techniques allow targeted selection and shorter selection times. Methods such as zinc finger nucleases, TALEN and CRISPR/Cas9 can be used to precisely plan the location of gene editing and to create targeted genetic changes much more efficiently than conventional gene-editing techniques. These methods are also the most widely used in farm animals when the aim is to create specific genomic modifications. However, a number of technological, ethical and legislative issues arise in the field of genome editing. In order to ensure that this new technology can be used without concern and that the legal environment in the European Union changes, further thorough investigation and refinement of genome editing technologies is essential, as is a continuous and effective dialogue. In this paper, we describe the methods used in precision breeding, review the place of the technology in today's livestock production and illustrate its uses and potential with examples.

BEVEZETÉS

Az CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló genomszerkesztési módszerek fejlesztése forradalmasította a precíziós nemesítés területét, és lehetővé tette a haszonállatok genomjának sokkal egyszerűbb és hatékonyabb módosítását (Urnov és mtsai, 2010; Joung és Sander, 2013; Laible és mtsai, 2015; Georges és mtsai, 2019). A CRISPR technológiát először 2013-ban alkalmazták sikeresen emlős sejtekben (Cong és mtsai, 2013), majd azóta is széles körben használják különböző sejtvo-nalakban és emlős fajokban egyaránt, ideértve a haszonállatokat is. A technológia segítségével javítani tudjuk a haszonállatok termelési tulajdonságait, egészségét és jólétét, egyre fejlettebb humán betegségmodelleket tudunk létrehozni, valamint termeltethetünk gyógyszerfehérjéket is az így létrehozott állatokban. A módszer jelentőségét jól mutatja, hogy csupán 8 évvel a kifejlesztése után 2020-ban Jennifer Doudna és Emmanuelle Charpentier kémiai Nobel-díjat kaptak érte.

A precíziós genomszerkesztési technikák, mint a cink-ujj nukleázok (ZFN, *Zinc Finger Nucleases*), transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleázok (TALEN, *Transcription Activator-Like Effector Nucleases*) és a halmazottan előforduló, szabályos közzel elválasztott palindromikus ismétlődések (CRISPR, *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) segítségével pontosan tervezhető a génszerkesztés helye, és jóval hatékonyabban lehet célzott genetikai változta-tásokat létrehozni, mint a hagyományos génmódosítási eljárásokkal. Az utóbbi években a CRISPR-alapú genomszerkesztés hatékonyságát sikerült megnövelni, így napjainkban a technológia lehetővé teszi akár többszörös módosítások egy-szerre történő elvégzését is (Georges és mtsai, 2019). Haszonállatok esetén is ez a módszer a legelterjedtebb, ha a cél specifikus genomi módosítások létrehozása.

A témát kísérő kitüntetett figyelemnek és az alkalmazásokban rejlő nagy le-hetőségeknek köszönhetően a befektetők világszerte támogatják a technológia fejlesztését, így az új CRISPR/Cas9-alapú eszközök listája folyamatosan bővül. A genomszerkesztés területén azonban számos technológiai, etikai és jogalkotási kérdés is felvetődik. Ahhoz, hogy ezt az új technológiát aggályok nélkül lehessen alkalmazni és az Európai Unió - egyelőre főként tiltó - jogi környezetben is változás következhesse be, elengedhetetlen a genomeditálási technológiák további ala-pos vizsgálata és tökéletesítése, valamint a folyamatos és hatékony párbeszéd is.

KEZDETI LÉPÉSEK

Az 1970-es években a *restrikciós endonukleázok* megjelenése jelentette az első mérföldkövet a DNS szerkesztésében. Ezek az enzimek 4-8 bázispár hosszúságú szekvenciákat ismernek fel, így nem alkalmasak a teljes genom precíziós szer-kesztésre, azonban képesek rövidebb DNS szekvenciákat célzottan hasítani, így megalapozták a molekuláris klónozást (Cohen és mtsai, 1973).

A következő nagy horderejű felfedezés a *homológ rekombináció* (HR) célzott szekvencia bevitelre történő felhasználása volt, amelyet 1985-ben már emlős sej-tekben is sikeresen alkalmaztak (Smithies és mtsai, 1985). A rekombináció alapjául szolgáló kettős szálú DNS törés ebben az esetben véletlenszerűen történik meg, így a módszer hatékonysága rendkívül alacsony. További probléma, hogy sok esetben a donor DNS a genom nem célzott részeire is beépül (akár hatékonyabban, mint

a célzott részekre) (Lin és mtsai, 1985). Hátrányai ellenére lényeges lépcsőfok volt a precíziós módosítások fejlesztésében, mert először adott lehetőséget célzott génbevitelre, ezzel alapjaiban változtatva meg a genetikai kutatásokat.

SZERKESZTÉS MÓDOSÍTOTT NUKLEÁZOKKAL

A következő lépés annak az igénynek a kielégítése volt, hogy helyspecifikusan lehessen kettős szálú DNS törést előidézni, mert ez nagyban növelné a hatékonyságot. Ezt ún. *meganukleázokkal* érték el, melyek felismerő helye a restriktációs endonukleázokénál nagyobb (14-40 bázispár), így akár teljes genomokban is használhatók a specifikusabb hasításnak köszönhetően (Rouet és mtsai, 1994). Rendkívül sok meganukleáz azonosítottak, azonban kevés nukleáz rendelkezett olyan célszekvenciával, amely valóban hasznosítható volt a kívánt módosítások elvégzésére. A célszekvenciák módosítása ugyan lehetséges, de bonyolultnak és drágának bizonyult, így a módszerrel elérhető szekvenciák és élőlények száma korlátozott maradt (Rosen és mtsai, 2006; Seligman és mtsai, 2002). Ezek a természetben megtalálható nukleázok módosításával előállított endonukleázok tekinthetők a „*dizájner*” nukleázok első generációjának.

A Fokl restriktációs endonukleáz DNS-hasító doménjének és cink-ujj motívumoknak a fúziója jelentette a következő jelentős mérföldkövet. A cink-ujj motívumok DNS-kötő domének, melyek egy három bázispáros tripletet képesek felismerni. Több ilyen motívum összefűzésével szekvencia-specifikus DNS felismerés válik lehetővé. Ha ezt összekapcsoljuk a Fokl DNS-hasító doménnel *cink-ujj nukleázokat* (ZFN) kapunk (Kim és mtsai, 1996). A Fokl nukleázok működéséhez a dimerizáció elengedhetetlen, így a DNS minkét szálára a megfelelő távolságban ZFN-ek tervezése szükséges. Ha megtörténik a dimerizáció a nukleáz képes kettős szálú DNS törést előidézni. A cink-ujj nukleázok elterjedése és folyamatos fejlesztése a korábbiakhoz képest jóval több szekvencia megcélzását és ezáltal precíz módosítások elvégzését tette lehetővé. Mindazonáltal a ZFN-ek áttervezése új célszekvenciára drága és meglehetősen komplikált folyamat. A hatékony működés minden esetben optimalizációs lépéseket is igényelt, illetve a cink-ujj domének szekvencia specifitása attól is függ, hogy milyenek a szomszédos domének, ezzel tovább bonyolítva a folyamatot.

A *Xanthomonas* növényi patogén baktériumokban felfedezett TALE fehérjék segítettek a precíziós genomszerkesztés módszertanának továbbfejlesztésében (Moscou és Bogdanove, 2009; Boch és mtsai, 2009). A TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*, transzkripció aktivátor-szerű effektor nukleáz) megjelenésével a DNS szekvencia felismerésének pontossága fejlődött. A TALEN DNS-kötő doménje három helyett már egy nukleotid pontossággal képes a bázisok felismerésére. A ZFN-nál bemutatott módhoz hasonlóan a felismerő domének sorba kapcsolásával alakítható ki a felismerő régió, majd ezt a Fokl DNS-hasító doménjével fuzionálva egy az eddigieknél sokkal pontosabb eszközt kapunk (Miller és mtsai, 2011; Christian és mtsai, 2010). A TALEN rendszernek számos előnye volt a ZFN-nal szemben: kevesebb optimalizálásra volt szükség, csak 4 felismerő domént kell használni (a ZFN 64 felismerő doménjával szemben), a specifitás nem érzékeny a szekvencia környezetre. A technika fejlesztésével a módszer egyre hatékonyabb lett, de az alapvető nehézségeken (minden célszekvencia esetében

új fehérjét kell létrehozni, amit ráadásul bázisonként kell összerakni) nem lehetett változtatni, így a technika forrás- és munkaigényes maradt.

A CRISPR/CAS9 RENDSZER

1987-ben Ishino és *mtsai* fedeztek fel furcsa ismétlődő szekvenciákat az *Escherichia coli* baktérium genomjában, azonban a funkciójukra még sokáig nem sikerült fényt deríteni. Ugyan a szekvenciákat más baktériumokban is megtalálták, de sokáig az elfogadott állaspont az volt, hogy csupán „junk”, funkció nélküli DNS-ről van szó (*Ishino és mtsai*, 1987). Jóval később 2005-ben sikerült bizonyítani, hogy az ismétlődések között található szekvenciák („*spacerek*”) a virális genomokkal mutatnak nagyfokú egyezést (*Mojica és mtsai*, 2005; *Bolotin és mtsai*, 2005)., és azt is feltételezték, hogy egyfajta vírusokkal szembeni védekező mechanizmus lehet a szerepük (*Makarova és mtsai*, 2006). Pár évvel később ezt sikerült bizonyítani is, illetve egyre részletesebben leírták a bakteriális „immunrendszer” elemeit és működését (*Barrangou és mtsai*, 2007; *Marraffini és Sontheimer*, 2008; *Brouns és mtsai*, 2008; *Garneau és mtsai*, 2010; *Deltcheva és mtsai*, 2011). Összefoglalva: az immunizáció fázisában a virális genomból rövid szakaszok épülnek be a bakteriális genom CRISPR lókuszának ismétlései közé a Cas (CRISPR asszociált fehérje 9) enzimek működésének következtében. Érdekesség, hogy a virális genomszakaszok beépülése időrendben történik, így a lókusz vizsgálatával az is feltárható, hogy a baktérium mikor és milyen vírussal találkozott. Ha ezek után ismételt vírusfertőzés zajlik, fokozódik a Cas fehérjék, a tracrNS-ek (transz-aktiváló CRISPR RNS) és a pre-crRNS-ek átíródása. Utóbbi feldarabolódik és érett crRNS-ek képződnek belőle. Ezt követően a Cas komplexet képez a tracr- és crRNS-ekkel, mely komplex már szekvencia specifikusan tud kötődni a virális DNS-hez és elhasítja azt. Látható, hogy a rendszer egyfajta immunmemóriaként működik és további előnye, hogy örökíthető védelmet biztosít a baktérium utódsejtjei számára is.

2012-ben sikerült bizonyítani, hogy a rendszer effektor fehérjei *in vitro* körülmények között is képesek a DNS hasításra, továbbá lehetséges crRNS spacer szakaszát módosítani, így tetszőleges DNS szekvencia felismerhető és elhasítható (*Jinek és mtsai*, 2012; *Gasiunas és mtsai*, 2012). A rendszer segítségével sikeresen módosították emlős sejtek és állatok genomját is (*Cong és mtsai*, 2013; *Mali és mtsai*, 2013; *Jinek és mtsai*, 2013). A könnyebb alkalmazhatóság kedvéért a tracr- és crRNS-eket összekapcsolták egy kovalens kötéssel, ezt a komplexet guideRNS-nek (gRNS) hívjuk. Ezekkel az eredményekkel a kutatók CRISPR/Cas9 rendszer alapjait fektették le és megnyitották az utat a következő évtized fejlesztései előtt. A korábban bemutatott fehérje-DNS kölcsönhatáson alapuló módszerekkel (meganukleáz, ZFN, TALEN) szemben a CRISPR/Cas9 nagy előnye, hogy a szekvencia felismerés RNS-DNS interakción alapul, továbbá csak a gRNS-en található spacer szekvencia (20 bázis) módosítása szükséges az új célszekvencia kiválasztásához (nincs szükség fehérjemérnökségre). Tehát a korábbi technikákhoz hasonlítva nagyon gyorsan és relatíve olcsón hozhatók létre expressziós konstrukciók, ennek köszönhetően a rendszer rövid idő alatt és széles körben terjedt el számos kutatási területen.

A célzott genommodosítás során a CRISPR/Cas9 rendszer Cas9 fehérjeje tehát szekvencia-specifikus kettős szálú DNS törést idéz elő. A törés javítása során

történhet meg a kívánt módosítás, mely alapvetően két úton valósulhat meg: nem homológ végek összekapcsolása (*Non-Homologous End Joining*, NHEJ) és homológia irányított rekombináció (*Homology-Directed Repair*, HDR) (1. ábra).

A NHEJ esetében hibajavító enzimek végzik a DNS szálak összekapcsolását, mely során az enzim hibázhat, ezzel inszerciákat vagy deléciákat hozva létre. Ha a javítás során nem történik hiba, akkor az adott DNS szakasz újból szubsztrátja lesz a Cas9-gRNS komplexnek, így a vágás és javítás újra megtörténhet, ezzel újabb lehetőséget kínálva a hibázásra. Ezt a módszert gének kiütésére lehet felhasználni, hiszen a hibás javítás eredményeként a leolvasási keret eltolódhat, illetve korai STOP kódok alakulhatnak ki, így a fehérjék funkció veszte következik be (*Cong és mtsai*, 2013; *Mali és mtsai*, 2013; *Jinek és mtsai*, 2013) (1. ábra).

A HDR során egy másik jelenséget használunk ki: a kettős szálú DNS törés javítása a testvérkromatida homológ információ tartalma alapján történik. Ha a rendszerhez főlegben adunk homológ donor DNS szekvenciát, akkor bizonyos esetekben a javítás a testvérkromatidát imitáló donor DNS szekvenciáról történik meg, így beépítve a homológ karok által közrefogott szekvenciát (*Li és mtsai*, 2013). (1. ábra) Egy alternatív felhasználás során a Cas9 hasító képességét kikapcsoljuk (dCas9), így hasítás helyett más fehérjéket (transzkripció aktivátor vagy represszor) irányíthatunk a célszekvenciához ezzel növelve vagy csökkentve a gén expresszióját (*Perez-Pinera és mtsai*, 2013; *Gilbert és mtsai*, 2013). A rendszer alkalmas továbbá epigenetikai módosítások elvégzésére (*Hilton és mtsai*, 2015; *Kwon és mtsai*, 2017; *Kearns és mtsai*, 2015) és fluoreszcens markerek elhelyezésére is (*Ma és mtsai*, 2015; *Knight és mtsai*, 2015).

Az utóbbi években CRISPR/Cas9 rendszerre alapozva jelent meg a „base-editing” technika, mely során egy bázis cseréje lehetséges rendkívül nagy pontossággal. Egy nikáz Cas9 (nCas9) és egy citozin- vagy adenin-deamináz fúziójából álló komplex végzi a cserét a C-ről T-re vagy A-ról G-re (*Komor és mtsai*, 2016; *Gaudelli és mtsai*, 2017). Ennek továbbfejlesztése a „prime-editing” módszer, ebben az esetben már minden bázis cseréje lehetséges kettős szálú DNS törés nélkül. A rendszer egy nikáz Cas9 és egy reverz-transzkriptáz együtteséből áll (*Anzalone és mtsai*, 2019).

A MATE Állatbiotechnológia tanszékének *mtsai* is hatékonyan alkalmazták az új genomeditálási módszereket egéren (*Pálinkás és mtsai*, 2019), illetve nyúlón (*Petheő és mtsai*, 2021; *Hornyik és mtsai*, 2020; *Pintér és mtsai*, 2020).

A különböző technikák főbb jellemzőit, illetve előnyeiket és hátrányait az 1. táblázatban foglaltuk össze.

A PRECÍZIÓS GENOMSZERKESZTÉS HELYZETE AZ ÁLLATTENYÉSZTÉSBEN

A világ növekvő népességének élelmezése érdekében a mezőgazdaság termelékenységének növekedni kell, ezzel párhuzamosan szükségszerű lenne minél fenntarthatóbb módon megvalósítani azt. Ebben a genomeditált haszonállatoknak nagy szerepe lehet, azonban az így előállított állatok és a belőlük készült állati termékek ellenőrzése továbbra is kidolgozatlan. A technológiai áttörések eredményeként a múltban a transzgénikus állatok ellenőrzésére létrehozott szabályozások elavultak és a jelek szerint már nem megfelelőek az új technológiák esetében (*Liu és mtsai*, 2022).

1. ábra: A CRISPR/Cas9 rendszeren alapuló genomszerkesztés módjai
Jiang és Doudna (2017) alapján szerkesztve

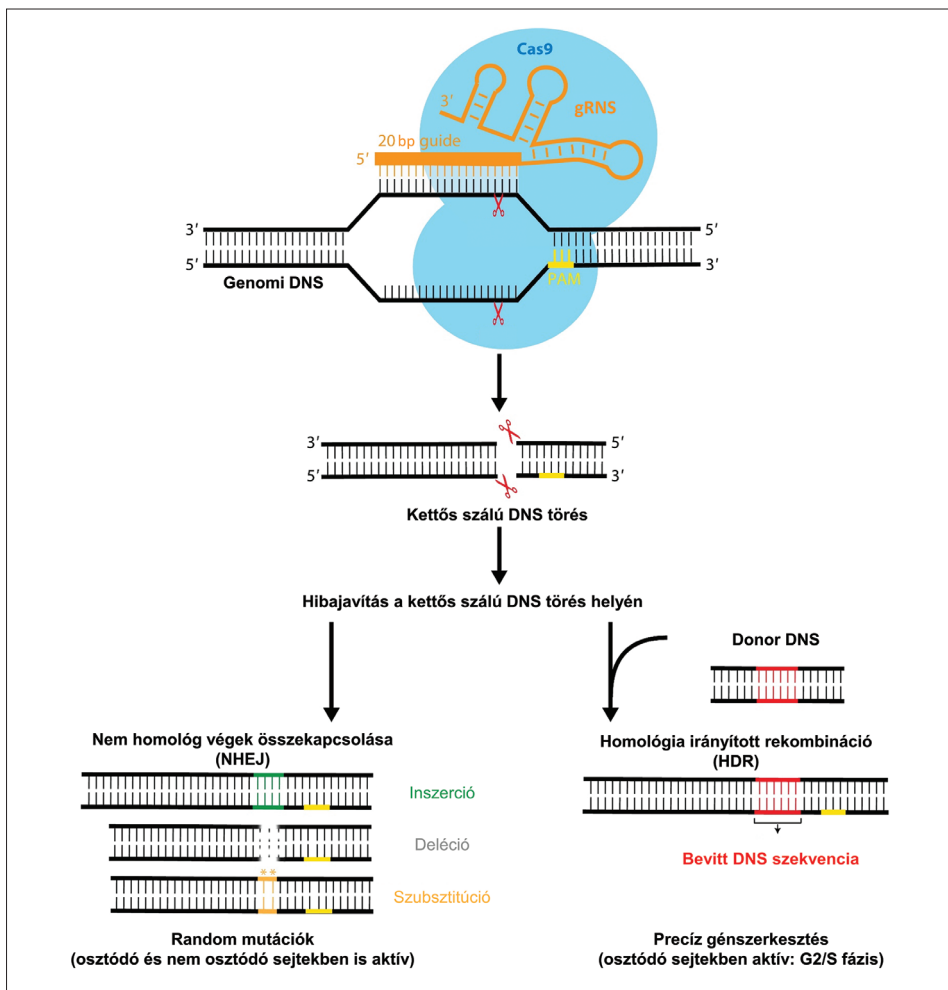


Figure 1. Types of genome editing based on the CRISPR/Cas9 system

Az ember már régóta törekszik az állatok szelektív tenyésztésére. Őseink pl. a temperamentum alapján válogatták az egyedeket, hogy a fogságban való szaporításra alkalmasabbak legyenek. Ma már léteznek olyan technológiák, amelyek lehetővé teszik a mutációk célzott bevitelét, ami nagyobb genetikai változatosságot biztosít az állattenyésztők számára. Bár a kutatói közösség néhány mezőgazdasági alkalmazást már megvalósított, ezek nem kerülhettek át a termelésbe részben a közvélekedés, részben a szabályozások következtében. Úgy tűnik, hogy az új generációs precíziós nemesítési technológiák megjelenésével és fejlődésével enyhülni látszik az eddigi szabályozást jellemző teljes elutasítás.

Világszinten az állattenyésztés számos ágazata, többek között a sertésekkel,

1. táblázat

A precíziós genomszerkesztési módszerek összehasonlítása

Wang és mtsai (2022) alapján szerkesztve

Módszer	Célszekvencia felismerése	Célszekvencia hossza	Előnyök	Hátrányok
cink-ujj nukleázok	cink-ujj fehérje (fehérje-DNS interakció)	monomer: 9-18 bp, pár: 18-36 bp	Első módszer a célzott módosításra	Drága és bonyolult tervezés és létrehozás, fehérjemérnökséget igényel, nem elég hatékony, limitált célszekvencia
TALEN	TALE fehérje (fehérje-DNS interakció)	monomer: 14-20 bp, pár: 28-40 bp	Célszekvencia rugalmasan módosítható, kevés off-target vágás	Az egységek összeállítása komplex molekuláris biológiai módszereket igényel, citotoxicitás, nagy méret miatt nehéz sejtbe juttatás
CRISPR/Cas9	guide RNS (RNS-DNS interakció)	20 bp guide + PAM szekvencia	Olcsó, egyszerűen tervezhető, multiplex módosítás lehetősége	Gyakoribb off-target vágás, homológ rekombináció hatékonysága alacsony

Table 1. Comparison of precision genome editing methods

szarvasmarhákcal és baromfival foglalkozók is nyitnak a technológia felé, igaz egyelőre leginkább az akadémiai közösséggel való együttműködés révén. Remélhetőleg a genomszerkesztett haszonállatok (*Fahrenkrug és mtsai, 2010*), amelyek nem tartalmaznak transzgéneket, idővel utat találnak majd a szabályozási rendszeren keresztül.

Erre kezdeti példákat már találhatunk a világban. Az Egyesült Államok Élelmiszer- és Gyógyszerügyi Hivatala (FDA) 2020-ban engedélyezte a GalSafe™ sertések orvosi és élelmiszeripari felhasználását, így a világon ez az első olyan genommodosított haszonállat, amelyet orvosi alkalmazásokra és emberi fogyasztásra is alkalmasnak ítélték (*U.S. Food and Drug Administration: FDA Approves First-of-Its-Kind Intentional Genomic Alteration in Line of Domestic Pigs for Both Human Food, Potential Therapeutic Uses 2020*). Később 2022-ben az FDA bejelentette, hogy alacsony kockázatú minősítést adott két „PRLR-SLICK” genomszerkesztett húsmarhának és utódainak, beleértve a belőlük előállított termékeket is, miután megállapította, hogy a célzott genetikai módosítás nem vet fel biztonsági aggályokat. Az módosítás hagyományos tenyésztésű szarvasmarhánál is megfigyelhető rövid szőrzetet eredményez, amelyet „slick” szőrzetnek neveznek. Más országokban, mint Argentína, Ausztrália és Brazília, nem szükséges szabályozás, ha a génszerkesztett állatok nem tartalmaznak idegen DNS-t (transzgént) (*Lema, 2019; Thygesen, 2019*).

A genomszerkesztett állatokban rejlő hatalmas potenciál az első lépés lehet a súlyos környezeti és élelmiszerbiztonsági kihívások hosszú távú megoldására. A genomszerkesztési módszerek bevezetésének akadályai, beleértve a közvéleményt és a szabályozási környezetet egyelőre fennállnak, ezek a tényezők azonban változhatnak és talán már jelenleg is változóban vannak. Rendkívül fontos,

hogy a kormányok, a kutatók, a tenyésztők és a fogyasztók képesek legyenek együttműködni és hatékonyan kommunikálni. A DNS-mentes szerkesztési technikák - például a CRISPR/Cas9 rendszer és a base-editing - alkalmazása segíthet a közbizalom elnyerésében.

BETEGSÉGEKKEL SZEMBENI ELLENÁLLÓ KÉPESSÉG JAVÍTÁSA

A genomszerkesztés egyik legfontosabb alkalmazása a haszonállatoknál a kórokozókkal szembeni ellenálló képesség vagy tolerancia javítása. A haszonállatok fertőző betegségei nemcsak hatalmas gazdasági veszteségeket okoznak az állattenyésztési ágazatnak, hanem az emberi egészségre is károsak lehetnek. A betegségekkel szembeni ellenálló képesség összetett és leggyakrabban poligén tulajdonság, így a hagyományos genetikai szelekció alkalmazása költséges, időigényes és nem elég hatékony. Ráadásul a vakcinák és antibiotikumok széles körű alkalmazása bizonyos mértékig visszavetette a betegség-rezisztencia szelekció fejlesztésének sürgősségét. A közelmúltban a genomszerkesztési technológia, különösen a CRISPR/Cas9 által létrehozott precíz módosítás nagymértékben javította a betegségekkel szemben ellenálló állatok tenyésztésének lehetőségeit és hatékonyságát.

A sertés reprodukciós zavarokkal és légzőszervi tünetekkel járó szindrómáját (PRRS, Porcine Reproductive and Respiratory syndrome) vírus okozza és minden évben jelentős károkat okoz az ágazatnak. A PRRS vírus tünetei sokrétűek lehetnek: a sertések minden korcsoportjában légzőszervi betegséget okoznak, illetve a kocákban szaporodási zavarokat is előidéznak. Kártétele azért is lehet ilyen jelentős, mert jól terjed levegő által is, továbbá fokozza más vírusok és baktériumok károsítását (*Whitworth és Prather, 2017*). 2007 óta tudjuk, hogy a vírus a CD163 receptorokon keresztül képes a fertőzésre, majd 2016-ban publikálták az első olyan eredményeket, amelyben a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével kiűtötték a CD163-at sertésekben (*Whitworth és mtsai, 2016*). Az állatok ezt követően nem fertőződtek a vírussal, sőt sem a vírus, sem az ellene termelt antitestek sem voltak kimutathatóak. Ezt követően a világon más csoportok is reprodukálták az eredményeket, szintén pozitív eredményeket kapva (*Wells és mtsai, 2017; Yang és mtsai, 2018; Guo és mtsai, 2019*).

A tuberkulózis egy világszerte vezető egészségügyi probléma, amely egyben zoonózis is. Évente mintegy 1,5 millió ember halálát okozza. A szarvasmarha-tuberkulózis nagy veszélyt jelent az állattenyésztésre, mivel jelenleg nem áll rendelkezésre hatékony stratégia a betegség felszámolására vagy ellenőrzésére. Az egér Sp110 fehérje (Sp110) expressziója fokozza a makrofágok apoptózisát a *Mycobacterium tuberculosis* fertőzésre adott válaszként, és segíti a gazdaszervezet tuberkulózissal szembeni immunitását, ami ígéretes módot kínál a betegség elleni védekezésre. Wu és mtsai sikeresen alkalmazták a TALEN technológiát az egér SP110 génjének a holstein-fríz szarvasmarha genomjába történő beillesztésére. Az gén bejuttatása révén a transzgénikus szarvasmarhák fokozott immunválaszt mutattak a tuberkulózis fertőzéssel szemben (*Wu és mtsai, 2015*).

Házityúkrok esetében több vírus is jelentős károkat okoz világszerte. Az madár-leukózis vírus (AVL, *Avian leukosis virus*) egy retrovírus és általában hosszú lapangási idő után lymphoid daganatokat okoz. Igazolták, hogy a chNHE1 receptor

(Na⁺/H⁺ exchanger isoform 1) felel az AVL vírus bejutásáért és a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével sikerült homozigtóta chNHE1 génkiütött állatokat létrehozni, amelyek rezisztensnek bizonyultak a betegséggel szemben (Koslová és mtsai, 2020). Egy másik jelentős vírus a madárinfluenza vírusa (AIV, Avian influenza virus), mely az ortomixovírusok közé tartozik és szintén hatalmas károkat okoz a baromfi ágazatnak. A CRISPR/Cas9 segítségével sikerült azonosítani és módosítani a chANP32A gént (házityúk Acidic (Leucine-rich) Nuclear Phosphoprotein 32 Family, Member A), melynek következtében jelentősen csökkent a sejtekben a vírus replikáció (Park és mtsai, 2021).

Az említett példák alapján látható, hogy a precíziós génszerkesztés módszerei egy új stratégiát kínálnak az állatállomány betegségekkel szembeni ellenálló-képességének, valamint egészségének javítására.

TERMELÉSI PARAMÉTEREK JAVÍTÁSA

A különböző termelési paraméterek javítása és ezáltal a hatékonyság növelése szintén hozzájárulhat a globális élelmiszerbiztonság és fenntarthatóság támogatásához.

A miosztatin (MSTN), a vázizomzat tömegének negatív szabályozója (McPherron, Lawler és Lee, 1997) a génszerkesztés gyakori célpontja, mivel az MSTN gén kiütése (knock-out, KO) az állattenyésztésben az állatok izomtömeg növelésének elősegítésére kínál stratégiát. Felnőtt szövetekben a miosztatin szinte kizárólag a vázizomzatban fejeződik ki, de a zsírszövetben is kimutatható mennyiségű miosztatin RNS van jelen (Roberts és Goetz, 2003; Lee, 2004). A miosztatin funkcióját génkiütéses vizsgálatokkal tisztázták, amelyekben a miosztatin KO egereknél az izomrostok hiperpláziájának és hipertrofiájának kombinációja következtében a vázizomzat súlya testszerte körülbelül megduplázódik (McPherron és mtsai, 1997). A miosztatin gént számos különböző fajban elemezték, és szekvenciája rendkívül jól konzervált. Az MSTN természetes génmutációiról is beszámoltak néhány szarvasmarhafajtában (Grobet és mtsai, 1997; 1998), juhban (Boman és mtsai, 2009), kutyában (Mosher és mtsai, 2007) és emberben (Schuelke és mtsai, 2004). Ezek az állatok kettős izomtömegű fenotípust mutatnak, drámaian megnövekedett izomtömeggel, ennek ellenére életképesek és termékenyek. Az MSTN gén génszerkesztéssel történő sikeres gátlásáról számoltak be juh, kecske és sertés esetében, ami az állatok növekedési teljesítményének fokozásához vezetett (Han és mtsai, 2014; Ni és mtsai, 2014; Wang és mtsai, 2015).

Egyes vizsgálatokban egyszerre két vagy három gént céloztak meg, ami kettős vagy hármas gén KO-hoz vezetett. Wang és mtsai például a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével MSTN és FGF5 KO kecskéket állítottak elő a hústermelés és a kasmírhozam javítása érdekében (Wang és mtsai, 2015). A fibroblaszt növekedési faktor 5 (FGF5) egy olyan fehérje, amely a szőrnövekedést gátolja a dermális papilla sejtek aktiválódásának blokkolásával. Ez a gén áll az angóra fenotípus (hosszú szőrzet) hátterében. Az MSTN és az FGF5 kiütésének hatékonysága 15%, illetve 21% volt, és az állatok 10%-ánál kettős génkiütés volt tapasztalható.

A tehéntej tápanyagokban gazdag, és az anyatej mellett ideális alternatív tejforrásként szolgál a csecsemők számára. Mivel azonban a csecsemők emésztőrendszere még nem eléggé fejlett, a tehéntejben lévő emésztetlen β -laktoglobulin

(BLG) felszívódhat és a csecsemők immunrendszere kórokozóként azonosítja, ami tejallergiát eredményezhet. Yu és *mtsai* (2011) a BLG génkiütött tehenet állítottak elő, ZFN technikával a BLG antigenitálásának és immunogenitálásának csökkentése érdekében (Yu és *mtsai*, 2011). Ugyanezen célból Zhou és *mtsai* (2017) a CRISPR/Cas9 rendszer segítségével sikeresen hoztak létre BLG génkiütött kecskéket, amelyeknél a BLG expressziója jelentősen alacsonyabb volt az emlőmirigyekben, mint a vad típusú kecskéknél. Ezek a vizsgálatok alternatív módszert kínálnak a tejallergia csökkentésére (Zhou és *mtsai*, 2017).

AZ ÁLLATOK JÓLÉTÉNEK JAVÍTÁSA

A modern állattartásban a szarvasmarhák napi kezelése nagy sérülésveszélyt jelent egymás és a gazdák számára is. A szarvtalanítás stresszel és fájdalommal jár a borjak számára, így állatjóléti szempontból megkérdőjelezhető. A legtöbb húsmarha esetében ismertek a szarvaltságot okozó, természetben előforduló változatok. Egy angus tehen genomjából izolálták ezt a gén variánst, és CRISPR/Cas12a rendszerrel integrálták egy Holstein-fríz bikából alapított fibroblaszt tenyészet sejtjeibe. A módosított fibroblaszt sejtek szolgáltak donorsejtként a szomatikus sejtmagtranszferhez, és az így létrehozott embriókat recipiensekbe ültették át. A szarvtalanságot embrionális korban és egy utódon is sikerült igazolni (Schuster és *mtsai*, 2020).

Bármilyen állatokat érintő területen fontos, hogy minél hatékonyabban állíthassuk elő a kívánt egyedeket, vagy állományt. A genomszerkesztési vizsgálatok során is cél, hogy a módosítást hordozó egyedek létrehozása minél kevesebb kísérleti állat felhasználásával valósuljon meg, így igazodva a 3R szabály alapelveihez.

Házityúkok esetében az embrióból izolálható és *in vitro* tenyészetben hosszú távon sejtvonalként fenntartható (Whyte és *mtsai*, 2015) ősvarsejtek (*primordial germ cells*, PGC) a génmegőrzés legfontosabb sejtjei (Lázár és *mtsai*, 2021). Ezen felül a madár genom szerkesztésének is legkorszerűbb módszere az ősvarsejtek módosítása, majd visszaültetése recipiens embriókba, így hozva létre ivarszervi kimérákat, majd belőlük genomeditált egyedeket (2. ábra/A, B) (Ballantyne és *mtsai*, 2021). A visszaültetéshez steril egyedek lennének a legalkalmasabbak, hiszen így nem lenne kompetíció a donor és recipiens ősvarsejtek között az érett ivarsejtek kialakításában. Ez a kompetíció adja az ősvarsejteken alapuló módszer egyik fő kihívását is: jelenleg a kompetíció következtében a technika hatékonysága alacsony, így a genomszerkesztett egyedek létrehozása során szükséges a nem genomszerkesztett utódok százainak szaporítása is. A módszer hatékonyságának növelése érdekében az endogén ősvarsejtek számát busulfánnal és γ -sugárzással is lehet csökkenteni, azonban ezek a módszerek gyakran az embrió pusztulásához vagy abnormális fenotípushoz vezetnek (Nakamura és *mtsai*, 2010, 2012).

A precíziós genomszerkesztés azonban használható olyan módosítások létrehozására, amelyekkel az endogén ősvarsejtek eltávolíthatók, így a recipiens egyed spermium- vagy petesejt-mentessé tehető (steril recipiens). A közelmúltban két megközelítés is született a steril házityúk recipiensek előállítására: a DDX4 (*DEAD-Box helikáz 4*) ivarsejt-specifikus gén TALEN-mediált kiütésével a nőivar sterilizálását érték el, míg egy másik vizsgálat során a CRISPR/Cas9 rendszert alkalmazták egy indukálható konstrukció bevitelére, amely steril kakasokat és tyúkokat eredménye-

zett. Az általuk létrehozott állományban az ősvarsejtek apoptózisa kémiai úton indukálható, így állítva elő steril embriókat, ezzel jelentősen növelve a donor ősvarsejtek ivarszervbe történő integrációjának hatékonyságát. Az alkalmazott indukálható konstrukció a mitokondriális intrinszik iniciátor kaszpáz (kaspáz-9) dimerizációja, és ezen keresztül „kivégző” kaszpázok (kaspáz-3, -7) aktivációja révén indítja el a sejtek apoptózisát. A konstrukciót a DAZL gén (*Deleted In Azoospermia Like*) utolsó exonjának 3' végébe építették be. A DAZL gén a csíravonal sejteire specifikus, így az indukálható sejthalál is csak az ősvarsejteket érinti. Mindkét modellben csak a donor eredetű ősvarsejtekből képződtek érett ivarsejtek (Taylor és mtsai, 2017; Woodcock és mtsai, 2019; Ballantyne és mtsai, 2021), így donor sejteket hordozó G0 steril recipiens kakasok és tyúkok közvetlen keresztezése egy generáció alatt tiszta genomszerkesztett utódok létrehozásához vezetett.

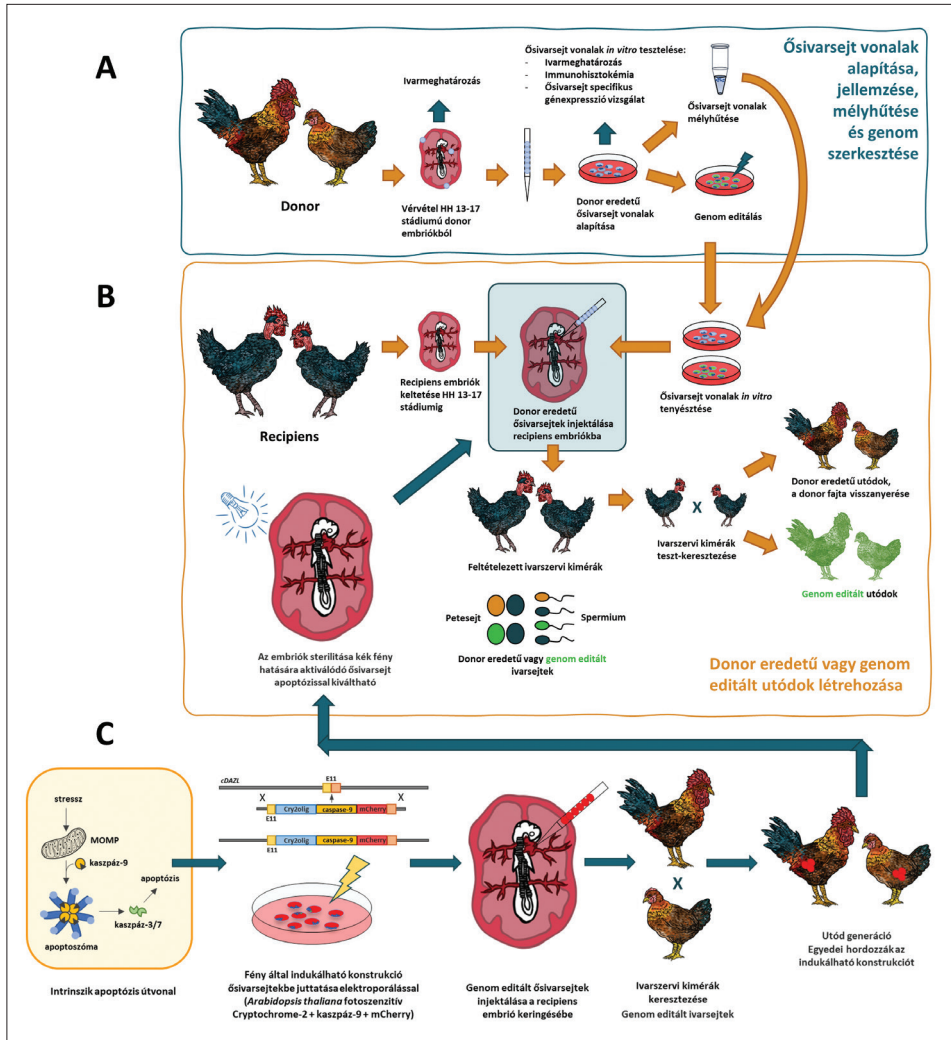
A fenti indukálható módszer kémiai ágenst használ szignálként, azonban a fény által szabályozható folyamatnak számos előnye lenne: gyorsabb és egyszerűbb szignál átadás, precízen kontrollálható inger intenzitás és időtartam, továbbá szükség esetén térben is behatárolható indukció. Humán és egér sejtvonalak, valamint zebrahal esetében már kidolgozták a fényindukciót hasznosító apoptózis módszerét (Shkarina és mtsai, 2022). A konstrukció az *Arabidopsis thaliana* egy fotoszenzitív fehérjéjén a Cryptochrome-2-n (Cry2olig) alapul. Kaspáz effektor domének és a Cry2olig fúziója révén olyan konstrukciókat (optoCaspase-8, -9) hoztak létre, melyek kék fény (450–488 nm) hatására a kaszpáz-8 vagy -9 iniciátor kaszpázok termeltetése révén képesek aktiválni a 'kivégző' kaszpázokat és ezen keresztül elindítani a sejtek apoptózisát.

A Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológia Intézetében jelenleg egy olyan konstrukció kifejlesztésén dolgozunk házityúk ősvarsejt vonalakban, mellyel fényindukció segítségével sejtspecifikusan szabályozhatjuk a cél gének működését (Lázár és mtsai, 2023)(2. ábra/C). A házityúk sejtekben már működő kémiai indukció és a humán, egér, valamint zebrahal esetében leírt fényindukció során alkalmazott konstrukciók ötvöztetésével egy házityúkban is hatékony optogenetikai eszköz fejleszthető ki. A végcél egy a módosítást hordozó indukálhatóan steril állomány, mely hagyományos tenyésztéssel is fenntartható, hiszen, ha az embriók nem kapják meg a speciális fény ingert, az ősvarsejtek fejlődése és vándorlása is zavartalan. Egy ilyen állomány minden további gén-szerkesztett házityúkmodell létrehozáskor nagymértékben növelné az előállítás hatékonyságát. Ennek köszönhetően a genomeditált madarak előállítás kevesebb állat felhasználásával történhet, ezzel támogatva a 3R elveket, továbbá nagyon jól alkalmazható a baromfi fajták vagy veszélyeztetett fajok génbanki megőrzését célzó projektekben is.

KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

Végül szeretnénk felhívni a figyelmet arra, hogy a géntechnológiával módosított állatok és növények társadalmi vitájában kiemelkedő szerepének kell lennie a tudományos tényeknek. A géntechnológia elfogadottságának elősegítésében kulcsfontosságú a tudományos ismeretterjesztés is. Az új tudományos eredmények fényében javasolt rendszeresen felülvizsgálni a magyar törvényhozás géntechnológiával kapcsolatos döntéseit.

2. ábra Az ősvarsejt alapú ivarszeri kiméra technika és genomszerkesztés házityúkban



A = A donor embrió eredetű ősvarsejt vonalak alapítása, *in vitro* tenyésztése, karakterizálása, mélyhűtése és genomszerkesztése. B = A donor eredetű vagy genomszerkesztett ősvarsejtek bejuttatása a recipiens embrióba, így ivarszeri kimérákat hozva létre. Az ivarszeri kimérák keresztezésével visszanyerhető a donor genotípus, vagy a kívánt módosítást hordozó egyedek állíthatók elő. Ha az ősvarsejtek apoptózisa indukálható a recipiens embrióban (steril egyedek), akkor nem lesz kompetíció az injektált és endogén ősvarsejtek között így a rendszer sokkal hatékonyabb lesz. C = A fény által indukálható ősvarsejt apoptózist lehetővé tevő konstrukció, annak bejuttatása az ősvarsejtbe és az így létrehozott steril recipiens állomány.

Figure 1. Primordial germ cell-based germline chimaera technique and genome editing in domestic chickens

A = Establishment, *in vitro* culture, characterization, cryopreservation, and genome editing of primordial germ cell lines of donor embryo origin. B = Injection of donor-derived or genome-engineered primordial germ cells into the recipient embryo to create germline chimaeras. By crossing the gametes, the donor genotype can be recovered or individuals carrying the desired modification can be produced. If apoptosis of the primordial germ cells can be induced in the recipient embryo (sterile individuals), there will be no competition between injected and endogenous primordial germ cells. Thus, making the system much more efficient. C = A construct that allows light-inducible primordial germ cell apoptosis, its introduction into the primordial germ cells, and the resulting sterile recipient stock.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatásokat a GÉNNET21 (VEKOP-2.3.2-16 - 2016-00012), 2019-2.1.11-TÉT-2019-00036 és NKFIH OTKA FK124708 azonosítójú pályázataink, továbbá az Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért című és RRF-2.3.1-21-2022-00007 azonosító számú pályázat támogatták. Az Innovációs és Technológiai Minisztérium ÚNKP-22-4-II kódszámú Új Nemzeti Kiválóság Programjának a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Alapból finanszírozott szakmai támogatásával készült.

IRODALOMJEGYZÉK

- Anzalone, A. V. – Randolph, P. B. – Davis, J. R. – Sousa, A. A. – Koblan, L. W. – Levy, J. M. – Chen, P. J. et al. (2019): Search-and-replace genome editing without double-strand breaks or donor DNA. *Nature*, 576. 149–157.
- Ballantyne, M. – Woodcock, M. – Doddamani, D. – Hu, T. – Taylor, L. – Hawken, R. J. – McGrew, M. J. (2021): Direct allele introgression into pure chicken breeds using sire dam surrogate (SDS) mating. *Nat. Commun.*, 12. 1–10.
- Barrangou, R. – Fremaux, C. – Deveau, H. – Richards, M. – Boyaval, P. – Moineau, S. – Romero, D. A. – Horvath, P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science*, 315. 1709–1712.
- Boch, J. – Scholze, H. – Schornack, S. – Landgraf, A. – Hahn, S. – Kay, S. – Lahaye, T. – Nickstadt, A. – Bonas, U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science*, 326. 1509–1512.
- Bolotin, A. – Quinquis, B. – Sorokin, A. – Dusko Ehrlich, S. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology*, 151. 2551–2561.
- Boman, I. A. – Klemetsdal, G. – Blichfeldt, T. – Nafstad, O. – Våge, D. I. (2009): A frameshift mutation in the coding region of the myostatin gene (MSTN) affects carcass conformation and fatness in Norwegian White Sheep (*Ovis Aries*). *Anim. Gen.*, 40. 418–422.
- Brouns, S. J. J. – Jore, M. M. – Lundgren, M. – Westra, E. R. – Slijkhuys, R. J. H. – Snijders, A. P. L. – Dickman, M. J. – Makarova, K. S. – Koonin, E. V. – Van Der Oost, J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*, 321. 690–964.
- Christian, M. – Cermak, T. – Doyle, E. L. – Schmidt, C. – Zhang, F. – Hummel, A. – Bogdanove, A. J. – Voytas, D. F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186. 757–761.
- Cohen, S. N. – Chang, A. C. Y. – Boyer, H. W. – Helling, R. B. (1973): Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 70. 3240–3244.
- Cong, L. – Ran, F. A. – Cox, D. – Lin, S. – Barretto, R. – Habib, N. – Hsu, P. D. et al. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339. 819–823.
- Deltcheva, E. – Chylinski, K. – Sharma, C. M. – Gonzales, K. – Chao, Y. – Pirzada, Z. A. – Eckert, M. R. – Vogel, J. – Charpentier, E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*, 471. 602–607.
- Fahrenkrug, S. C. – Blake, A. – Carlson, D. F. – Doran, T. – Eenennaam, V. A. – Faber, D. – Galli, C. et al. (2010): Precision genetics for complex objectives in animal agriculture. *J. Anim. Sci.*, 88. 2530–2539.
- Garneau, J. E. – Dupuis, M. È. – Villion, M. – Romero, D. A. – Barrangou, R. – Boyaval, P. – Fremaux, C. – Horvath, P. – Magadán, A. H. – Moineau, S. (2010): The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*, 468. 67–71.
- Gasiunas, G. – Barrangou, R. – Horvath, P. – Siksnys, V. (2012): Cas9-CrRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 109. e2579–e2586.

- Gaudelli, N. M. – Komor, A. C. – Rees, H. A. – Packer, M. S. – Badran, A. H. – Bryson, D. I. – Liu, D. R. (2017): Programmable base editing of T to G C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*, 551. 464–471.
- Georges, M. – Charlier, C. – Hayes, B. (2019): Harnessing genomic information for livestock improvement. *Nat. Rev. Gen.*, 20, 135–156.
- Gilbert, L. A. – Larson, M. H. – Morsut, L. – Liu, Z. – Brar, G. A. – Torres, S. E. – Stern-Ginossar, N. – Brandman, O. – Whitehead, E. H. – Doudna, J. A. – Lim, W. A. – Weissman, J. S. – Qi, L. S. (2013): CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes. *Cell.*, 154. 442–51.
- Grobet, L. – Martin, L. J. R. – Poncelet, D. – Pirottin, D. – Brouwers, B. – Riquet, J. – Schoeberlein, A. et al. (1997): A deletion in the bovine myostatin gene causes the double-muscling phenotype in cattle. *Nat. Gen.*, 17. 71–74.
- Grobet, L. – Poncelet, D. – Royo, L. J. – Brouwers, B. – Pirottin, D. – Michaux, C. – Ménéssier, F. – Zanotti, M. – Dunner, S. – Georges, M. (1998): Molecular definition of an allelic series of mutations disrupting the myostatin function and causing double-muscling in cattle. *Mamm. Gen.*, 9. 210–213.
- Guo, C. – Wang, M. – Zhu, Z. – He, S. – Liu, H. – Liu, X. – Shi, X. et al. (2019): Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Front. Immunol.*, 10. 1846.
- Han, H. – Ma, Y. – Wang, T. – Lian, L. – Tian, X. – Hu, R. – Deng, S. et al. (2014): One-step generation of myostatin gene knockout sheep via the CRISPR/Cas9 system. *Front. Agric. Sci. Eng.*, 1. 2–5.
- Hilton, I. B. – D'Ippolito, A. M. – Vockley, C. M. – Thakore, P. I. – Crawford, G. E. – Reddy, T. E. – Gersbach, C. A. (2015): Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers. *Nat. Biotech.*, 33. 510–517.
- Hornyik, T. – Castiglione, A. – Franke, G. – Perez-Feliz, S. – Major, P. – Hiripi, L. – Koren, G. et al. (2020): Transgenic LQT2, LQT5, and LQT2-5 rabbit models with decreased repolarisation reserve for prediction of drug-induced ventricular arrhythmias. *Br. J. Pharmacol.*, 177. 3744–3759.
- Ishino, Y. – Shinagawa, H. – Makino, K. – Amemura, M. – Nakamura, A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia Coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.*, 169. 5429–5433.
- Jiang, F. – Doudna, J. A. (2017): CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. *Annu. Rev. Biophys.*, 46. 505–529.
- Jinek, M. – Chylinski, K. – Fonfara, I. – Hauer, M. – Doudna, J. A. – Charpentier, E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337. 816–821.
- Jinek, M. – East, A. – Cheng, A. – Lin, S. – Ma, E. – Doudna, J. (2013): RNA-programmed genome editing in human cells. *eLife*, 2:e00471.
- Joung, J. K. – Sander, J. D. (2013): TALENs: A widely applicable technology for targeted genome editing. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.*, 14. 49–55.
- Kearns, N. A. – Pham, H. – Tabak, B. – Genga, R. M. – Silverstein, N. J. – Garber, M. – Maehr, R. (2015): Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion. *Nat. Methods*, 12. 401–403.
- Kim, Y. G. – Cha, J. – Chandrasegaran, S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *fok I* cleavage domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 93. 1156–1160.
- Knight, S. C. – Xie, L. – Deng, W. – Guglielmi, B. – Witkowsky, L. B. – Bosanac, L. – Zhang, E. T. et al. (2015): Dynamics of CRISPR-Cas9 genome interrogation in living cells. *Science*, 350. 823–826.
- Komor, A. C. – Kim, Y. B. – Packer, M. S. – Zuris, J. A. – Liu, D. R. (2016): Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature* 533. 420–424.
- Koslová, A. – Trefil, P. – Mucksová, J. – Reinišová, M. – Plachý, J. – Kalina, J. – Kučerová, D. et al. (2020): Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 117. 2108–2112.

- Kwon, D. Y. – Zhao, Y. T. – Lamonica, J. M. – Zhou, Z. (2017): Locus-specific histone deacetylation using a synthetic CRISPR-Cas9-based HDAC. *Nat. Commun.*, 8. 15315.
- Laible, G. – Wei, J. – Wagner, S. (2015): Improving livestock for agriculture - technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era. *Biotechnol. J.*, 10. 109–120.
- Lázár, B. – Molnár, M. – Sztán, N. – Végi, B. – Drobnyák, Á. – Tóth, R. – Tokodyné Szabadi, N. – McGrew, M. J. – Gócza, E. – Patakiné Várkonyi, E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poult. Sci.*, 100. 101207.
- Lázár, B. – Tóth, R. – Hoffmann, O. I. – Ecker, A. – Urbán, M. – Tokodyné Szabadi, N. – Salinas Aponte, M. T. – Várkonyi, E. – Gócza, E. (2023): Optogenetic approach for creating inducible apoptosis in avian primordial germ cells. In: *Hungarian molecular life sciences 2023 - Book of abstracts*. Edit: Virág, L. – Buday, L. – Juhász, G. – Lontay, B. – Mihály, J. – Sinka, R. – Szakáts, G. – Varga, A. Diamond Congress Ltd., Conference Secretariat, Eger, Hungary
- Lee, S. J. (2004): Regulation of muscle mass by myostatin. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20. 61–86.
- Lema, M. A. (2019): Regulatory aspects of gene editing in Argentina. *Transgenic Res.*, 28. 147–150.
- Li, J. F. – Norville, J. E. – Aach, J. – McCormack, M. – Zhang, D. – Bush, J. – Church, G. M. – Sheen, J. (2013): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9. *Nat. Biotech.*, 31. 688–691.
- Lin, F. L. – Sperle, K. – Sternberg, N. (1985): Recombination in mouse L cells between DNA introduced into cells and homologous chromosomal sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 82. 1391–1395.
- Liu, Z. – Wu, T. – Xiang, G. – Wang, H. – Wang, B. – Feng, Z. – Mu, Y. – Li, K. (2022): Enhancing animal disease resistance, production efficiency, and welfare through precise genome editing. *Int. J. Mol. Sci.*, 23. 7331.
- Ma, H. – Naseri, A. – Reyes-Gutierrez, P. – Wolfe, S. A. – Zhang, S. – Pederson, T. (2015): Multicolor CRISPR labeling of chromosomal loci in human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112. 3002–3007.
- Makarova, K. S. – Grishin, N. V. – Shabalina, S. A. – Wolf, Y. I. – Koonin, E. V. (2006): A Putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct.*, 1. 7.
- Mali, P. – Yang, L. – Esvelt, K. M. – Aach, J. – Guell, M. – DiCarlo, J. E. – Norville, J. E. – Church, G. M. (2013): RNA-guided human genome engineering via Cas9. *Science*, 339. 823–826.
- Marraffini, L. A. – Sontheimer, E. J. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science*, 322. 1843–1845.
- McPherron, A. C. – Lawler, A. M. – Lee, S. J. (1997): Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF- β superfamily member. *Nature*, 387. 83–90.
- Miller, J. C. – Tan, S. – Qiao, G. – Barlow, K. A. – Wang, J. – Xia, D. F. – Meng, X. *et al.* (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nat. Biotech.*, 29. 143–148.
- Mojica, F. J. M. – Díez-Villaseñor, C. – García-Martínez, J. – Soría, E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.*, 60. 174–182.
- Moscou, M. J. – Bogdanove, A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science*, 326. 1501.
- Mosher, D. S. – Quignon, P. – Bustamante, C. D. – Sutter, N. B. – Mellersh, C. S. – Parker, H. G. – Ostrander, E. A. (2007): A mutation in the myostatin gene increases muscle mass and enhances racing performance in heterozygote dogs. *PLoS Gen.*, 3. e79.
- Nakamura, Y. – Usui, F. – Miyahara, D. – Mori, T. – Ono, T. – Kagami, H. – Takeda, K. – Nirasawa, K. – Tagami, T. (2012): X-irradiation removes endogenous primordial germ cells (PGCs) and increases germline transmission of donor PGCs in chimeric chickens. *J. Reprod. Dev.*, 58. 432–37.

- Nakamura, Y. – Usui, F. – Ono, T. – Takeda, K. – Nirasawa, K. – Kagami, H. – Tagami, T. (2010): Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod.*, 83. 130–37.
- Ni, W. – Qiao, J. – Hu, S. – Zhao, X. – Regouski, M. – Yang, M. – Polejaeva, I. A. – Chen, C. (2014): Efficient gene knockout in goats using CRISPR/Cas9 system. *PLoS ONE*, 9. e106718.
- Pálinkás, H. L. – Rácz, G. A. – Gál, Z. – Hoffmann, O. I. – Tihanyi, G. – Róna, G. – Gócsa, E. – Hiripi, L. – Vértessy, B. G. (2019): Crispr/Cas9-mediated knock-out of dutpase in mice leads to early embryonic lethality. *Biomolecules*, 9. 136.
- Park, Y. H. – Woo, S. J. – Chungu, K. – Lee, S. B. – Shim, J. H. – Lee, H. J. – Kim, I. et al. (2021): Asp149 and Asp152 in chicken and human ANP32A play an essential role in the interaction with influenza viral polymerase. *FASEB J.*, 35. e21630.
- Perez-Pinera, P. – Kocak, D. D. – Vockley, C. M. – Adler, A. F. – Kabadi, A. M. – Polstein, L. R. – Thakore, P. I. et al. (2013): RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat. Methods*, 10. 973–976.
- Petheő, G. L. – Kerekes, A. – Mihálffy, M. – Donkó, Á. – Bodrogi, L. – Skoda, G. – Baráth, M. et al. (2021): Disruption of the NOX5 gene aggravates atherosclerosis in rabbits. *Circ. Res.*, 128. 1320–1322.
- Pintér, T. – Geiszt, M. – Petheő, G. L. – Mihálffy, M. – Skoda, G. – Lipták, N. – Kerekes, A. – Bősze, Z. – Hiripi, L. – Bodrogi, L. (2020): The creation of a multiallele knockout genotype in rabbit using Crispr/Cas9 and its application in translational medicine. *Appl. Sci.*, 10. 8508.
- Roberts, S. B. – Goetz, F. W. (2003): Myostatin protein and RNA transcript levels in adult and developing brook trout. *Mol. Cell. Endocrinol.*, 210. 9–20.
- Rosen, L. E. – Morrison, H. A. – Masri, S. – Brown, M. J. – Springstubb, B. – Sussman, D. – Stoddard, B. L. – Seligman, L. M. (2006): Homing endonuclease I-CreI derivatives with novel DNA target specificities. *Nucleic Acids Res.*, 34. 4791–4800.
- Rouet, P. – Smih, F. – Jasin, M. (1994): Introduction of double-strand breaks into the genome of mouse cells by expression of a rare-cutting endonuclease. *Mol. Cell. Biol.*, 14. 8096–8106.
- Schuelke, M. – Wagner, K. R. – Stolz, L. E. – Hübner, C. – Riebel, T. – Kömen, W. – Braun, T. – Tobin, J. F. – Lee, S. J. (2004): Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child. *N. Engl. J. Med.*, 350. 2682–2688.
- Schuster, F. – Aldag, P. – Frenzel, A. – Hädeler, K. G. – Lucas-Hahn, A. – Niemann, H. – Petersen, B. (2020): CRISPR/Cas12a mediated knock-in of the polled celtic variant to produce a polled genotype in dairy cattle. *Sci. Rep.*, 10. 13570.
- Seligman, L. M. – Chisholm, K. M. – Chevalier, B. S. – Chadsey, M. S. – Edwards, S. T. – Savage, J. H. – Veillet, A. L. (2002): Mutations altering the cleavage specificity of a homing endonuclease. *Nucleic Acids Res.*, 30. 3870–3879.
- Shkarina, K. – Hasel de Carvalho, E. – Santos, J. C. – Ramos, S. – Leptin, M. – Broz, P. (2022): Optogenetic activators of apoptosis, necroptosis, and pyroptosis. *J. Cell Biol.*, 221. e202109038.
- Smithies, O. – Gregg, R. G. – Boggs, S. S. – Koralewski, M. A. – Kucherlapati, R. S. (1985): Insertion of DNA sequences into the human chromosomal β -Globin locus by homologous recombination. *Nature*, 317. 230–234.
- Taylor, L. – Carlson, D. F. – Nandi, S. – Sherman, A. – Fahrenkrug, S. C. – McGrew, M. J. (2017): Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Development*, 144. 928–34.
- Thygesen, P. (2019): Clarifying the regulation of genome editing in Australia: Situation for genetically modified organisms. *Transgenic Res.*, 28. 151–159.
- U.S. Food and Drug Administration (2020): FDA approves first-of-its-kind intentional genomic alteration in line of domestic pigs for both human food, potential therapeutic uses.
- Urnov, F. D. – Rebar, E. J. – Holmes, M. C. – Zhang, H. S. – Gregory, P. D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat. Rev. Genet.*, 11. 636–46.
- Wang, K. – Ouyang, H. – Xie, Z. – Yao, C. – Guo, N. – Li, M. – Jiao, H. – Pang, D. (2015): Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 5. 16623.

- Wang, S. – Qu, Z. – Huang, Q. – Zhang, J. – Lin, S. – Yang, Y. – Meng, F. – Li, J. – Zhang, K. (2022): Application of gene editing technology in resistance breeding of livestock. *Life*, 12. 1070.
- Wang, X. – Yu, H. – Lei, A. – Zhou, J. – Zeng, W. – Zhu, H. – Dong, Z. *et al.* (2015): Generation of gene-modified goats targeting MSTN and FGF5 via zygote injection of CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.*, 5. 13878.
- Wells, K. D. – Bardot, R. – Whitworth, K. M. – Tribble, B. R. – Fang, Y. – Mileham, A. – Kerrigan, M. A. – Samuel, M. S. – Prather, R. S. – Rowland, R. R. R. (2017): Replacement of porcine CD163 scavenger receptor cysteine-rich domain 5 with a CD163-like homolog confers resistance of pigs to genotype 1 but not Genotype 2 porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Virol.*, 91. e01521-16.
- Whitworth, K. M. – Prather, R. S. (2017): Gene editing as applied to prevention of reproductive porcine reproductive and respiratory syndrome. *Mol. Reprod. Dev.*, 84. 926–933.
- Whitworth, K. M. – Rowland, R. R. R. – Ewen, C. L. – Tribble, B. R. – Kerrigan, M. A. – Cino-Ozuna, A. G. – Samuel, M. S. *et al.* (2016): Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotech.*, 34. 20–22.
- Whyte, J. – Glover, J. D. – Woodcock, M. – Brzeszczynska, J. – Taylor, L. – Sherman, A. – Kaiser, P. – McGrew, M. J. (2015): FGF, insulin, and SMAD signaling cooperate for avian primordial germ cell self-renewal. *Stem Cell Rep.*, 5. 1171–82.
- Woodcock, M. E. – Gheyas, A. A. – Mason, A. S. – Nandi, S. – Taylor, L. – Sherman, A. – Smith, J. – Burt, D. W. – Hawken, R. – McGrew, M. J. (2019): Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 116. 20930–20937.
- Wu, H. – Zhang, Y. – Wang, Y. – Zhang, Y. – Yang, M. – Lv, J. – Liu, J. (2015): TALE nickase-mediated SP110 knockin endows cattle with increased resistance to tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 112. e1530–e1539.
- Yang, H. – Zhang, J. – Zhang, X. – Shi, J. – Pan, Y. – Zhou, R. – Li, G. – Li, Z. – Cai, G. – Wu, Z. (2018): CD163 knockout pigs are fully resistant to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Antiviral Res.*, 151. 63–70.
- Yu, S. – Luo, J. – Song, Z. – Ding, F. – Dai, Y. – Li, N. (2011): Highly efficient modification of beta-lactoglobulin (BLG) gene via zinc-finger nucleases in cattle. *Cell Res.*, 21. 1638–1640.
- Zhou, W. – Wan, Y. – Guo, R. – Deng, M. – Deng, K. – Wang, Z. – Zhang, Y. – Wang, F. (2017): Generation of beta-lactoglobulin knock-out goats using CRISPR/Cas9. *PLoS ONE*, 12. e0186056.

Érkezett: 2023. szeptember

A szerzők címe: Lázár, B. – Gócza, E.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Szent István Campus, Genetika és Biotechnológia Intézet, Állatbiotechnológia Tanszék

Authors' adress: Hungarian University of Agriculture and Life Science, Szent István Campus, Institute of Genetics and Biotechnology, Animal Biotechnology Department
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert utca. 4.
lazar.bence@uni-mate.hu

Lázár, B.
Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézet
National Centre for Biodiversity and Gene Conservation, Institute for Farm Animal Gene Conservation
H-2100, Gödöllő, Isaszegi utca 200.