

**Generierung ALV-J resistenter Hühner  
mittels Gen-Editierung**

von Romina Chantal Klinger, geb. Hellmich

Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde  
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-  
Universität München

**Generierung ALV-J resistenter Hühner  
mittels Gen-Editierung**

von Romina Chantal Klinger, geb. Hellmich  
aus Ostercappeln  
München 2021

Aus dem Veterinärwissenschaftlichen Department der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Lehrstuhl für Physiologie

Arbeit angefertigt unter der Leitung von: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Mitbetreuung durch: Prof. Dr. Benjamin Schusser

Angefertigt am Wissenschaftszentrum Weihenstephan, Professur für Biotechnologie  
der Reproduktion, Technische Universität München

Mentor: Prof. Dr. Benjamin Schusser

Gedruckt mit der Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Dekan: Univ.-Prof. Dr. Reinhard K. Straubinger, Ph.D.

Berichterstatter: Univ.-Prof. Dr. Bernd Kaspers

Korreferent/en: Univ.-Prof. Dr. Maik Dahlhoff  
Univ.-Prof. Dr. Dr. h. c. Hans-Joachim Gabius

Tag der Promotion: 06.02.2021

Meiner Familie

**INHALTSVERZEICHNIS**

|             |   |           |
|-------------|---|-----------|
| <b>1.</b>   | <b>EINLEITUNG .....</b>   | <b>1</b>  |
| <b>2.</b>   | <b>LITERATURÜBERSICHT .....</b>                                   | <b>2</b>  |
| <b>2.1.</b> | <b>Gen-Editierung beim Huhn.....</b>                              | <b>2</b>  |
| 2.1.1.      | Gentransfer Strategien.....                                       | 2         |
| 2.1.2.      | DNA-Reparaturmechanismen.....                                     | 5         |
| 2.1.3.      | Gen-Editierung mittels sequenzspezifischer Endonukleasen.....     | 6         |
| 2.1.3.1.    | Das CRISPR/Cas9 System.....                                       | 7         |
| <b>2.2.</b> | <b>Aviäres Leukosevirus.....</b>                                  | <b>10</b> |
| 2.2.1.      | Aviäres Leukosevirus J .....                                      | 12        |
| 2.2.1.1.    | Erkrankung und Diagnostik .....                                   | 12        |
| 2.2.1.2.    | ALV-J Rezeptor .....  | 14        |
| 2.2.1.3.    | Ausbreitung und wirtschaftliche Bedeutung.....                    | 15        |
| 2.2.1.4.    | Kontrollstrategien.....   | 16        |
| <b>3.</b>   | <b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT .....</b>                               | <b>18</b> |
| <b>4.</b>   | <b>PUBLIKATION .....</b>  | <b>19</b> |
| <b>5.</b>   | <b>DISKUSSION .....</b>   | <b>32</b> |
| <b>5.1.</b> | <b>Gentechnisch herbeigeführte ALV-J Resistenz.....</b>           | <b>32</b> |
| 5.1.1.      | Modifikation des chNHE1 .....                                     | 32        |
| 5.1.2.      | Gentransfer .....   | 34        |
| 5.1.3.      | Phänotyp.....   | 35        |
| <b>5.2.</b> | <b>Gen-Editierung als virale Kontrollstrategie .....</b>          | <b>36</b> |
| 5.2.1.      | Effektivität.....   | 36        |
| 5.2.2.      | Anwendbarkeit .....   | 38        |
| <b>5.3.</b> | <b>Ausblick: Gen-Editierung in kommerzieller Hühnerzucht.....</b> | <b>39</b> |
| <b>6.</b>   | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>                                      | <b>42</b> |
| <b>7.</b>   | <b>SUMMARY .....</b>  | <b>43</b> |
| <b>8.</b>   | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>                                 | <b>44</b> |
| <b>9.</b>   | <b>DANKSAGUNG .....</b>   | <b>54</b> |

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| -/-                            | bialleler Knockout des Genlokus   |
| +/+                            | unveränderter Genlokus  |
| 3Rs                            | <i>Refinement, Reduction, Replacement</i>                                     |
| A <sup>+</sup> /A <sup>-</sup> | Antikörpertiter   |
| ALSV                           | <i>Avian leukosis/sarcoma group viruses</i>                                   |
| ALV                            | Aviäres Leukosevirus  |
| ALV-J                          | Aviäres Leukosevirus Untergruppe J  |
| bp                             | Basenpaare  |
| Cas                            | CRISPR <i>associated</i>  |
| chNHE1                         | chicken Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Exchanger 1                           |
| CRISPR                         | <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>              |
| crRNA                          | CRISPR-RNA  |
| DNA                            | Desoxyribonukleinsäure, <i>desoxyribonucleic acid</i>                         |
| DSB                            | Doppelstrangbruch   |
| dsDNA                          | <i>double-stranded DNA</i>  |
| eGFP                           | <i>enhanced green fluorescent protein</i>                                     |
| ELISA                          | <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>                                      |
| env                            | Hüllprotein kodierender Lokus, <i>envelope</i>                                |
| G                              | Guanin  |
| gag                            | Gruppen-spezifische Antigene kodierender Lokus, <i>group-specific antigen</i> |
| GMO                            | genetisch modifizierter Organismus  |
| gp37                           | <i>glycoprotein 37</i>  |
| gp85                           | <i>glycoprotein 85</i>  |

---

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| H&H                            | Hamburger und Hamilton   |
| HDR                            | <i>homology directed repair</i>  |
| HPRS                           | <i>houghton poultry research station</i>   |
| HR                             | Homologe Rekombination, homologous recombination                                 |
| HRM                            | <i>high resolution melt Analyse</i>  |
| indels                         | Deletion und Insertion von Nukleotiden   |
| kb                             | <i>kilobase</i>  |
| LSL                            | Lohmann-selected Leghorn   |
| LTR                            | <i>long terminal repeats</i>   |
| ML                             | Myeloide Leukose, <i>myeloid leukosis</i>  |
| mRNA                           | <i>messenger RNA</i>   |
| N                              | beliebige Nukleinbase  |
| NHEJ                           | <i>non homologous end joining</i>  |
| PAM                            | <i>protospacer adjacent motif</i>  |
| PCR                            | Polymerase Kettenreaktion, <i>polymerase chain reaction</i>                      |
| PGC                            | Primordiale Keimzelle, <i>primordial germ cell</i>                               |
| pol                            | Polymerase kodierender Lokus, <i>polymerase</i>                                  |
| pro                            | Protease kodierender Lokus, <i>protease</i>                                      |
| PRRSV                          | <i>porcine reproductive and respiratory syndrome virus</i>                       |
| RCAS                           | <i>replication-competent avian sarcoma-leukosis virus with a splice acceptor</i> |
| RNA                            | Ribonukleinsäure, <i>ribonucleic acid</i>  |
| S <sup>+</sup> /S <sup>-</sup> | Virusausscheidung, <i>viral shedding</i>   |
| sgRNA                          | <i>single guide RNA</i>  |
| SNP                            | <i>single nucleotide polymorphism</i>  |



---

|                                |   |
|--------------------------------|---|
| ssODN                          | <i>single-stranded DNA oligonucleotide</i>            |
| STAGE                          | <i>sperm transfection assisted gene editing</i>       |
| TALEN                          | <i>transcription activator like effector nuclease</i> |
| TGG                            | Thymin, Guanin; W38 kodierende Sequenz                |
| tracrRNA                       | <i>trans-activating RNA</i>                           |
| V <sup>+</sup> /V <sup>-</sup> | Virämie   |
| W38                            | Tryptophan; Position 38                               |
| ZFN                            | Zink Finger Nuclease                                  |
| Δ                              | Deletion  |

---

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

|  |    |
|--|----|
| Abbildung 1. Übersicht wichtiger Gentransfer Strategien im Huhn.....             | 4  |
| Abbildung 2. Schematische Darstellung des Typ II Cas9-guide RNA Komplexes.....   | 9  |
| Abbildung 3. Übertragungswege des ALV-J. ....                                    | 13 |
| Abbildung 4. Aminosäuresequenz des NHE1 Proteins verschiedener Vogelspezies. ... | 15 |

## 1. EINLEITUNG

Das Haushuhn trägt entscheidend zur Versorgung der Bevölkerung mit tierischem Eiweiß bei und stellt daher eines der bedeutendsten landwirtschaftlichen Nutztiere weltweit dar. Einhergehend mit der enormen Intensivierung der Geflügelhaltung in den letzten Jahrzehnten ist das Risiko von Krankheitsausbrüchen ebenfalls deutlich angestiegen und die Anforderungen an den Erhalt der Tiergesundheit und des Tierwohls gewachsen.

Die Untergruppe J der aviären Leukoseviren (ALV-J) verursacht große wirtschaftliche Einbußen in der Geflügelmast und gilt seither als einer der bedeutendsten Vertreter hühnerspezifischer Retroviren. Da bisher noch keine geeignete Prophylaxe- oder Therapiemöglichkeit zur Verfügung steht, stellen intensives Monitoring und Keulung infizierter Hühnerbestände bisher die einzigen Möglichkeiten dar, das Virus einzudämmen. Während dies in westlichen Ländern zur Etablierung ALV-J-freier Zuchtherden verhalf, ist ALV-J weiterhin im asiatischen Raum prävalent.

Neue wissenschaftliche Erkenntnisse spielen im Hinblick auf die Krankheitsprävention eine übergeordnete Rolle, indem ein detailliertes Verständnis des aviären Immunsystems und darüber hinaus Prophylaxe- und Therapiemöglichkeiten erarbeitet werden.

In diesem Zusammenhang kann die Gen-Editierung als eine zukünftige Alternative oder Zusatzmaßnahme zur Impfung und konventionellen Zuchtverfahren angesehen werden. Die Effizienz, Präzision und Praktikabilität der Gen-Editierung konnten insbesondere durch die Verwendung programmierbarer Endonukleasen, wie das CRISPR/Cas9 System, rasant verbessert werden. In Synergie mit einer Vielzahl weiterer biomedizinischer Forschungsbereiche bietet die Biotechnologie nun ein immenses Potenzial für die Grundlagenforschung und zukünftige Konzepte nachhaltiger Tierzucht. Die Erzeugung und Bewertung einer durch Gen-Editierung induzierten Krankheitsresistenz gegenüber ALV-J im Haushuhn ist Gegenstand dieser Arbeit.

## 2. LITERATURÜBERSICHT

### 2.1. Gen-Editierung beim Huhn

Genetisch veränderte Hühner gewinnen als Modellorganismus zunehmend an Bedeutung. Übergeordnete Fragestellungen im Bereich der Prävention von Infektionskrankheiten beinhalten die Identifizierung und Modifizierung von Genen, die an Virus-Rezeptor-Interaktionen beteiligt sind, um Tiergesundheit und Tierwohl zu verbessern. Nach vollständiger Entschlüsselung des Hühnergenoms wurde der Grundstein hierzu durch die Etablierung geeigneter Gen-Targeting und Gentransfer Methoden gelegt [1].

#### 2.1.1. Gentransfer Strategien

Ausgeprägte Unterschiede in der Reproduktionsbiologie zwischen Vogel und Säugetier - vor allem bezüglich der Entwicklungsstadien und Zugänglichkeit der Hühnereizelle - erfordern unterschiedliche Strategien, um genetische Modifikationen *in vivo* zu implementieren. Bevor präzise Gen-Modifikationen und deren Etablierung *in vivo* möglich waren, konnte im Huhn ausschließlich die Transgenese - das Einbringen von exogener DNA an einen zufälligen Locus - durchgeführt werden. Die ersten transgenen Hühner wurden mithilfe viraler Vektorsysteme, die sich von aviären Leukoseviren oder Lentiviren ableiteten, generiert [2-4] (Abbildung 1A). Hierbei nutzte man die Eigenschaft der stabilen Integration proviraler DNA in das Wirtsgenom, um das erwünschte Transgen einzuschleusen.

Nachteile dieser Technologie sind die Erzeugung genetischer Mosaik, das Risiko einer Rekombination zwischen Vektor- und Feldvirus, sowie die limitierte Kapazität hinsichtlich der Größe des einzubringenden Transgens. Außerdem ist keine sequenzspezifische Gen-Editierung möglich [1].

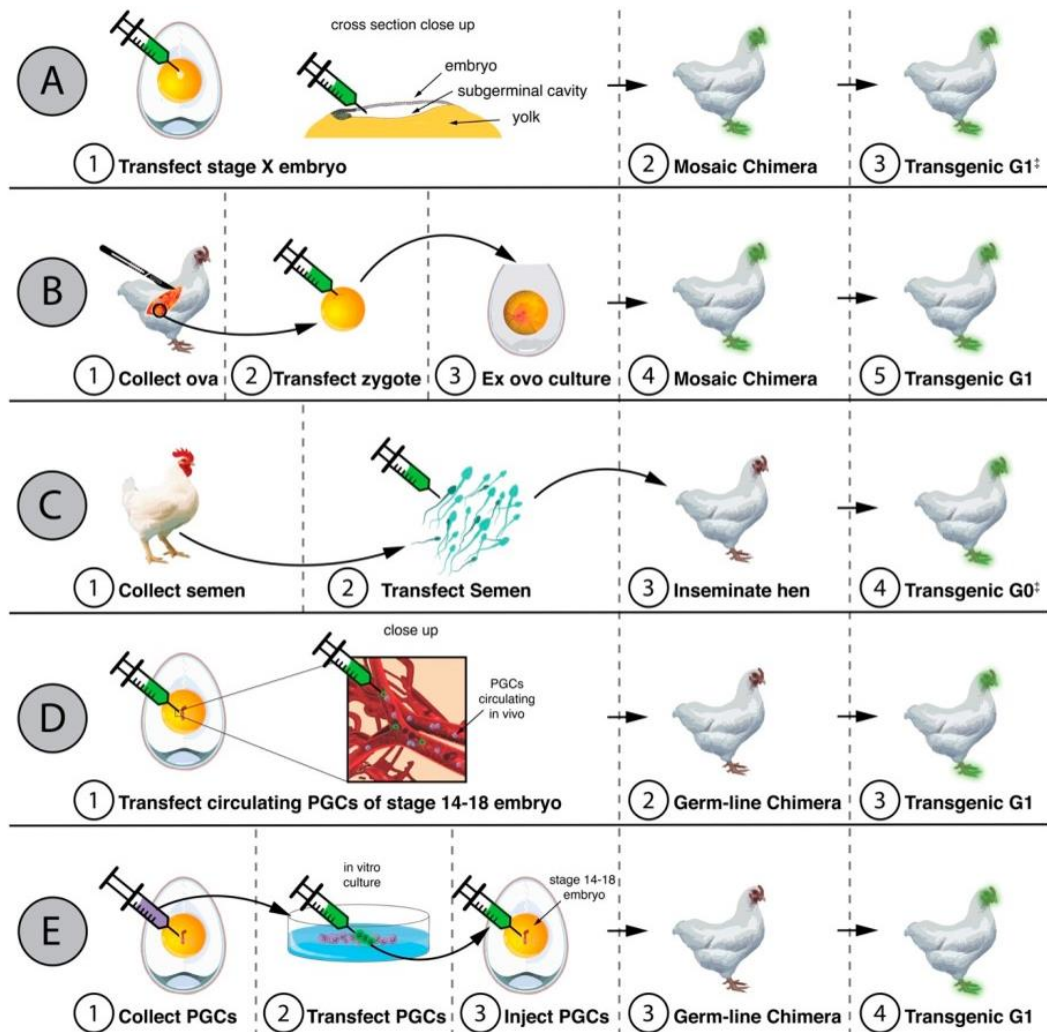
1994 wurde die Mikroinjektion exogener DNA in die Keimscheibe der Zygote als erste alternative Strategie publiziert (Abbildung 1B) [5]. Das Verfahren wurde etabliert, um Nachteile viraler Vektoren zu umgehen. Aufgrund der technisch anspruchsvollen Manipulation der Zygote im schalenfreien Zustand, der *ex vivo* Kultur des Embryos und damit einhergehenden, unvermeidbaren Tötung der Spendertiere wurde diese Methode trotz erfolgreicher Erzeugung genetisch modifizierter Hühner nicht weiterverfolgt [5].

Eine Alternativmethode zur Etablierung gewünschter Modifikationen in der Keimbahn stellt die Transfektion ausdifferenzierter männlicher Keimzellen dar [6]. Hierbei wird der Zeitraum der Kultur primordialer Hühnerkeimzellen (PGCs; engl. *primordial germ cell*) sowie das Heranwachsen von Keimbahnchimären bis zur Geschlechtsreife umgangen. Bei dem sogenannten *sperm transfection assisted gene editing* (STAGE) erfolgt eine Lipofektion des Spermas, um die erwünschte genetische Modifikation herbeizuführen. Mittels künstlicher Besamung werden die Zellen anschließend in das Empfängertier transferiert (Abbildung 1C). In der 2016 veröffentlichten Studie konnten gen-editierte Nachkommen mit einer Frequenz von bis zu 26% erzeugt werden. Die Experimente konnten jedoch nicht durch andere Forschungsgruppen reproduziert werden [7].

Dagegen konnten sich Keimzell-basierte Verfahren bis heute durchsetzen. Hierzu zählt die direkte *in ovo* Transfektion von PGCs. Dazu wird die Eischale fensterartig eröffnet und der Transfektions-Komplex in die dorsale Aorta des Embryos mittels Mikroinjektionsnadel appliziert. Nach Verschluss der Eischale wird der Embryo bis zum Schlupf weiter inkubiert. Das System von Tyack et al. sollte ebenfalls den Zeitraum der *in vitro* Kultur von PGCs umgehen (Abbildung 1D) [8].

Die derzeitige Standard Gentransfermethode stellt die *in vitro* Modifikation von PGCs und anschließender Reimplantation in ein Empfängertier dar (Abbildung 1E). Entscheidend für die Isolation dieser Zellen ist ein für Vögel und Reptilien einzigartiges Migrationsmuster während der Embryogenese [9, 10]. Innerhalb der ersten Tage der Embryonalentwicklung migrieren die PGCs über das Gefäßsystem in die embryonale Gonadenanlage ein [11]. Der Höhepunkt der vasalen Wanderung ist im Hamburger und Hamilton (H&H) Stadium 10-12 erreicht, welches somit einen geeigneten Entnahmepunkt embryonalen Blutes zur Gewinnung der PGCs darstellt [12]. Im Umkehrschluss kann der gleiche Zeitpunkt zur Reimplantation modifizierter PGC in Empfänger-Embryonen genutzt werden [9]. 1993 ist die sogenannte „*ex vivo – in vivo*“ Strategie erstmals beschrieben worden [13]. Die Migrationsfähigkeit der PGCs blieb trotz der damit verbundenen Manipulation der Zellen nicht verloren. Im Huhn konnten mithilfe dieser Technik die ersten Keimbahnchimären erzeugt werden [13]. Die gleiche Strategie wurde daraufhin zur Generierung transgener Hühner erfolgreich eingesetzt [10]. Im Jahr 2006 ist van de Lavoie et al. eine Überarbeitung dieser Methode im Hinblick auf bessere und effizientere PGC Kulturbedingungen gelungen. Mit dieser Arbeit wurde die Grundlage besserer Zellteilungsraten und längerer Kultivierbarkeit der

Zellen bei Erhalt guter Keimbahn-Transmissionsraten geschaffen [14].  
Nachfolgend gelang die Entwicklung eines definierten PGC Kulturmediums,  
welches das Wachstum von PGCs ohne *Feeder*-Zellen ermöglichte und die  
Anwendung des PGC-basierten Gentransfers zusätzlich vereinfachte [15].



**Abbildung 1. Übersicht wichtiger Gentransfer Strategien im Huhn.**

**A**, Lentivirale Gentransduktion durch Injektion in das frühembryonale Blastoderm. **B**, DNA Mikroinjektion in die aviäre Zygote. **C**, *Sperm transfection assisted gene editing*. **D**, *In ovo* Transfektion von PGCs. **E**, Isolation, Kultur, Transfektion und Reimplantation von PGCs. Abbildung nach Looi et al. 2018 [16]

Eine weitere Gentransfer Variante stellt die Reimplantation modifizierter PGCs in die Gonaden adulter, durch Bestrahlung sterilisierter Hähne dar [17]. Ziel dieses Ansatzes ist es, die Rate der Keimbahn-Transmission zu maximieren. Eine Effizienzsteigerung wird erreicht, indem durch Bestrahlung ausschließlich implantierte, in die Gonade eingewanderte PGCs zur Spermatogenese beitragen können. Mit diesem Verfahren ist die Erzeugung modifizierten Nachwuchses mit

einer Effizienz von 100% möglich, da keine Konkurrenz zwischen genetisch modifizierten und Wildtyp Spermien existiert.

### 2.1.2. DNA-Reparaturmechanismen

Die gezielte Manipulation des Genoms beruht auf dem Prinzip der natürlichen Mutagenese. Zellinterne DNA-Reparaturmechanismen werden genutzt, um eine vorausgegangene Schädigung der DNA fehlerlos zu reparieren oder unter Verbleib von Sequenzänderungen zu rekonstruieren [18]. DNA Schäden können durch eine Vielzahl intrinsischer und extrinsischer Faktoren entstehen. Dabei kann es sich um ein Noxe handeln oder auch im Rahmen physiologischer Prozesse ablaufen [19]. Ein Doppelstrangbruch (DSB) hat dabei großen Einfluss auf das Bestehen der Funktionalität des Genoms [20]. Um die Integrität eukaryotischen Erbguts sicherzustellen, existieren höchst konservierte DNA-Reparaturmechanismen, das *non-homologous end joining* (NHEJ) und die homologe Rekombination (HR) [21]. NHEJ bezeichnet die direkte Ligation der DNA Enden [22]. Typischerweise ist dies mit geringfügigen Nukleotid-Deletionen und/oder -Insertionen (*Indels*) assoziiert [20]. Dies kann zu einer Verschiebung des Leserasters führen, was abweichende Genprodukte oder völligen Funktionsverlust des betroffenen Gens zur Folge haben kann [23].

Die Reparatur eines DSB mittels HR erfordert das Vorhandensein einer zum geschädigten DNA Abschnitt homologen Sequenz [21]. Unter physiologischen Bedingungen bietet das intakte Schwester-Chromatid eine solche Reparaturvorlage (*repair template*) [24]. Damit diese Struktur für den Vorgang der HR zugänglich ist, muss sich die Zelle in Zellteilung befinden. Dementsprechend läuft dieser Vorgang ausschließlich in teilungsaktiven Zellen ab. Für die NHEJ-basierte Reparatur gilt diese Voraussetzung nicht und tritt damit frequenter als HR auf [25].

Beide Reparaturmechanismen spielen eine große Rolle in der Gen-Editierung. Das Prinzip der HR kann genutzt werden, um einen DNA-Abschnitt gezielt zu restrukturieren, indem exogene DNA als *repair template* zur Verfügung gestellt wird [26]. Je nach Zusammensetzung des *template* kann eine gezielte Gen-Insertion (*knock-in*) oder eine gezielte Inaktivierung durch Gen-Deletion (*knock-out*) erreicht werden [18]. Der Rekombinationsprozess der entsprechenden DNA-Sequenz wird über sogenannte „Homologiearme“ sichergestellt [27]. Diese zum Ziellokus homologen Sequenzen flankieren den modifizierten DNA-Abschnitt des *repair*

*template*. Die Länge der Homologiearme ist dabei von der Größe der einzubringenden Modifikation abhängig. Für die Integration oder Deletion von Genen wurden in Studien von Leighton und Schusser et al. isogene Homologiearme von insgesamt 8 bis 9 Kilobasen (kb) benötigt, um die erwünschte Modifikation mittels HR stabil in das Hühnergenom integrieren zu können [28, 29]. Die Effizienz der HR hängt zudem von der Teilungsaktivität der Zellen und der zufälligen Rekombination exogener DNA in den intakten Ziellokus ab. Die Wahrscheinlichkeit der HR steigt somit durch einen zuvor induzierten DSB an [23].

### 2.1.3. Gen-Editierung mittels sequenzspezifischer Endonukleasen

Der Einsatz sequenzspezifischer Endonukleasen ermöglicht eine enorme Steigerung der Targeting Effizienz, indem hiermit sequenzspezifische DSB induziert werden können, was eine DNA-Reparatur mittels HR oder NHEJ an programmierbarer Stelle begünstigt [18]. Vier Endonuklease-Klassen sind bisher beschrieben worden, die als Werkzeug für die Gen-Editierung zur Verfügung stehen: Meganukleasen, Zink Finger Nukleasen (ZFNs), *Transcription Activator-like Effector Nucleases* (TALENs) und das *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated Cas9* System (CRISPR/Cas9) [23].

Anhand von Meganukleasen konnte erstmals das Prinzip des induzierbaren, sequenzabhängigen DSB nachvollzogen werden [30]. Die Programmierbarkeit dieser Enzyme ist jedoch auf bestimmte *Recognition Sites* limitiert, was die Flexibilität stark einschränkt [31]. Die Modifikation des Hühnergenoms unter Verwendung von Meganukleasen ist nicht beschrieben. ZFN und TALEN stellen proteinbasierte Systeme zur Spaltung von DNA dar [23]. Beide Systeme bestehen aus einer programmierbaren DNA-Bindedomäne sowie einer DSB induzierenden DNA-Spaltungsdomäne [23]. Im Huhn wurden beide Systeme mit hohen Targeting Effizienzen am Beispiel des Ovalbumins [32, 33] und des DDX4 Lokus (DEAD-Box Helicase 4) eingesetzt [34]. Die aufwändige und teils eingeschränkte Programmierbarkeit einzelner Komponenten sowie hohe DSB-Raten abseits des Ziellokus (*Off-Target events*) stellen limitierende Faktoren dar [35]. Im Vergleich dazu ist das CRISPR/Cas9 System ein besonders effizientes, kostengünstiges und simples Instrument der molekularen Biotechnologie zur Induktion präziser DSBs in pro- und eukaryotischer DNA [36, 37]. Mit erfolgreicher Anwendung von CRISPR/Cas9 zur Editierung des Säugetiergenoms im Jahr 2013 gelang ein entscheidender Durchbruch in der biomedizinischen Forschung [38-40].



Die Anwendungsgebiete sequenzspezifischer Endonukleasen sind enorm vielseitig, da die Reparaturmechanismen durch entsprechende *repair templates* unterschiedlich genutzt werden können. Ein gezielter Knockout kann auch ohne *template* erfolgen, indem das Gen durch NHEJ-bedingte Mutationen funktionslos wird. Ein HR-gestützter Vorgang unter Verwendung eines *repair templates* nach DSB wird als *homology directed repair* (HDR) bezeichnet und eignet sich für eine Vielzahl verschiedener Modifikationen. Für die Insertion großer DNA-Segmente werden in der Regel Targeting Vektoren mit Homologiearmen von mindestens 1-2 kb verwendet [41]. Dagegen kann bei geringfügigeren Modifikationen auf kürzere, häufig einzelsträngige DNA *templates* (ssDNA) zurückgegriffen werden [42]. Handelt es sich um Punktmutationen kann die homologe Sequenz des *repair templates* bis auf 100 Basenpaare (bp) reduziert werden [43]. Der Vorteil einzelsträngiger Oligodeoxynukleotide (ssODN) besteht in der effizienteren Rekombination mittels HDR sowie der Verfügbarkeit des *templates* innerhalb weniger Tage bei Synthetisierung durch kommerzielle Anbieter [23].

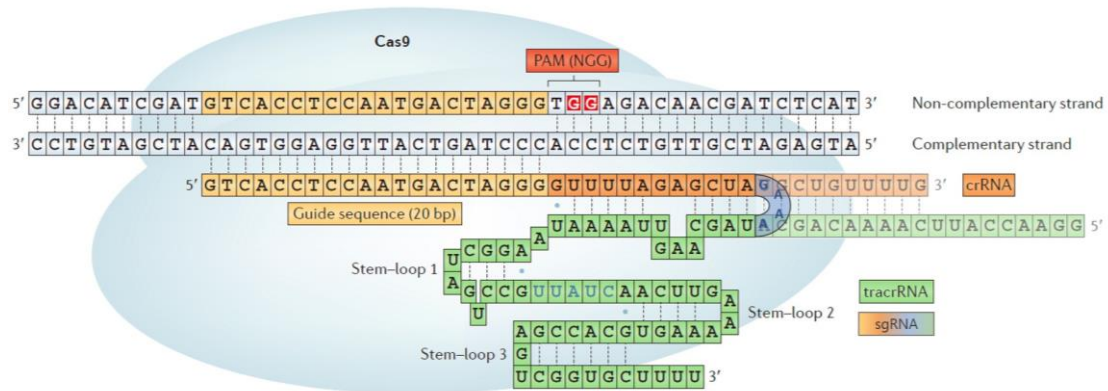
#### 2.1.3.1. Das CRISPR/Cas9 System

CRISPR/Cas9 ist ein RNA-basiertes System zur Spaltung von DNA [44]. Ursprünglich wurde es in einigen Eubakterien und Archaeobakterien als Teil des adaptiven Immunsystems identifiziert [45, 46]. Grundlage der spezifischen Immunität mittels CRISPR/Cas9 ist die Fähigkeit fremdes Erbgut zu erkennen und durch Induktion eines gezielten DSB zu inaktivieren während das eigene Erbgut davon unberührt bleibt [47].

Der CRISPR/Cas9 Locus kodiert dazu zwei Schlüsselkomponenten: CRISPR-assoziierte (Cas) Proteine sowie CRISPR assoziierte *non-coding* RNAs [48]. Anhand struktureller und funktioneller Eigenschaften der Cas Proteine, können CRISPR Typ I, II und III unterschieden werden [49]. Typ II ist deutlich besser erforscht und wird daher am häufigsten als Werkzeug der Gen-Editierung eingesetzt [50]. Insgesamt werden vier Typ II-Cas Proteine (Cas1, Cas2, Csn2 und Cas9) durch den CRISPR Locus kodiert, von denen Cas9 eine Endonuklease-Aktivität aufweist [51]. Gemeinsam mit CRISPR assoziierten *non-coding* RNAs, der CRISPR RNA (crRNA) und der *trans-activating* crRNA (tracrRNA) bildet Cas9 einen sogenannten *dualRNA-Cas9* Komplex (Abbildung 2), woraufhin ein sequenzspezifischer DSB induziert werden kann [52].

Die crRNA ist dabei essenziell für die Sequenzspezifität [53]. CrRNAs werden über CRISPR-Arrays des Bakteriengenoms generiert und bestehen aus 20 Nukleotid-langen pathogenspezifischen Sequenzen, der sogenannten *Protospacer* Sequenz. Über komplementäre Basenpaarung ist der Ziellokus des DSBs so innerhalb der zu schneidenden DNA vorgegeben [46, 54]. Die tracrRNA Sequenz weist dagegen eine konstante Sequenz auf und besitzt eine regulative Funktion in der crRNA Transkription [55]. Die exakte Position des DSB ist neben der crRNA-abgeleiteten Sequenz von einer entsprechenden Bindungsstelle für Cas9 innerhalb der zu schneidenden DNA abhängig [52]. Diese Bindungsstelle wird als PAM (*Protospacer adjacent motif*) bezeichnet, da sie direkt auf die zur crRNA komplementären Sequenz folgen muss. Die PAM-Sequenz variiert zwischen einzelnen Cas Proteinen verschiedener CRISPR Typen [56]. Die entsprechende Sequenz für die üblicherweise verwendete TYP II Cas9-Endonuklease des *Streptococcus pyogenes* weist eine Nukleotid-Abfolge von 5'-NGG-3' auf - einer beliebigen Nukleinbase (N), gefolgt von zwei Guanin-Basen (G) [56]. Von PAM ausgehend findet der DSB drei Basenpaare in 5'-Richtung statt [48].

Um das CRISPR/Cas9 System für die Gen-Editierung verfügbar zu machen, sind die Komponenten adaptiert und weiterentwickelt worden [23]. Die Fusion von crRNA und tracrRNA zu einer chimärischen *single guide* RNA (sgRNA) erhöhte nicht nur die Targeting Effizienz um das 5-fache, sondern vereinfachte die Anwendung des CRISPR/Cas9 Systems zusätzlich [53, 57]. Die CRISPR/Cas9 Komponenten können dem Zielorganismus in unterschiedlicher Form zur Verfügung gestellt werden. Kommerziell erhältliche CRISPR/Cas9-Plasmide werden häufig verwendet, um die Cas9- und sgRNA-kodierende Sequenz bereitzustellen [48]. Weitere Optionen sind die Transfektion der Komponenten in Form von mRNA oder Proteinkomplexen und der Einsatz viraler Vektoren [23]. Das CRISPR/Cas9 System konnte erfolgreich innerhalb der Pilze, Pflanzen, Insekten, Fische, Säugetiere und Vögel in zahlreichen Spezies als einfaches und effizientes molekularbiologisches Universalwerkzeug etabliert werden [31, 58-62].



**Abbildung 2. Schematische Darstellung des Typ II Cas9-guide RNA Komplexes.**

Die Endonuklease Cas9 wird durch eine RNA-DNA-Heteroduplex und der entsprechenden PAM an die Zielsequenz geleitet. Durch Fusion der sequenzspezifischen crRNA mit der tracrRNA kann eine sgRNA erstellt werden. Abbildung modifiziert nach Kim und Kim, 2014 [23].

Die ersten Editierungsversuche mittels CRISPR/Cas9 im Hühnergenom wurden in embryonalen Hühnerzellen und immortalisierten Hühnerzelllinien durchgeführt. Die Studien konnten unabhängig voneinander zeigen, dass die Targeting Effizienz im Hühnergenom im Vergleich zu ZFN und TALEN deutlich höher ist [63-66]. Im Jahr 2016 wurden modifizierte Hühnerlinien erstmals mithilfe der CRISPR/Cas9 Technologie erzeugt [62, 67]. In beiden Studien wurde die gewünschte Modifikation zunächst PGCs etabliert und anschließend zur Generierung von Keimbahnchimären verwendet. Oishi et al. entwarfen spezifische sgRNAs für den Knockout von Ovalbumin und Ovomuroid [67]. Beide Gene konnten erfolgreich und effizient mittels NHEJ in PGCs ausgeschaltet werden. Da jedoch kurz zuvor der Knockout des Ovalbumins im Huhn mittels TALEN publiziert worden war, wurde in dieser Studie lediglich der Ovomuroid-Knockout *in vivo* weiter verfolgt [34, 67]. Ovomuroid-defiziente Hühner wiesen weder phänotypische Auffälligkeiten noch Hinweise auf *off-target events* auf. Eine unerwünschte Integration des Targeting-Plasmids auf DNA-Ebene wurde ebenfalls nicht festgestellt.

Zeitgleich kam das CRISPR/Cas9 System in Verbindung mit HDR im Hühnergenom in der Studie von Dimitrov et al. zum Einsatz [62]. Ziel war die präzise Integration einer *loxP site* zum 3'-Ende eines zuvor durch HR generierten Knockout des Immunglobulin-schweren Kette kodierenden Gens. Mittels HDR

wurde die Zielregion durch eine selektierbare exogene DNA-Sequenz mithilfe 2 kb-langer Homologiearme ersetzt. Die Effizienz der HR von etwa 30% korrekt editierter Zellklone [29] konnte unter Bereitstellung eines entsprechenden *repair templates* und Verwendung des CRISPR/Cas9 Systems deutlich gesteigert werden [62].

Der Einsatz genetisch modifizierter Hühner erlaubte bereits wichtige Einblicke in Funktionen des aviären Immunsystems mittels reverser Genetik, vor allem bezüglich der B-Zell Entwicklung und der Interaktion mit Pathogenen [29, 68-70]. Mit der Generierung einer  $\gamma\delta$  T-Zell defizienten Hühnerlinie ist ein weiteres Hühnermodell zur Erforschung der T-Zell abhängigen Immunantwort hinzugekommen [71]. Die Hühnerlinie wurde auf Grundlage von CRISPR/Cas9 und HDR vermitteltem Knockout erstellt und steht nun zur genaueren Analyse  $\gamma\delta$  T-Zell-spezifischer Funktionen zur Verfügung.

## 2.2. Aviäres Leukosevirus

Zu den wichtigsten hühnerspezifischen Pathogenen der Familie *Retroviridae* zählen das Rous-Sarkoma Virus (RSV) und aviäre Leukoseviren (ALVs), welche zusammenfassend als *Avian leukosis/sarcoma group viruses* (ALSV) bezeichnet werden [72]. Das Krankheitsbild des Leukose/Sarkoma Komplexes ist vor allem durch die Induktion verschiedenster Tumorarten geprägt [73]. 1909 wurde die Hühnerleukämie erstmals als virale Infektionskrankheit eingestuft [74]. Beide Virusarten spielten in diesem Zusammenhang bereits eine wichtige Rolle in der Erforschung der viralen Tumorgenese. Die Entdeckung der reversen Transkription und des ersten zellulären Onkogens „*src*“ anhand des RSV wurde im Jahre 1966 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [75]. Während das Rous Sarkoma Virus heutzutage keine große wirtschaftliche Rolle mehr spielt, verursachen aviäre Leukoseviren weiterhin große wirtschaftliche Einbußen [76].

Innerhalb der ALVs werden insgesamt 10 Untergruppen, ALV-A bis J, auf Grundlage virologischer Tests, der viralen Genstruktur und des Wirtsspektrums unterschieden [77]. Das Haushuhn stellt den natürlichen Wirt für ALV Untergruppen -A bis E und J dar [72]. 2012 wurde ein von den bisher bekannten Untergruppen abweichendes ALV Isolat identifiziert [78]. Ob es sich hierbei um eine weitere ALV Untergruppe handelt, der Nomenklatur entsprechend ALV-K, ist noch nicht abschließend geklärt [77]. Die Untergruppen F bis I sind ausschließlich

in Wildvogelarten zu finden [76].

Die Grundstruktur des ALV Genoms ist einheitlich [79]. Das Virus-Proteom wird von vier Strukturgenen kodiert: 5'-*gag-pro-pol-env*-3', die in drei genetischen Regionen 5'-*gag/pro-pol-env*-3' organisiert sind [80]. Die Strukturgene werden von *Long Terminal Repeats* (LTRs) flankiert, die den Modus der DNA-Integration und der Virusreplikation regulieren [81]. *Gag* kodiert gruppenspezifische Antigene, die das Nukleokapsid, die innere Matrix und das Viruskapsid bilden. *Pro* und *Pol* kodieren die viralen Enzyme Protease und Reverse Transkriptase [80]. *Env* entschlüsselt zwei Glykoproteine, die die Virusoberfläche bilden. Während die Gene *gag/pro* und *pol* innerhalb der aviären Leukoseviren hoch konserviert sind, ist das *env*-Gen sehr variabel und diesbezüglich die wichtigste Determinante für Rezeptor- beziehungsweise Wirtsspezifität [82].

Weitere Merkmale zur Charakterisierung verschiedener ALV Untergruppen sind das Transmissionsmuster sowie der Ablauf der Zelltransformation. Entsprechend des Übertragungswegs können exogene und endogene ALVs unterschieden werden [83]. Exogene Viren werden horizontal durch Kontaktinfektion oder vertikal über den Genitaltrakt ins Ei an die Nachkommen übertragen (kongenital). Unter diese Kategorie fallen ALV A-D und J. Endogene ALV Untergruppen sind dagegen durch eine genetische Übertragung gekennzeichnet. Es handelt sich um virale, häufig replikations-defiziente Virusgenom-Fragmente, die über die Keimbahn an die nachfolgende Generation weitergegeben werden [76]. In der Regel sind endogene ALVs nicht für infektiöse Leukose-Formen verantwortlich [83].

Die Art und Geschwindigkeit der neoplastischen Wirtszelltransformation ist davon abhängig, ob der Virus onkogene Sequenzen im Erbgut aufweist [81]. Das Genom langsam transformierender Viren beinhaltet kein Onkogen und löst daher nicht unmittelbar eine Tumorgenese aus [76]. Eine Wirtszelltransformation findet hier über den Mechanismus der sogenannten '*promoter insertion*' statt. Dabei wird das virale Genom im Verlauf der Virusreplikation zufällig in unmittelbare Nähe eines zellulären Proto-Onkogens integriert [84]. Die LTR Sequenz steuert die permanente Überexpression des betroffenen Wirtsgens, was schließlich zur Zelltransformation führt [73]. Im Gegensatz dazu weisen akut transformierende Leukoseviren ein virales Onkogen auf, wodurch der oben beschriebene Prozess unabhängig vom Integrationsort innerhalb weniger Tage ablaufen kann [76].

### 2.2.1. Aviäres Leukosevirus J

ALV-J wurde erstmals 1988 in England im Rahmen eines routinemäßigen ALV-Monitorings in Masthuhn Herden isoliert [85]. Das neuartige Virusisolat konnte der ALV Familie zugeordnet werden, entsprach jedoch keiner bis dahin bekannten ALV Untergruppe [85]. Virologische Tests und Sequenzanalysen bestätigten das Vorliegen einer neu entstandenen exogenen ALV Untergruppe [85]. Die untersuchten ALV-J Isolate wurden gemäß der *Houghton Poultry Research Station* HPRS-100 bis -104 benannt. Darunter gilt HPRS-103 als ALV-J Prototyp [75]. Aus Studienergebnissen von Bai et al. konnte geschlussfolgert werden, dass ALV-J ursprünglich aus Rekombination zwischen exogenem ALV und dem endogenen Retrovirus, EAV-HP, entstand [82, 86]. ALV-J ist zunächst als langsam transformierendes Leukosevirus eingeordnet worden, da im Genom des HPRS-103 kein virales Onkogen vorzufinden war [87]. Nachfolgend sind jedoch auch akut transformierende ALV-J Varianten in Hühnern sowie Puten identifiziert worden [88-91].

#### 2.2.1.1. Erkrankung und Diagnostik

Die myeloide Leukose (ML) ist das am häufigsten durch ALV-J induzierte Krankheitsbild [92]. Aufgrund des primären Zelltropismus für myeloide Zellen sind lymphoide oder erythroide Leukose-Formen und andere Tumorarten unter ALV-J Infektion seltener zu beobachten [87, 93]. Je nach Differenzierungsgrad der transformierten Wirtszelle wird die ML in Myeloblastose und Myelocytomatose unterteilt [76]. ALV-J induziert zunächst eine Leukämie, die sich im weiteren Verlauf durch Infiltration transformierter Zellen in das Gewebe verschiedenster Organsysteme in soliden Tumoren niederschlägt [72]. Pathologische Befunde lassen sich vor allem in Leber, Skelettsystem und Nieren finden [94]. Das Einsetzen erhöhter Tumorsterblichkeit liegt bei durchschnittlich 20 Wochen nach Infektion [94]. Das Krankheitsbild einer subklinischen ALV-J Infektion ist dagegen durch Rückgang der Wachstums- und Legerate, sowie verspätetem Einsetzen der Geschlechtsreife geprägt [72, 95, 96].

Der Grad der Manifestation ist von einer Vielzahl verschiedener Faktoren abhängig. Dabei spielt der Übertragungsweg, die Infektionsdosis und das Alter der Tiere eine übergeordnete Rolle [81]. Wie in Abbildung 3 dargestellt, lassen sich infizierte Tiere hinsichtlich des Immunstatus und der Virusausscheidung unterscheiden [81]. Küken, die vertikal über vorige Virusausscheidung ins Ei infiziert werden, bilden keine neutralisierenden Antikörper und sind somit immuntolerante Ausscheider des ALV-J ( $V^+A^-S^+$ ) [81]. Diese Tiere sind für eine rasante Verbreitung des Virus über Kontaktinfektion der Schlupfgeschwister verantwortlich und erkranken mit hoher Wahrscheinlichkeit an ML [75]. Bei horizontaler Infektion innerhalb der ersten Wochen nach Schlupf können in Mastlinien und Legelinien zwei unterschiedliche Szenarien beobachtet werden [75, 81]. Masthühner bilden in der Regel eine Immuntoleranz unter Virusausscheidung aus ( $V^+A^-S^+$ ). Ebenfalls ist eine Immunität nach initialer virämischer Phase möglich - gegebenenfalls unter anhaltender Virusausscheidung ( $V^-A^+S^{+/-}$ ). In Legelinien ist dagegen eine Immunität ohne Virusausscheidung zu beobachten ( $V^-A^+S^-$ ). Eine horizontale Übertragung zu späterem Zeitpunkt resultiert üblicherweise in einer Immunität unter Virusausscheidung ( $V^-A^+S^{+/-}$ ).

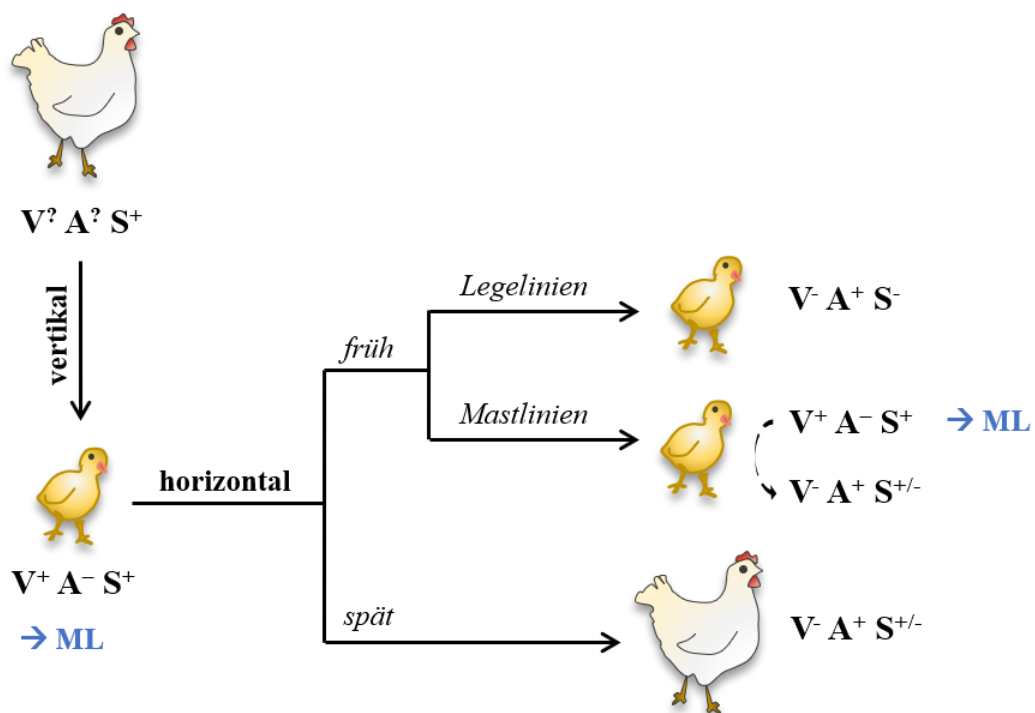


Abbildung 3. Übertragungswege des ALV-J.

Als exogener ALV Untergruppe kann ALV-J vertikal und horizontal übertragen werden. Der Immunstatus wird anhand des Auftretens einer Virämie ( $V^+/V^-$ ; engl. *viraemia*), der Antikörperbildung ( $A^+/A^-$ ; engl. *serum antibodies*) sowie der Virusausscheidung ( $S^+/S^-$ ; engl. *viral shedding*) beurteilt. Abbildung modifiziert nach Venugopal, 1999 [81].

Anhand der Transmissionsroute lassen sich diagnostische Möglichkeiten zum Nachweis der ALV-J Infektion ableiten [94]: Mütterlicherseits eignen sich hierzu Serumproben und Kloaken- sowie Vaginalabstriche. Nach Eiablage kann das Virus im Ei-Albumin und Mekonium der Küken nachgewiesen werden. In erkrankten Tieren kann die ALV-J Infektion anhand typischer pathologischer Befunde einer ML diagnostiziert und zusätzlich über den Nachweis virusspezifischer Antikörper im Serum oder Virusnachweis im Tumorgewebe bestätigt werden. Generell erfolgt der Virusnachweis über die Identifizierung viralen Erbguts mittels PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Hierzu konnten 1998 zwei ALV-J spezifische PCR-Tests entwickelt werden [97, 98]. Eine Quantifizierung mittels RT-PCR (*Real-Time PCR*) ist ebenfalls möglich [99]. Der Nachweis spezifischer Serum Antikörper zählt gleichermaßen zur Routinediagnostik und wird mittels ELISA (*Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) durchgeführt [98, 100]. Venugopal et al. etablierten hierzu einen Test auf Gruppen-spezifische Serum-Antikörper gegen das ALV-J spezifische Antigen *gp85* [100].

#### 2.2.1.2. ALV-J Rezeptor

Der virale Lebenszyklus beginnt mit Bindung der Virushülle an die Zielzelle mittels spezifischen Rezeptors an der Zelloberfläche. Seitens der Retroviren sind die dazu nötigen Strukturen seit langem bekannt [101]. Das Hüllprotein *gp85* vermittelt die direkte Bindung zwischen Rezeptor und Virus [102]. Dies löst Konformationsänderungen des Hüllproteins *gp37* aus. Die Fusion von Virushülle und Wirtszellmembran wird daraufhin eingeleitet [103].

Im Hinblick auf die entsprechende Schlüsselstruktur der Wirtszelle konnten Chai und Bates 2006 erstmals zeigen, dass der Natrium-Wasserstoff Ionenaustauscher *chNHE1* (*Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger 1*) der Rezeptor für ALV-J ist [104]. Weiterhin deuten ihre Ergebnisse darauf hin, dass die konkrete Bindestelle für ALV-J innerhalb der ersten extrazellulären Kette des *chNHE1* liegen könnte (Abbildung 4) [104]. Diese Vermutung wurde durch Arbeiten von Kučerová et al. und Guan et al. bestätigt [105, 106]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Anfälligkeit gegenüber ALV-J auf die Aminosäure Tryptophan an Position 38 des *chNHE1* (W38) zurückgeführt werden kann [105]. Dementsprechend ist *NHE1W38* in ALV-J empfänglichen Vogelspezies - Huhn, Pute und Bankivahuhn - vertreten, jedoch nicht in ALV-J resistenten Vogelspezies [105, 107]. Die Hypothese konnte durch präzise Deletion der W38 kodierenden DNA-Sequenz in Hühnerzellen bestätigt



werden [107-109]. Während der Anfertigung der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Publikation wurde eine weitere Studie veröffentlicht, die diese Ergebnisse erstmals *in vivo* reproduzieren konnte [110].

|                        | W38                    | P52                          | ECL1 |
|------------------------|------------------------|------------------------------|------|
| Chicken (+)            | GQRLQADATRVSEPTWEQ     | PWGEPGGITAAAPLATAQEVHPLNKQH  | HNF  |
| Red jungle fowl (+)    | GQRLQADATRVSEPTWEQ     | PWGEPGGITAAAPLATAQEVHPLNKQH  | HNF  |
| Chukar (-)             | GQGLQANATRVSEPT        | EQPWGEPGGITAAHPATAQEVHPLNKQH | HNF  |
| Guinea fowl (-)        | GQGLQANAPRVSETPGGQLWGE | PPGGITAAPATAQEVHPLNKQP       | HNF  |
| Jap. quail QT6 (-)     | GQGLQANASHGPEPTEE      | QPVVKGGITAAPATAQEVHPLNRQH    | HNF  |
| Jap. quail 16Q, QEF(-) | GQGLQANASHGPEPTEE      | QPVVKAGGITAAPATAQEVHPLNRQH   | HNF  |
| Common pheasant (-)    | GQGLQANATRVSE          | QPWGEAGGITAAPLATAQEVHPLNRQQ  | HNF  |
| Reeve's pheasant (-)   | GQGLQANATRVSE          | QPWGEPGGITAAPATAQEVHPLNRQQ   | HNF  |
| Turkey (+)             | GQGLQANATRVSEPTWEQ     | PWGEPGGITAAPATAQEVHPLNKQH    | HNF  |

**Abbildung 4. Aminosäuresequenz des NHE1 Proteins verschiedener Vogelspezies.**

Gezeigt ist die Aminosäuresequenz der ersten extrazelluläre Kette (ECL, engl. *extracellular loop 1*) des NHE1 Proteins einiger Vogelspezies im Vergleich. Aminosäurepolymorphismen treten vor allem an Aminosäurepositionen 31 – 45 auf. Innerhalb ALV-J empfänglicher Spezies „(+)" befindet sich die Aminosäure W an Position 38, während diese in ALV-J resistenten Spezies „(-)" nicht vorzufinden ist. Hieraus ergibt sich die Annahme, dass W38 entscheidend für die Virus-Rezeptor-Kompatibilität sein könnte. Abbildung modifiziert nach Kučerová et al. [105].

### 2.2.1.3. Ausbreitung und wirtschaftliche Bedeutung

Mit der Entstehung und Verbreitung des ALV-J gingen enorme wirtschaftliche Verluste einher [94]. Die rasche weltweite Ausbreitung des Virus ist vor allem dem Export kontaminierten Tiermaterials und infizierter Zuchtherden zuzuschreiben, an dem über 50 Länder beteiligt waren [111-114]. Die wöchentliche Sterblichkeitsrate stieg in ALV-J durchseuchten Herden um etwa 1,5% über das normale Niveau an - gelegentlich sogar bis zu 20% [77]. Insgesamt verringerte sich der gesamte Masthuhn Bestand westlicher Länder um ein Drittel [115]. Rückblickend wurden die späten neunziger Jahre als die verheerendste Zeitspanne bezeichnet [75]. Der renommierte Vogelpathologe L.N. Payne hielt dazu in einer Stellungnahme des World Poultry Magazine im Jahr 2012 fest: „*The international poultry industry will remember 1997 and 1998 as the years of the Leukosis J (or Myeloid Leukosis) disaster. Damage caused by this disease in broiler breeders and in broilers all over the world has been enormous and little is known about how to control the disease effectively.*" [75].

ALV-J weist eine hohe Variabilität bezüglich des Genoms, der Pathogenität und des Wirtspektrums auf [116-119]. Epidemiologische Untersuchungen lassen

vermuten, dass sich das Wirtsspektrum auch im Hinblick auf Wildvogelarten erweitern könnte, da ALV-J Isolate bereits in *Anseriformes* und *Passeriformes* gefunden wurden [120-122]. Trotz strikter globaler Tilgungsprogramme ist ALV-J im asiatischen Raum persistent und weiterhin für hohe Tierverluste und wirtschaftliche Schäden verantwortlich [123, 124]. Das Virus tritt hier nicht nur in Masthühnern auf, sondern auch in kommerziellen Legelinien und Rassegeflügel [125, 126]. Aktuell ging der letzte Ausbruch in China 2018 mit einer erheblich gesteigerten Pathogenität und hohen Sterblichkeitsrate einher [127]. Der auf ALV zurückzuführende weltweite Schaden wird derzeit auf mehrere Millionen US-Dollar pro Jahr geschätzt [123].

#### 2.2.1.4. Kontrollstrategien

Die Kontrolle über ALV-J ist aufgrund unvollständiger Eindämmung, fehlender protektiver Impfstoffe und Reinfektionen ALV-J freier Herden über Verschleppung kontaminierten Materials erschwert [112, 124, 128].

Eine der wichtigsten protektiven Maßnahmen gegen virale Erreger stellt die Impfung dar [124]. Bisher konnte jedoch noch kein ausreichend wirksamer Impfstoff gegen ALV-J entwickelt werden, da die Herstellung von Vakzinen aufgrund insuffizienter Induktion einer Immunreaktion und damit unzureichendem Antikörpertiter nicht erfolgreich ist [77]. Impfstoffe, die auf rekombinantem ALV-J Hüllprotein *gp85* beruhen, induzierten deutlich höhere Antikörpertiter, müssen aber noch weitergehender überprüft werden [100, 129-132]. Die hohe Antigenvariabilität des ALV-J stellt ebenfalls ein Problem der Impfstoffentwicklung dar [133]. Des Weiteren kann die Impfung lediglich zum Schutz gegen eine horizontale Transmission beitragen, da kongenital infizierte Küken immuntolerant und demnach nicht in der Lage sind ALV-J spezifische Antikörper zu produzieren [87].

Kurative Maßnahmen gegen Formen der aviären Leukose sind derzeit nicht verfügbar. Anwendbarkeit und Effektivität von Strategien zur Inhibierung der Virusreplikation auf Basis von RNA-Interferenz Methoden *in vivo* sind noch nicht geklärt [77, 134, 135]. Rekombinantes Interferon-alpha ist eines der wichtigsten antiviralen Zytokine der angeborenen Immunantwort und wird als antivirales Therapeutikum diskutiert [136]. Hierzu gibt es über *in vitro* Versuche hinaus jedoch keine weiteren präklinischen Untersuchungen.

Aufgrund limitierter Möglichkeiten wurde ALV-J bisher ausschließlich durch eradikative Maßnahmen bekämpft. Grundlage für ein weltweites Tilgungsprogramm waren Studien zu ALV-J spezifischen Transmissionsrouten und daraus resultierenden Diagnosemöglichkeiten sowie Test- und Tilgungsverfahren, die bereits für ALV-A etabliert worden waren [137-139]. Zentrales Element ist das regelmäßige und wiederholte Testen auf ALV-J spezifisches Antigen *gp85* in Kloaken- und Vaginaltupfern sowie in Ei-Albumin und Mekonium mittels PCR und ELISA über mehrere Generationen. Positiv getestete Tiere werden ausgesondert und ALV-J freie Tiere werden isoliert aufgezogen [100, 140]. Einigen Zuchtbetrieben gelang unter Einhaltung der genannten Vorgaben eine starke Reduktion der ALV-J Durchseuchung bis hin zur Etablierung ALV-J freier Zuchtbestände [75]. In asiatischen Ländern, vor allem in China, waren diese Eradikationsmaßnahmen nicht erfolgreich. Unter anderem wird dies der hohen Durchseuchung von Masthuhn- und Legehuhnbeständen und einer weniger gut vernetzten und organisierten Geflügelhaltung zugeschrieben [75, 124].

### **3. ZIELSETZUNG DER ARBEIT**

Ziel dieser Studie ist es eine alternative Kontrollstrategie für das aviäre Leukosevirus J mittels Gen-Editierung im Huhn zu etablieren.

Die Virus-Wirt Interaktion wird auf Zellebene unterbunden, indem die ALV-J Bindestelle des Wirtszellrezeptors chNHE1 durch eine präzise Deletion der entscheidenden Aminosäure W38 gezielt verändert wird. Dazu kommt das CRISPR/Cas9 System in Kombination mit Homologie-gesteuerter DNA-Reparatur innerhalb primordialer Hühnerkeimzellen zum Einsatz.

In anschließenden Experimenten werden die genetisch modifizierten Tiere im Hinblick auf die Empfänglichkeit gegenüber ALV-J und den allgemeinen Gesundheitsstatus anhand phänotypischer Daten überprüft.

## 4. PUBLIKATION



BRIEF RESEARCH REPORT  
published: 28 May 2020  
doi: 10.3389/fgeed.2020.00003



# Acquiring Resistance Against a Retroviral Infection via CRISPR/Cas9 Targeted Genome Editing in a Commercial Chicken Line

Romina Hellmich<sup>1</sup>, Hicham Sid<sup>1</sup>, Kamila Lengyel<sup>1</sup>, Krzysztof Flisikowski<sup>2</sup>, Antonina Schlickerrieder<sup>1</sup>, Denise Bartsch<sup>1</sup>, Theresa Thoma<sup>1</sup>, Luca D. Bertzbach<sup>3</sup>, Benedikt B. Kaufer<sup>3</sup>, Venugopal Nair<sup>4</sup>, Rudolf Preisinger<sup>5</sup> and Benjamin Schusser<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Animal Sciences, Reproductive Biotechnology, School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University Munich, Freising, Germany, <sup>2</sup> Department of Animal Sciences, Chair of Livestock Biotechnology, School of Life Sciences Weihenstephan, Technical University Munich, Freising, Germany, <sup>3</sup> Institute of Virology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany, <sup>4</sup> The Pirbright Institute, Woking, United Kingdom, <sup>5</sup> EW GROUP GmbH, Visbek, Germany

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Min Wu,  
University of North Dakota,  
United States

### Reviewed by:

Quanjiao Ji,  
ShanghaiTech University, China  
Bony De Kumar,  
University of North Dakota,  
United States

### \*Correspondence:

Benjamin Schusser  
benjamin.schusser@tum.de

### Specialty section:

This article was submitted to  
Genome Editing in Infectious  
Diseases,  
a section of the journal  
Frontiers in Genome Editing

**Received:** 06 March 2020

**Accepted:** 30 April 2020

**Published:** 28 May 2020

### Citation:

Hellmich R, Sid H, Lengyel K, Flisikowski K, Schlickerrieder A, Bartsch D, Thoma T, Bertzbach LD, Kaufer BB, Nair V, Preisinger R and Schusser B (2020) Acquiring Resistance Against a Retroviral Infection via CRISPR/Cas9 Targeted Genome Editing in a Commercial Chicken Line. *Front. Genome Ed.* 2:3. doi: 10.3389/fgeed.2020.00003

Genome editing technology provides new possibilities for animal breeding and aid in understanding host-pathogen interactions. In poultry, retroviruses display one of the most difficult pathogens to control by conventional strategies such as vaccinations. Avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) is an oncogenic, immunosuppressive retrovirus that causes myeloid leukosis and other tumors in chickens. Severe economic losses caused by ALV-J remain an unsolved problem in many parts of the world due to inefficient eradication strategies and lack of effective vaccines. ALV-J attachment and entry are mediated through the specific receptor, chicken Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 (chNHE1). The non-conserved amino acid tryptophan 38 (W38) in chNHE1 is crucial for virus entry, making it a favorable target for the introduction of disease resistance. In this study, we obtained ALV-J-resistance in a commercial chicken line by precise deletion of chNHE1 W38, utilizing the CRISPR/Cas9-system in combination with homology directed repair. The genetic modification completely protected cells from infection with a subgroup J retrovirus. W38 deletion did neither have a negative effect on the development nor on the general health condition of the gene edited chickens. Overall, the generation of ALV-J-resistant birds by precise gene editing demonstrates the immense potential of this approach as an alternative disease control strategy in poultry.

**Keywords:** chicken, genome editing, CRISPR-Cas9, ALV-J, chNHE1

## INTRODUCTION

During the last decades, poultry industry has grown substantially causing difficulties in disease control. Consequently, improving animal welfare while covering an increasing demand for animal protein has become more challenging. Retroviral pathogens continue to be a major problem worldwide. Their relatively high antigenic variability (Kurstak et al., 2013) results in the emergence of new strains and interferes with vaccination-based control strategies (Feng and Zhang, 2016).

The Avian leukosis virus (ALV) is an alpharetrovirus that belongs to the *Retroviridae* family (Lefkowitz et al., 2018). Depending on host range and cross neutralization patterns, the virus is classified into different subgroups (Payne and Nair, 2012). Structural variations of the viral envelope protein underline the evolutionary dynamics responsible for the emergence of new virus strains (Venugopal, 1999). This was illustrated by the identification of ALV-J in the late 80s (Payne, 1998), which increased the number of ALVs that infect chickens to 6 subgroups (ALV A-E and J) (Weiss, 1993). More recently, a putative ALV-K was suspected to be circulating in Chinese indigenous chicken breeds (Wang et al., 2012). The infection with ALV-J can either cause a neoplastic disease or manifests subclinically, which is generally accompanied by reduced weight gain and decreased egg production, leading to high economic losses (Payne and Nair, 2012). In contrast to other ALVs that infect lymphoid cells, commonly causing classical lymphoid leukosis, ALV-J induces a late onset of myeloid leukosis including both myeloblastosis and myelocytomatosis, which is attributed to a distinct cell tropism (Chesters et al., 2002). Since its emergence in 1988, ALV-J became widespread in meat-type chickens worldwide due to highly efficient horizontal transmission and global trade of infected chicken breeding flocks (Zhang et al., 2010; Payne and Nair, 2012). Even though strict eradication programs, similar to those applied for ALV-A and B, were able to partially control ALV-J spread in chickens, subgroup J-related outbreaks are still affecting animal welfare and remain a major threat to poultry industry (Payne and Nair, 2012). In different Asian countries including China, ALV-J is not only endemic (Feng and Zhang, 2016), but also continues to expand the host range and even includes layer-type chickens (Shen et al., 2014); this expanded host range was shown to be associated with increased pathogenicity (Payne and Nair, 2012).

ALV infection is initiated by the attachment and subsequent virus entry into the host cell, which requires the interaction of the viral envelope with host cell receptors (Barnard et al., 2006). Cell entry is mediated by a specific cellular receptor and the single determinant of genetic susceptibility to ALV infections and disease. It is long known that birds with specific mutations in the receptor are resistant to ALV infection (Klucking et al., 2002; Elleder et al., 2004). ALV-J is characterized by its unique interaction with a multi-pass transmembrane protein, which was identified as the chicken Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 (chNHE1) (Chai and Bates, 2006). Among vertebrates, NHE1 is a highly conserved and is ubiquitously expressed. It is involved in essential housekeeping functions including the regulation of intracellular pH (Slepkov and Fliegel, 2002). The ALV-J binding site has been shown to reside within the prominent first extracellular loop (ECL1) of chNHE1, and its structure is defined by the presence of a single amino acid, the non-conserved tryptophan at position 38 (W38, Figure 1) (Kucerova et al., 2013). W38 is exclusively present in ALV-J susceptible species and has been demonstrated to act as key element for virus entry (Kucerova et al., 2013; Lee et al., 2017a).

While natural resistance to ALV-A to E can be seen in inbred chicken lines (Klucking et al., 2002; Elleder et al., 2004, 2005), ALV-J remains an exception (Reinisova et al., 2016). The CRISPR/Cas9 technology has been demonstrated as feasible tool to acquire *in vitro* resistance to ALV subgroups A, B and J using DF-1 cells (Lee et al., 2017a,b; Koslova et al., 2018). Herein, we report the successful introduction of ALV-J resistance in a commercial white leghorn line based on precise deletion of the chNHE1 W38 by gene editing.

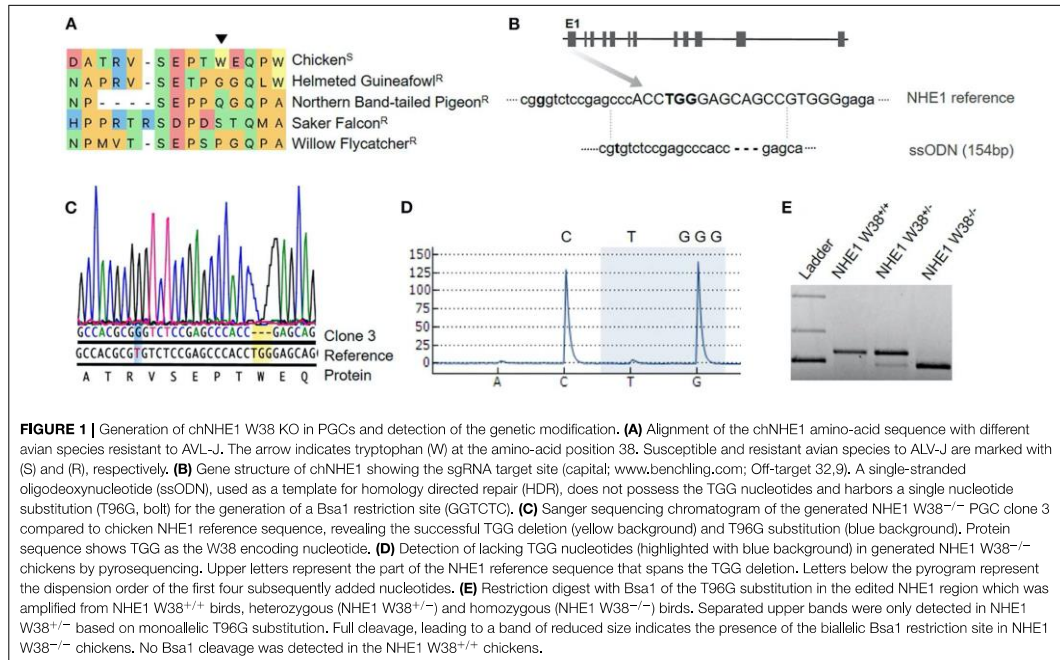
## METHODS

Detailed methods can be found in **Supplementary Material**. For the generation of transgenic chickens, primordial germ cells (PGCs) were isolated from a great-grandparent White Leghorn line and expanded for subsequent transfection. As precursors of sperms and oocytes, PGCs play a key role in the establishment of genetic modifications *in vivo* (Sid and Schusser, 2018). In order to introduce the W38 deletion in chNHE1, PGCs were co-transfected with a CRISPR/Cas9 vector expressing a single guide RNA and Cas9-2A-eGFP in combination with a single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN). The ssODN served as DNA repair template to specifically target the W38 coding region of chNHE1 within Exon1 (Figure 1). The designed oligo lacks the W38 coding nucleotides TGG and harbors a T96G nucleotide substitution, which creates a BsaI site that can be used later on to detect gene edited birds by PCR followed by restriction enzyme digest (Figure 1).

Forty-eight hour after co-transfection, PGCs were selected with fluorescence activated cell sorting based on transient eGFP expression. Sorted cells were separated by limiting dilution to grow up clonal cell populations. Subsequently, single clones were examined for the defined genetic modification via Sanger and pyrosequencing.

Male chimeric roosters were generated as previously described (Schusser et al., 2013) and raised to sexual maturity. Semen was collected from adult chimeric roosters for gDNA extraction. Sperm analysis was done by pyrosequencing, which has been proven to be a rapid and reliable approach to quantify proportions of mutated and wild-type alleles in various kinds of tissues (Marsh, 2007). The pyrosequencing assay was designed to examine the frequency of modified sperm determined by the presence or absence of the critical TGG nucleotides. Screening for hetero- and homozygosity was performed with pyrosequencing-based genotyping, which was additionally confirmed by Sanger sequencing.

In order to evaluate the ALV-J susceptibility of genetically edited birds, we performed infection experiments using an eGFP transducing modified replication-competent avian sarcoma-leukosis virus with a splice acceptor (RCAS) vector, RCAS(J)eGFP (Kucerova et al., 2013), that was propagated by transfection of DF-1 cells. In three independent infection experiments, we used chicken embryo fibroblasts (CEFs) that were isolated from NHE1 W38<sup>-/-</sup> and NHE1 W38<sup>+/+</sup> embryos and infected them with RCAS(J)eGFP virus enriched



supernatants. The extent of infection was evaluated by quantification of eGFP expression upon virus replication by flow cytometry.

## RESULTS

Primordial germ cells were transiently co-transfected with the CRISPR/Cas9 vector and the ssODN as repair template. Based on transient eGFP expression of positively transfected cells, 1% highly eGFP positive primordial germ cells were collected by cell sorting (data not shown).

We obtained a total of four clonal PGC lines, all carrying a NHE1 mutation. Both Sanger and pyrosequencing revealed the presence of TGG deletion in three out of four clones (75%), of which two had a biallelic deletion and one was heterozygous. In one of these clones, clone #3, homozygous TGG deletion and T96G substitution occurred simultaneously (Figure 1). This clone was used for the generation of germline chimeras. One clone showed a large deletion of 12 base pairs.

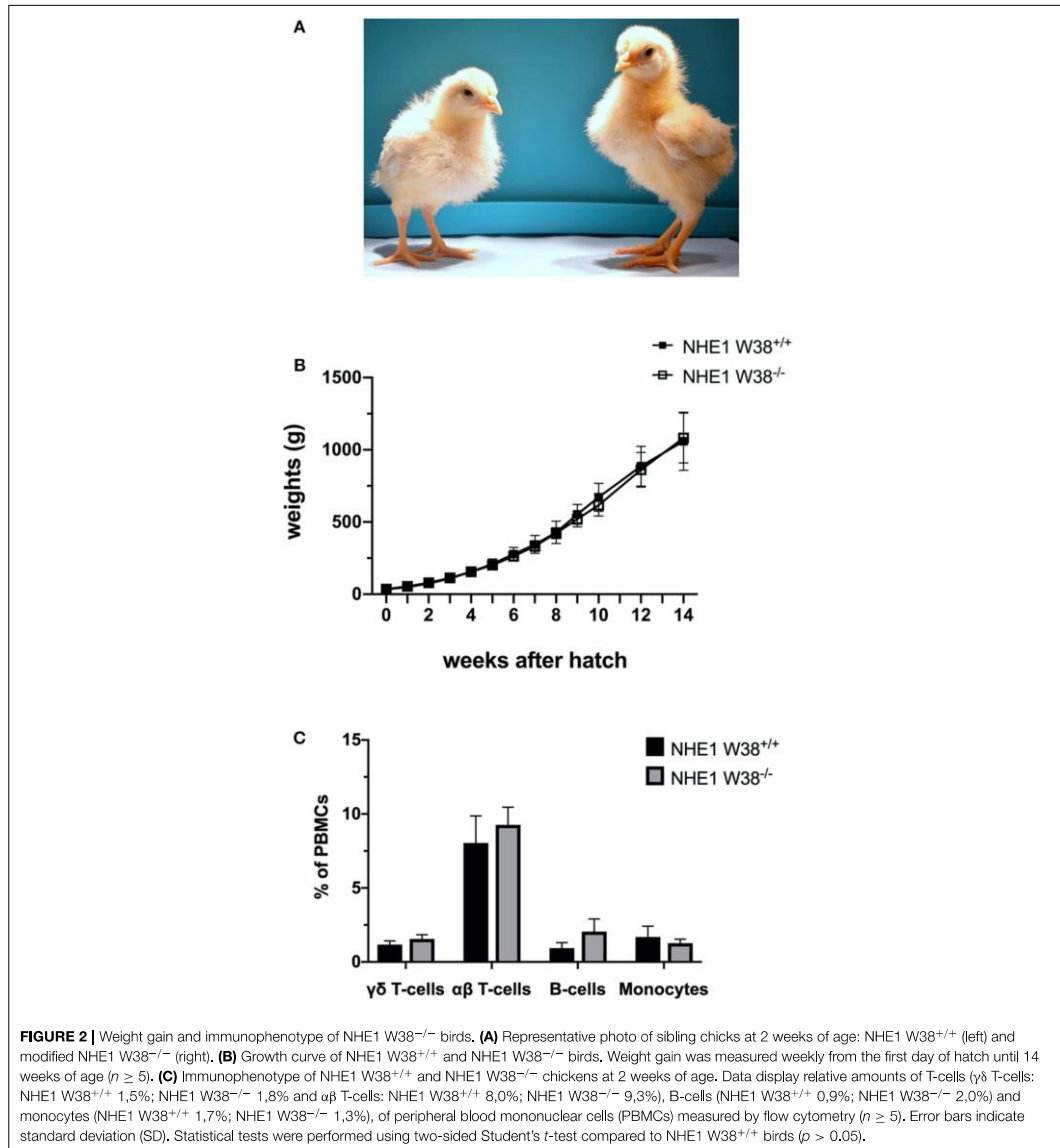
Three chimeras were selected for further breeding based on the relative amount of genetically edited sperm (34, 37, and 46% mutated sperm were identified [data not shown]). All three roosters showed germline transmission (0.4, 2.08, and 0.9% respectively [data not shown]) and gave rise to heterozygous (NHE1 W38<sup>+/-</sup>) offspring.

In total, seven heterozygous birds were generated to be used for production of homozygous chickens, lacking the critical W38. Detection of biallelic mutations was carried

out by pyrosequencing (Figure 1). The modified NHE1 allele was inherited in a Mendelian fashion and the generated NHE1 W38<sup>-/-</sup> chickens were assessed for possible phenotypic abnormalities (Figure 2) and subsequently examined for their susceptibility to ALV-J (Figure 3).

In order to verify this hypothesis, we examined modified birds for their postnatal development and immunological phenotype. NHE1 W38<sup>-/-</sup> birds hatched without apparent abnormalities compared to NHE1 W38<sup>+/+</sup> birds. Upon hatch, NHE1 W38<sup>-/-</sup> chicks gained weight comparable to NHE1 W38<sup>+/+</sup> birds (Figure 2). Although, reproduction parameters seem normal, further investigations are needed to determine the role of the mutation in male fertility. Furthermore, the immunophenotype of NHE1 W38<sup>-/-</sup> birds was analyzed by quantifying the peripheral blood lymphocyte composition using flow cytometry. Here, no significant differences were observed between NHE1 W38<sup>-/-</sup> and NHE1 W38<sup>+/+</sup> birds regarding the proportion of monocytes, which are part of the innate immune system, nor in cellular components of the adaptive immune system, represented by B-cells,  $\alpha\beta$  and  $\gamma\delta$  T-cells (Figure 2; Supplementary Figure 1).

RCAS(J)eGFP infected NHE1 W38<sup>-/-</sup> and NHE1 W38<sup>+/+</sup> derived CEFs with RCAS(J)eGFP were cultured and screened for eGFP expression using fluorescence microscopy at 14 days post infection (dpi) (Figure 3). In addition, we quantified the infection level on 2 and 7 dpi by flow cytometry detecting eGFP fluorescence. No infection was observed in NHE1 W38<sup>-/-</sup> CEFs, while it was able to infect NHE1 W38<sup>+/+</sup> CEFs at 2 and 7 dpi with 5.6 and 8.1%, respectively (Figure 3).

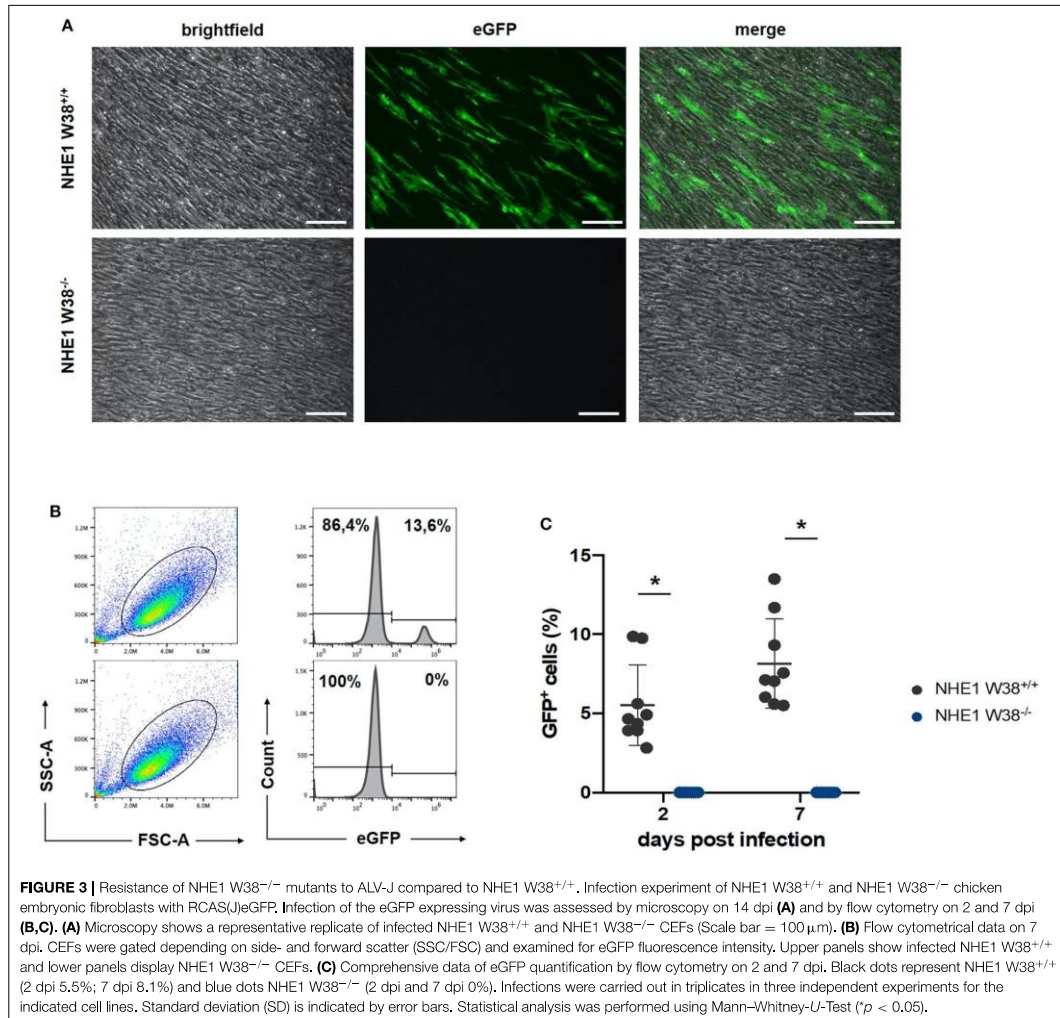


## DISCUSSION

Our findings demonstrate that cells from NHE1 W38<sup>-/-</sup> transgenic chicken are completely resistant to ALV-J infection. This is consistent with previous studies, which emphasized resistance based on W38 related deletions in chicken cell lines (Kucerova et al., 2013; Lee et al., 2017a; Koslova et al., 2018).

Based on the natural occurring mutation (NHE1 $\Delta$ W38) in ALV-J resistant birds (Kucerova et al., 2013), we generated chickens carrying the same genetic modification in a commercial great-grandparent White Leghorn line, which led to a complete resistance against ALV-J, as indicated by the abrogation of the cell-pathogen binding of RCAS(J)eGFP. Here, a retroviral vector which contains the ALV-J *env* gene served as a representative tool





to determine susceptibility to infection with ALV-J, as previously described (Kucerova et al., 2013).

Since maintaining NHE1 integrity is vital for cell physiology (Slepkov and Fliegel, 2002), it was a prerequisite to preserve the NHE1 function in the generated animals. Available data from gene edited mice indicate that atypical NHE1 activity is associated with physiological disorders (Bell et al., 1999). NHE1 mutant mice exhibited a decreased postnatal growth, increased mortality and disorders of the central nervous system. This phenotype was induced by targeted disruption of several amino acids within highly conserved domains, indicating their

critical importance for essential NHE1 functions. In contrast, we modified the first extracellular loop 1—a region, which has been shown to be functionally not dependent on high structural homogeneity (Shrode et al., 1998). This was done by deleting the single amino acid W38 of NHE1. Additionally, it was shown that W38-related deletions and substitutions naturally occur among avian species (Kucerova et al., 2013). Hence, the present modification in chickens is unlikely to interfere with physiological activity of NHE1 *in vivo*. Our phenotyping data confirmed this assumption of W38 being dispensable for NHE1 function *in vivo*.

The relevance of ALV-J as a constant threat for animal health worldwide is further supported by recent epidemiological research. Field studies report a broader spectrum of avian species to carry ALV-J susceptible alleles and thereby function as potential site of virus multiplication beside chicken, turkey and the red junglefowl (Plachy et al., 2017). Additionally, wild birds might be considered as potential reservoir for ALV-J, which was supported by the identification of ALV-J isolates among *Anseriformes* and *Passeriformes* (Jiang et al., 2014; Zeng et al., 2014).

During the process of finalizing this manuscript, Koslova et al. conducted a similar study (Koslova et al., 2020). The authors were able to induce a NHE1 W38 mutation in a CB line, which is an inbred chicken line characterized by a specific MHC-haplotype, known to affect susceptibility to viral diseases such as Marek's Disease Virus or Rous sarcoma virus (Miller and Taylor, 2016). The CB inbred line shows deficits in reproduction and in its general health constitution (Aumann, 2017). As previously reported, hens were artificially inseminated to increase the probability of fertilization (Koslova et al., 2020). This could be considered as a non-conventional way in the breeding practices of poultry production. Our study is the first work reporting the possibility of inducing the W38 mutation in livestock using relevant layer type chickens. Obtaining NHE1 W38<sup>-/-</sup> healthy birds leave no doubt that this mutation does not cause a pathological phenotype in chicken, which is impossible to fully investigate in the CB line due to their divergent physical constitution.

Despite of immense efforts that were spent on the development of effective vaccines against ALV-J, the virus continues to cause high economic losses and may evolve to increased pathogenicity (Feng and Zhang, 2016). Our genetically engineered NHE1 ΔW38 chicken line provides a valid alternative to reach ALV-J resistance compared to present breeding strategies that often lack effectiveness due to missing resistance alleles among affected populations (Reinisova et al., 2016; Whitworth et al., 2016). The direct introduction of disease resistance might be a favorable option along with

intensive eradication programs or preventive treatment based on vaccines.

The availability of genome-editing tools, notably CRISPR/Cas9, widens the scope of animal breeding and its applications in the context of disease control (Sid and Schusser, 2018). By generating an ALV-J resistant chicken line, we provide an efficient and valuable model for further gene-engineering in livestock, which may open new perspectives in disease control to improve animal welfare.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets generated for this study are available on request to the corresponding author.

## ETHICS STATEMENT

Animal experiments were approved by the Government of Upper Bavaria, License number 2018-09-23 ROB-55.2-2532. Vet\_02-18-9.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

BS and RP conceived and planned the project. BS, RH, HS, KL, VN, KF, BK, and LB designed the experiments. RH, HS, AS, and DB performed all experiments. TT, RH, HS, and KL analyzed the data and RH, HS, and BS wrote the manuscript.

## FUNDING

This project was funded by The Bavarian Research Foundation, Germany (AZ-1300-17).

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgeed.2020.00003/full#supplementary-material>

## REFERENCES

- Aumann, D. (2017). *Generierung Genetisch Modifizierter Hühnermodelle Für Die Immunologische Forschung* (Munich: veterinary department, LMU Munich), ediss:21157.
- Barnard, R. J., Elleder, D., and Young, J. A. (2006). Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: from classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion. *Virology* 344, 25–29. doi: 10.1016/j.virol.2005.09.021
- Bell, S. M., Schreiner, C. M., Schultheis, P. J., Miller, M. L., Evans, R. L., Vorhees, C. V., et al. (1999). Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures. *Am. J. Physiol.* 276, C788–C795. doi: 10.1152/ajpcell.1999.276.4.C788
- Chai, N., and Bates, P. (2006). Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J *Avian Leukosis Virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 5531–5536. doi: 10.1073/pnas.0509785103
- Chesters, P. M., Howes, K., Petherbridge, L., Evans, S., Payne, L. N., and Venugopal, K. (2002). The viral envelope is a major determinant for the induction of lymphoid and myeloid tumours by *Avian Leukosis Virus* subgroups A and J, respectively. *J. Gen. Virol.* 83, 2553–2561. doi: 10.1099/0022-1317-83-10-2553
- Elleder, D., Melder, D. C., Trejbalova, K., Svoboda, J., and Federspiel, M. J. (2004). Two different molecular defects in the Tva receptor gene explain the resistance of two tva<sup>r</sup> lines of chickens to infection by subgroup A avian sarcoma and *Leukosis Viruses*. *J. Virol.* 78, 13489–13500. doi: 10.1128/JVI.78.24.13489-13500.2004
- Elleder, D., Stepanets, V., Melder, D. C., Senigl, F., Geryk, J., Pajer, P., et al. (2005). The receptor for the subgroup C avian sarcoma and leukosis viruses, Tvc, is related to mammalian butyrophilins, members of the immunoglobulin superfamily. *J. Virol.* 79, 10408–10419. doi: 10.1128/JVI.79.16.10408-10419.2005
- Feng, M., and Zhang, X. (2016). Immunity to *Avian Leukosis Virus*: where are we now and what should we do? *Front. Immunol.* 7:624. doi: 10.3389/fimmu.2016.00624
- Jiang, L., Zeng, X., Hua, Y., Gao, Q., Fan, Z., Chai, H., et al. (2014). Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein gp85 of *Avian Leukosis Virus* subgroup J wild-bird isolates from Northeast China. *Arch. Virol.* 159, 1821–1826. doi: 10.1007/s00705-014-2004-8

- Klucking, S., Adkins, H. B., and Young, J. A. (2002). Resistance to infection by subgroups B, D, and E avian sarcoma and leukosis viruses is explained by a premature stop codon within a resistance allele of the tvb receptor gene. *J. Virol.* 76, 7918–7921. doi: 10.1128/JVI.76.15.7918-7921.2002
- Koslova, A., Kucerova, D., Reinisova, M., Geryk, J., Trefil, P., and Hejnar, J. (2018). Genetic resistance to *Avian Leukosis Viruses* induced by CRISPR/Cas9 editing of specific receptor genes in chicken cells. *Viruses* 10:605. doi: 10.3390/v10110605
- Koslova, A., Trefil, P., Mucksova, J., Reinisova, M., Plachy, J., Kalina, J., 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. U. S. A.* 117, 2108–2112. doi: 10.1073/pnas.1913827117
- Kucerova, D., Plachy, J., Reinisova, M., Senigl, F., Trejbalova, K., Geryk, J., et al. (2013). Nonconserved tryptophan 38 of the cell surface receptor for subgroup J *Avian Leukosis Virus* discriminates sensitive from resistant avian species. *J. Virol.* 87, 8399–8407. doi: 10.1128/JVI.03180-12
- Kurstak, E. M., Murphy, R. G., Murphy, F. A., and van Regenmortel, M. H. V. (2013). *Virus Variability, Epidemiology and Control* (Montreal, QC: Springer Science & Business Media).
- Lee, H. J., Lee, K. Y., Jung, K. M., Park, K. J., Lee, K. O., Suh, J. Y., et al. (2017a). Precise gene editing of chicken Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange type 1 (chNHE1) confers resistance to *Avian Leukosis Virus* subgroup J (ALV-J). *Dev. Comp. Immunol.* 77, 340–349. doi: 10.1016/j.dci.2017.09.006
- Lee, H. J., Lee, K. Y., Park, Y. H., Choi, H. J., Yao, Y., Nair, V., et al. (2017b). Acquisition of resistance to *Avian Leukosis Virus* subgroup B through mutations on tvb cysteine-rich domains in DF-1 chicken fibroblasts. *Vet. Res.* 48:48. doi: 10.1186/s13567-017-0454-1
- Lefkowitz, E. J., Dempsey, D. M., Hendrickson, R. C., Orton, R. J., Siddell, S. G., and Smith, D. B. (2018). Virus taxonomy: the database of the international committee on taxonomy of viruses (ICTV). *Nucleic Acids Res.* 46, D708–D717. doi: 10.1093/nar/gkx932
- Marsh, S. (2007). Pyrosequencing applications. *Methods Mol. Biol.* 373, 15–24. doi: 10.1385/1-59745-377-3:15
- Miller, M. M., and Taylor, R. L. Jr. (2016). Brief review of the chicken major histocompatibility complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance. *Poult. Sci.* 95, 375–392. doi: 10.3382/ps/pev379
- Payne, L. N. (1998). HPRS-103: A retro virus strikes back. The emergence of subgroup J *Avian Leukosis Virus*. *Avian Pathol.* 27, S36–S45. doi: 10.1080/03079459808419291
- Payne, L. N., and Nair, V. (2012). The long view: 40 years of avian leukosis research. *Avian Pathol.* 41, 11–19. doi: 10.1080/03079457.2011.646237
- Plachy, J., Reinisova, M., Kucerova, D., Senigl, F., Stepanets, V., Hron, T., et al. (2017). Identification of new world quails susceptible to infection with *Avian Leukosis Virus* subgroup J. *J. Virol.* 91, e02002–16. doi: 10.1128/JVI.02002-16
- Reinisova, M., Plachy, J., Kucerova, D., Senigl, F., Vinkler, M., and Hejnar, J. (2016). Genetic diversity of NHE1, receptor for subgroup J avian leukosis virus in domestic, chicken and wild anseriform species. *PLoS ONE* 11:e0150589. doi: 10.1371/journal.pone.0150589
- Schusser, B., Collarini, E. J., Yi, H., Izquierdo, S. M., Fesler, J., Pedersen, D., et al. (2013). Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 20170–20175. doi: 10.1073/pnas.1317106110
- Shen, Y., Cai, L., Wang, Y., Wei, R., He, M., Wang, S., et al. (2014). Genetic mutations of *Avian Leukosis Virus* subgroup J strains extended their host range. *J. Gen. Virol.* 95, 691–699. doi: 10.1099/vir.0.059915-0
- Shrode, L. D., Gan, B. S., D'Souza, S. J., Orłowski, J., and Grinstein, S. (1998). Topological analysis of NHE1, the ubiquitous Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger using chymotryptic cleavage. *Am. J. Physiol.* 275, C431–C439. doi: 10.1152/ajpcell.1998.275.2.C431
- Sid, H., and Schusser, B. (2018). Applications of gene editing in chickens: a new era is on the horizon. *Front. Genet.* 9:456. doi: 10.3389/fgene.2018.00456
- Slepko, E., and Fliegel, L. (2002). Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. *Biochem. Cell Biol.* 80, 499–508. doi: 10.1139/o02-151
- Venugopal, K. (1999). Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses. *Res. Vet. Sci.* 67, 113–119. doi: 10.1053/rvsc.1998.0283
- Wang, X., Zhao, P., and Cui, Z. Z. (2012). Identification of a new subgroup of *Avian Leukosis Virus* isolated from Chinese indigenous chicken breeds. *Bing Du Xue Bao* 28, 609–614.
- Weiss, R. A. (1993). *Cellular Receptors and Viral Glycoproteins Involved in Retrovirus Entry* (Boston: Springer). doi: 10.1007/978-1-4899-1627-3\_1
- Whitworth, K. M., Rowland, R. R., Ewen, C. L., Tribble, B. R., Kerrigan, M. A., Cino-Ozuna, A. G., et al. (2016). Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Nat. Biotechnol.* 34, 20–22. doi: 10.1038/nbt.3434
- Zeng, X., Liu, L., Hao, R., and Han, C. (2014). Detection and molecular characterization of J subgroup *Avian Leukosis Virus* in wild ducks in China. *PLoS ONE* 9:e94980. doi: 10.1371/journal.pone.0094980
- Zhang, Q. C., Zhao, D. M., Guo, H. J., and Cui, Z. Z. (2010). Isolation and identification of a subgroup A *Avian Leukosis Virus* from imported meat-type grand-parent chickens. *Virolog. Sin.* 25, 130–136. doi: 10.1007/s12250-010-3095-3

**Conflict of Interest:** RP was employed by the company EW group GmbH.

The remaining authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Hellmich, Sid, Lengyel, Flisikowski, Schlickenrieder, Bartsch, Thoma, Bertzbach, Kaufer, Nair, Preisinger and Schusser. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



## *Supplementary Material*

### **Animals**

Eggs from a commercial great-grandparent White Leghorn line (LSL) were obtained from Lohmann-Tierzucht GmbH (Cuxhaven, Germany). Chickens were housed in S1 animal facility designed for genetically modified chickens at the TU Munich (School of Life Sciences, Weihenstephan TU Munich). Water and commercial feed were provided ad libitum. Animal experiments were conducted according to current law and were approved by the government of Upper Bavaria (experiment license ROB-55.2-2532.Vet\_02-18-9).

Germline chimeras and genetically modified birds were generated as previously described [34]. Briefly, chimeric roosters were screened for the presence of modified sperm based on sperm-DNA analysis via pyrosequencing. Homozygous birds were generated by crossing the heterozygous birds (NHE1 W38<sup>+/-</sup>).

### **Derivation and culture of cells**

LSL PGCs were derived from blood of embryonic vasculature at stages 13-15 according to Hamburger and Hamilton as described before [35]. PGCs were derived from male embryos and cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> environment using modified KO-DMEM as described previously [36].

Chicken embryonic fibroblasts (CEFs) were isolated according to a previously established protocol [37] from chNHE1 W38<sup>+/+</sup> and NHE1 W38<sup>-/-</sup> embryos on the 10<sup>th</sup> embryonic day (ED). Prior to isolation of CEFs, genotyping of embryos was done by collecting blood at ED10 preparing a window of 0,5cm<sup>2</sup> in the eggshell that allowed to access the embryonic vasculature. CEFs were cultured using Iscove's liquid medium containing stable glutamine (Biochrom, Germany), and was supplemented with 5% fetal bovine serum (FBS) Superior (Biochrom, Germany), 2% chicken serum (ThermoFisher Scientific, USA) and 1% Penicillin-Streptomycin-Solution (Penicillin 10,000 U/ml and Streptomycin 10 mg/ml) (Biochrom, Germany). Subsequently, CEFs were incubated at 40°C in 5% CO<sub>2</sub> atmosphere on 100x17mm petri dishes (ThermoFisher Scientific) until infection.

## Supplementary Material

The DF-1 fibroblast cell line was obtained from the Federal Research Institute for Animal Health (FLI Riems, Germany). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% FBS and 1% Glutamax and were incubated at 40°C, 5% CO<sub>2</sub>.

**Gene-editing in Primordial Germ Cells (PGCs)**

A single guide RNA (sgRNA) targeting the first exon of the chicken NHE1 gene was designed (Suppl. table 1) using the following website: <https://benchling.com/crispr> and cloned into the vector backbone, pSpCas9(BB)-2A-eGFP (PX458) (Addgene, USA), that contains eGFP as a selectable marker. A single-stranded oligodeoxynucleotide (ssODN) was synthesized (Suppl. table 1) by Integrated DNA Technologies (IDT, USA) to serve as a repair template [18].

For transient transfection of PGCs, a total of  $5 \times 10^6$  cells were washed with phosphate-buffered saline (PBS) and resuspended in 100µl premixed transfection solution, containing 10µg targeting vector (PX458-sgRNA), 10µg ssODN in Nucleofector<sup>TM</sup> Solution V (Lonza, Germany). Electroporation was performed using an ECM 830 Square Wave Electroporation System (BTX, USA), applying eight square wave pulses (350V, 100µsec). Subsequently, the cell suspension was mixed with 500µl PGC Medium and incubated for 5 min at 37°C to allow cell recovery. Finally, cells were resuspended in the appropriate amount of culture medium and cultured under regular conditions for the following 48h. Next, the transfected cell pool was prepared for fluorescence activated cell sorting (FACS) using BD FACSAria<sup>TM</sup> Fusion Cell Sorter (BD Biosciences, USA). Briefly, PGCs were washed with PBS and resuspended to  $2,5 \times 10^6$  cells/ml in CO<sub>2</sub> independent Medium (ThermoFisher Scientific, USA), including 10% FBS and 1% Glutamax (ThermoFisher Scientific, USA) and sorted based on eGFP fluorescence. Selected eGFP-positive PGCs were plated on a 48-well plate in limiting dilution in order to expand single cell clones.

**RCAS(J)eGFP propagation and infection of CEFs**

A modified retroviral RCAS(J)eGFP vector was used for infection experiments [17]. The vector was generated by replacing the RCAS envelope with the original sequence of the ALV-J (HPRS-103 strain) envelope gene. In order to propagate RCAS(J)eGFP-virus for infection experiments, DF-1 cells were

transfected with 500ng RCAS(J)eGFP-DNA using ViaFect™ Transfection Reagent (Promega, USA) at a 6:1 ratio of ViaFect™ Transfection Reagent:DNA, according to the manufacturer's instructions. 32 days post transfection, RCAS(J)eGFP-virus enriched supernatant was collected, centrifuged for 10 min at 1000 x g at 4 °C and subsequently stored at -80°C for further experiments.

24h prior to RCAS(J)eGFP infection, CEFs were seeded into 6-well plates (1x10<sup>5</sup> per well). CEFs were infected using 100µl of RCAS(J)eGFP enriched supernatant, while control wells were kept uninfected.

#### **Genotyping and Pyrosequencing**

Sanger Sequencing was performed in order to confirm the NHE1 W38 mutation and T96G substitution. Genomic DNA was extracted from cell pellets or blood using ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System (Promega, USA). PCR amplification of the targeted NHE1 region was done with 5x FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne, Estonia) and gene specific primers (Suppl. Table 1), using an annealing temperature of 59,4°C. The resulting amplicon was gel-purified using E.Z.N.A.® Ultra-Sep® Gel Extraction kit (OmegaBiotek, USA) and subsequently cloned into pGEM®-T Easy Vector System I (Promega, USA) according to the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was extracted by PureYield™ Plasmid Miniprep System (Promega, USA) and sent for Sanger Sequencing (Eurofins, Germany).

A restriction enzyme digest was conducted in order to track the presence and functionality of the introduced Bsa1 restriction site. gDNA from blood of the generated transgenic birds was isolated to amplify the NHE1 region harbouring the Bsa1 site using primer #1 and 2 (Suppl. table 1) and 5 x FIREPol® Master Mix (Solis BioDyne, Estonia). 600ng of the resulting amplicon were digested with 10U Bsa1 (New England Biolabs, USA) for 1h at 37°C and subsequently analysed by gel electrophoresis.

Pyrosequencing was carried out for allelic quantification of the TGG deletion in sperm of germline chimeras and the detection of modified offspring. For that purpose, a PCR was performed to generate a sequencing template, using 5x FIREPol® Master Mix and gene specific primers (Suppl. table 1). The pyrosequencing reaction was performed based on the resulting amplicon using PyroMark Q48 Advanced Reagents (4 x 48) and PyroMark Q48 Autoprep (QIAGEN, Germany). A sequencing primer was designed, to bind upstream of the induced TGG deletion, that allows sequence analysis of

## Supplementary Material

C[TGG]GAGCAGCCG (primer #4, Suppl. table 1). Both assays, AQ (allelic quantification) and SNP (genotyping), were designed via PyroMark Assay Design Software (QIAGEN, Germany). Data were analysed by PyroMark Q48 Autoprep 2.4.2 software (QIAGEN, Germany).

**FACS analysis**

Susceptibility of modified CEFs and WT CEFs to RCAS(J)GFP was determined by flow cytometry. Cells were detached using 1xTrypsin/EDTA Solution, washed with PBS and resuspended in Fluo-Buffer (PBS containing 1% Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, USA) + 0,01% NaN<sub>3</sub>-solution (Applichem, Germany) to a final concentration of 2x10<sup>6</sup> cells/ml.

The immunophenotype of genetically modified birds was analysed based on the number of peripheral blood mononuclear cells (PBMCs). Cells were isolated from blood of 14 days-old chickens by standard density gradient centrifugation (Biocoll separating solution, Biochrom, Germany). A total of 1x10<sup>6</sup> PBMCs per well were plated on a 96-well round bottom plate and stained for 20min on ice, applying following unlabelled primary antibodies (Southern Biotech, USA): Mouse anti-chicken TCR $\gamma\delta$  (TCR-1), mouse anti-chicken TCR $\alpha\beta$ /V $\beta$ 1 (TCR-2) + mouse anti-chicken TCR $\alpha\beta$ /V $\beta$ 2 (TCR-3), mouse anti-chicken Bu1 (AV20), mouse anti-chicken KUL01 (KUL01). Unbound antibodies were removed by washing with PBS. Next, cells were incubated for 20 min on ice with goat anti-mouse IgG(H+L)-APC (Southern Biotech, USA). In a final step, cells were washed with PBS and resuspended in 400 $\mu$ l Fluo-Buffer.

Fluorescence was measured using BD Accuri™ C6 flow cytometer (BD Biosciences, USA). Gating strategy is provided in supplementary figure 1. Data was analysed with FlowJo 10.4.1 software (FlowJo, LLC 2006-2017, USA).

**Statistical analysis**

Statistical analysis was carried out using SPSS24 statistics (version 24.0.0.0) software (IBM, USA). Normally distributed data (Shapiro-Wilk test  $p > 0,05$ ) were analysed by student's T-Test. The Mann-Whitney-U Test was applied for not normally distributed data.

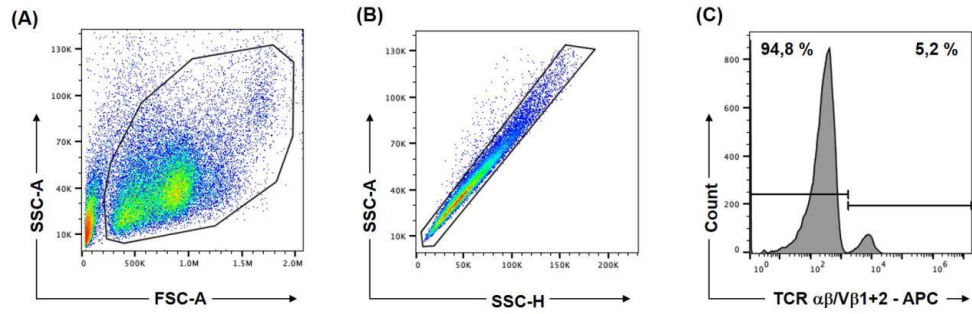
Graphs were constructed using GraphPad Prism (version 8.0.1 145) (GraphPad Software, USA).

**Table 1. List of designed ssODN and oligos**

| Construct name                       | Type                              | Purpose                              | Sequence (5' - 3')   |
|--------------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|--|
| chNHE1 sgRNA                         | single RNA                        | guide<br>CRISPR/Cas9 targeting       | ACCTGGGAGCAGCCGTGGGG<br>(PAM: CCC)<br><br>GCCCCTGCTGCCCGGCCAGCGCTTG<br>CAGGCCGACGCCACGCGGGTCTCCG<br>AGCCACCGAGCAGCCGTGGGGAGA |
| chNHE1 ssODN                         | repair construct                  | HDR                                  | GCCCGGGGTATCACCGCCGCCCG<br>CTGGCCACGGCCAGGAGGTGCACC<br>CGCTGAACAAACAGCACCACAACCA<br>CTC                                      |
| P1<br>(chNHE1<br>5' flanking region) | primer (forward)                  | Sanger Sequencing,<br>BsaI treatment | GCACCTCACGCCTGTGCAAC   |
| P2<br>(chNHE1-Exon1)                 | primer (reverse)                  |                                      | GGGATGCGGACGTGCGAGTA   |
| P3<br>(chNHE1-Exon1)                 | primer (forward)                  | Pyrosequencing                       | CCTTCCCTGGGCTCTGCT   |
| P4<br>(chNHE1-Exon1)                 | primer (reverse,<br>biotinylated) |                                      | [BIOT]GATACCCCGGGCTCTCC  |
| P5<br>(chNHE1-Exon1)                 | primer (forward)                  |                                      | GTCTCCGAGCCCAC   |



## Supplementary Material



**Supplementary figure 1. Gating strategy applied for immunophenotypic analysis by flow cytometry.**

Representative flow cytometry data from WT peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) is shown. Gating strategy was applied for each individual sample. **a**, Lymphocyte population within PBMCs was identified and gated using SSC-A/FSC-A plot. **b**, SSC-A and SSC-H were used to eliminate doublets. **c**, Sequential histogram shows APC-fluorescent and non-fluorescent populations to identify major lymphocyte cell subsets as  $\gamma\delta$  T-cells,  $\alpha\beta$  T-cells (TCR  $\alpha\beta/V\beta 1+2$ ) and B-cells as well as monocytes.

## 5. DISKUSSION

### 5.1. Gentechnisch herbeigeführte ALV-J Resistenz

Ziel dieser Studie war die Etablierung und Charakterisierung einer mittels Gen-Editierung erzeugten, ALV-J resistenten, kommerziellen Hühnerlinie. Die gentechnisch herbeigeführte Krankheitsresistenz muss im Weiteren auf die Effizienz als Präventivmaßnahme sowie bezüglich der Anwendbarkeit in der Nutztierhaltung diskutiert und überprüft werden.

#### 5.1.1. Modifikation des chNHE1

Die Grundlage zur Erzeugung einer ALV-J Resistenz im Huhn lieferte die Identifizierung des entsprechenden Wirtszellrezeptors chNHE1 [104]. Die ALV-J-Bindestelle besteht aus insgesamt zwölf Aminosäuren [106]. Von diesen spielt die Aminosäure W38 eine entscheidende Rolle und kann daher als molekulares Zielelement für das Gen-Targeting in Betracht gezogen werden [105].

Neben der Elimination der Aminosäure W38 sind noch weitere Optionen für die Etablierung ALV-J resistenter Hühner denkbar. Zunächst lassen sich zahlreiche Varianten von der entsprechenden NHE1-Aminosäuresequenz ALV-J resistenter Vogelspezies ableiten. Die Mehrzahl der untersuchten Spezies weisen anstelle der W38 weitreichendere Aminosäurepolymorphismen entlang der gesamten ALV-J Bindestelle von Aminosäureposition 28 – 39 auf (Abbildung 4) [105].

Zellkulturexperimente zeigen weiterhin, dass eine vollständige ALV-J Resistenz auch unter Erhalt der W38 durch Aminosäurepolymorphismen an Positionen 32 und 34-37 möglich ist [108]. Ebenfalls kommt den Aminosäuren T37 und Q40 eine große Bedeutung in der Virus-Rezeptor-Bindung zu. Deletionen der jeweiligen Aminosäure führten zu einer signifikanten Reduktion der ALV-J Infektion *in vitro*, nicht aber zur vollständigen ALV-J Resistenz. Zelllinien mit Deletion der Aminosäuren W38 sowie T37 und Q40 zeigten trotz fehlender W38 keinen vollständigen Schutz, sondern lediglich eine stark reduzierte Empfänglichkeit gegenüber ALV-J [108]. Diese Beobachtungen zeigen, dass die Unterbindung der ALV-J-Rezeptor-Interaktion nur bedingt auf eine W38 Deletion zurückzuführen ist, da die Virus-Rezeptor-Interaktion von der Gesamtstruktur der Bindestelle abhängt, die stark, aber nicht ausschließlich von W38 abhängt.

Umfassendere Sequenzänderungen der ALV-J Bindestelle in Form von Aminosäurepolymorphismen oder größeren Aminosäuredeletion könnten sich im Hinblick auf das Risiko der Adaptation des Virus an eine neu erstellte Rezeptor-Struktur als vorteilhaft erweisen. Hierbei kann jedoch auch das Risiko eines negativen Effektes auf physiologische Funktionen des chNHE1 erhöht sein. Im Hinblick auf die Generierung einer ALV-J resistenten Hühnerlinie wäre eine gestörte Funktion des chNHE1 nicht akzeptabel, da dies enorme Auswirkungen auf die Zellphysiologie im Bereich der pH-Wert Regulation und des Zellwachstums hätte [141]. Im Mausmodell gehen ausgeprägte Entwicklungsstörungen und zentralnervöse Störungen mit einem Funktionsverlust des NHE1 durch umfangreiche Deletionen hoch konservierter Regionen des NHE1-Gens einher [142]. Eine geringfügigere Modifikation stellt dahingegen vermutlich ein geringeres Risiko negativer Effekte auf die NHE1 Funktion dar. Die W38 Deletion ist nach aktuellem Kenntnisstand die geringstmögliche Mutation des ALV-J Rezeptors, die zu einer vollständigen ALV-J Resistenz im Huhn führen könnte. Dass sich eine solche NHE1-Variante analog im Chukarhuhn wiederfinden lässt [105] spricht ebenfalls dafür, dass eine chNHE1 $\Delta$ W38 Mutation für die Funktionalität des NHE1 unbedeutend ist. Des Weiteren ist eine geringfügige Modifikation in Bezug auf die natürlich vorkommende Ursprungsvariante im Hinblick auf die Verbraucherakzeptanz positiv zu bewerten.

Das Targeting der chNHE1 W38-kodierenden Gensequenz wurde unter Verwendung von CRISPR/Cas9 und eines ssODN als *repair template* mittels HDR durchgeführt, da dies eine bewährte Methode darstellt, um geringfügige Mutationen in Hühnerzellen vorzunehmen [143, 144]. Die verwendete Sequenz wurde bereits erfolgreich zur Deletion der W38 in Hühnerfibroblasten eingesetzt [108]. In dieser Studie konnte eine hohe Targeting-Effizienz des chNHE1 mit 75% korrekt editierter PGC Klone erreicht werden. Diese liegt deutlich über der in Hühnerfibroblasten erreichten Effizienz von etwa 7% [108]. Unter Nutzung des gleichen *repair templates* ist eine ähnlich gute Rate von 88% in PGCs beschrieben [110]. Unabhängig des Genlokus werden ebenfalls gute Targeting-Effizienzen mittels ssODN-medierter homologer Rekombination in PGCs erreicht [145]. Die hier erreichten Targeting-Effizienzen bestätigen die gute Eignung des CRISPR/Cas9 Systems in Kombination eines ssODN als *repair template* hinsichtlich geringfügiger Modifikationen in PGCs.

### 5.1.2. Gentransfer

In dieser Studie kam die derzeitige Standardmethode des Gentransfers zum Einsatz. Nachteilig hierbei ist der hohe Zeit- und Kostenaufwand der PGC Kultur. Dieser konnte jedoch durch Vorarbeiten bezüglich der Kultur- und Transfektionsbedingungen und die Etablierung einer sicheren Injektionstechnik reduziert werden [71]. Die Zeit zwischen Transfektion und Reimplantation der PGCs wird außerdem zur Selektion transfizierter Zellen, der Etablierung klonaler Zelllinien und einer abschließenden Überprüfung der erzeugten Modifikation benötigt. Dies ermöglicht die Auswahl einer korrekt editierten PGC Linie für den Gentransfer und ist bei alternativen Gentransfer Verfahren, welche die PGC Kultur umgehen nicht möglich [6, 8].

Die korrekte Integration des ssODN in PGCs wurde mittels Sanger Sequenzierung anhand der Deletion der W38-kodierenden Sequenz 5'-TGG-3' sowie einer zusätzlich eingefügten T96G Basensubstitution bestätigt. Für die nachfolgende Analyse der Keimbahnchimären und gen-editierter Nachkommen wurde aufgrund zeitaufwändiger Probenaufbereitung für die Sanger Sequenzierung auf ein anderes System zurückgegriffen. Eine klassische PCR ist bei der geringfügigen Modifikation eines einzigen Basentriplets ungeeignet, da hierbei ein erhöhtes Risiko der Fehlbindung entsprechender Primer besteht. Sensitivere Methoden stellen *real-time* PCR-basierte Verfahren sowie die Pyrosequenzierung dar [146-148]. Während eine TaqMan<sup>TM</sup>-basierte *real-time* PCR durch die mögliche Fehlbindung der Sonde für diese Anwendung fehleranfällig wäre [149], gilt die sogenannte *high resolution melt analysis* (HRM) als recht kostengünstige und für die Detektion von *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) gut geeignete Alternative [150]. Die Unterscheidung heterozygoter Tiere von homozygoten Tieren gelang hier jedoch nicht präzise genug, da die Schmelzkurven der jeweiligen Genotypen teils recht großen Schwankungen unterlagen. Die Genotypisierung wäre anhand des HRM zwar möglich gewesen, hätte jedoch weiterer Überarbeitung bedurft. Die Ergebnisse der Pyrosequenzierung waren dagegen weniger anfällig für Schwankungen in der Qualität des Ausgangsmaterials oder der Pipettiergenauigkeit, da die zu untersuchende Gensequenz vorab durch konventionelle Endpunkt-PCR amplifiziert wird [151]. Insgesamt gelang die Detektion der TGG Deletion sowie der T96G Substitution mittels Pyrosequenzierung sehr zuverlässig. Der Nachweis beider Modifikationen

innerhalb einer Reaktion war jedoch aufgrund des Abstands der TGG Deletion von der T96G Substitution nur unter Einschränkung der Sequenzierungsqualität nachvollziehbar. Die Pyrosequenzierung wurde auf Grundlage der TGG Deletion standardmäßig für die Genotypisierung der erzeugten Hühner eingesetzt. Darüber hinaus stellt die Möglichkeit der quantitativen Erfassung der TGG Deletion einen Vorteil in der Evaluierung der Keimbahnchimären dar. Der prozentuale Anteil genetisch veränderter Spermien im Ejakulat konnte mithilfe einer in der PyroMark Q48 Software integrierten Funktion zur Allel-Quantifizierung bestimmt und somit zur genaueren Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission genutzt werden. Anhand der durch die Pyrosequenzierung ermittelten Daten wurden drei Keimbahnchimären ausgewählt, die tatsächlich Keimbahntransmission zeigten. Eine Quantifizierung gen-editierter Spermien im Ejakulat der Keimbahnchimären ist somit ein wertvoller Hinweis zur Einschätzung der Wahrscheinlichkeit einer Keimbahntransmission. Da die Anzahl editierter und nicht-editierter Nachkommen von der Effizienz der Keimbahntransmission abhängt, ist dies ein Schlüsselement in Bezug auf die Reduktion der benötigten Tierzahl bei der Generierung genetisch veränderter Hühner. Aus diesem Grund sind unterschiedliche Quantifizierungsversuche gen-editierter Spermien in vorigen Studien etabliert worden, welche auf durchflusszytometrischen oder *real-time* PCR-basierten Verfahren beruhen [8, 152]. Bei geringfügigen Modifikationen wie der hier generierten TGG Deletion ist die Durchflusszytometrie jedoch aufgrund eines fehlenden Fluoreszenzmarkers nicht und ein *real-time* PCR-basiertes Verfahren aufgrund geringer Spezifität nur bedingt geeignet.

Um die Genauigkeit der Quantifizierung durch die Pyrosequenzierung weiter überprüfen zu können, müsste eine größere Anzahl an Keimbahnchimären nach voriger Evaluierung durch die Pyrosequenzierung auf Transmissioneffizienz getestet werden. Dies ist in dieser Studie zugunsten der Reduktion der Gesamt tierzahl des Tierversuchsvorhabens unterlassen worden. Es wäre denkbar, das hier etablierte Verfahren in zukünftigen Studien zu nutzen, um die Vorhersagekraft einer möglichen Keimbahntransmission verfeinern zu können.

### 5.1.3. Phänotyp

Zur Überprüfung der erstellten Hühnerlinie auf ALV-J Resistenz wurde ein bewährtes Testsystem zum Nachweis einer ALV-J Infektion eingesetzt. Hierbei handelt es sich um die Infektion embryonaler Hühnerzellen mit RCAS(J)eGFP

[105, 108, 109]. RCAS (*replication-competent avian sarcoma-leukosis virus with a splice acceptor*) ist ein Replikations-kompetenter Vektor, der häufig zur stabilen Transduktion von Genen in aviären Zellkultursystemen und Studien zur retroviralen Replikation verwendet wird [153]. Durch Austausch der Hüllprotein kodierenden Sequenzen des RCAS mit der des ALV-J wurde der Assay zum Nachweis einer ALV-J Infektion anhand stabiler eGFP (*enhanced green fluorescent protein*) Expression infizierter Zellen modifiziert [105].

In Übereinstimmung mit vergleichbaren Studien in Hühnerfibroblasten und PGCs fand keine RCAS(J)eGFP Infektion der chNHE1W38<sup>-/-</sup> Zellen statt, während in der chNHE1W38<sup>+/+</sup> Kontrollgruppe eine progressive Infektion nachgewiesen wurde [108, 110]. Diese Ergebnisse deuten auf eine vollständige ALV-J Resistenz der erstellten Hühnerlinie hin. Eine abschließende Bestätigung der ALV-J Resistenz *in vivo* ist im Anschluss an die hier beschriebene Studie geplant. Dazu ist eine Infektion mit ALV Feldstamm HPRS-103 und anschließendem Nachweis anhand einer Virämie, der Bildung spezifischer Antikörper und initialer Tumorveränderungen vorgesehen. Der geplante Versuchsaufbau unterscheidet sich von der kürzlich veröffentlichten Studie von Koslová et al. in der Verwendung eines ALV-J Feldstammes. Die von Koslová et al. veröffentlichten *in vivo* Versuche wurden mit RCAS-basierten, ALV-J spezifischen Isolaten durchgeführt, die im Feld nicht existieren [110]. Die aus der hier beschriebenen Studie hervorgehende Untersuchung kann damit erstmalig den eindeutigen Nachweis einer ALV-J Resistenz der NHE1ΔW38 erzeugten Hühnerlinien unter Feldbedingungen liefern.

In beiden Studien waren keine Hinweise auf negative phänotypische Effekte durch die erzeugte Genvariante ersichtlich. Dies bezieht sich auf die in dieser Arbeit durchgeführte Untersuchung des Immunprofils, der Wachstumsrate und des allgemeinen Gesundheitszustands sowie auf die Beurteilung der Fertilität von Koslová et al. [110]. Von weiterführenden Untersuchungen wurde aufgrund dieser Erkenntnisse zunächst abgesehen.

## 5.2. Gen-Editierung als virale Kontrollstrategie

### 5.2.1. Effektivität

Die durch Gen-Editierung vermittelte Virusresistenz kann durch Mutationen seitens des Wirtszellgenoms oder des Virus selbst begrenzt sein. Retroviren sind aufgrund

ihrer hohen Antigenvariabilität sehr anpassungsfähig [154]. Die durch diese Eigenschaft hervorgehenden *Escape*-Mutanten sind ein bekanntes Problem in der Impfstoffentwicklung. Dieser natürliche, unkontrollierbare Prozess der Wirt-Virus Koevolution wirft Fragen im Zusammenhang einer gentechnisch herbeigeführten Resistenz bezüglich der Dauer und Zuverlässigkeit des antiviralen Schutzes auf [133, 155].

Im Hinblick auf ALV-J würde dies bedeuten, dass bei entsprechender Mutation des *gp85* ein W38-unabhängiger Mechanismus für den Zelleintritt genutzt werden könnte, was zur Aufhebung der Resistenz führt. Koslová et al. greifen diese Hypothese auf, indem sie innerhalb der Infektionsversuche RCAS(J)eGFP vier weitere ALV-J Varianten einsetzen [110]. Die *chNHE1W38<sup>-/-</sup>* Hühner waren gegenüber allen fünf Varianten resistent, was vermuten lässt, dass die Diversifizierung des ALV-J bisher keine Auswirkung auf den Mechanismus der Rezeptorbindung haben könnte. Dieses Ergebnis ist zunächst nur hinweisgebend, da die Infektion nicht mit natürlich vorkommenden Feldvirus Isolaten durchgeführt wurde. Darüber hinaus bilden die ausgewählten Varianten nur einen geringen Anteil der bisher bekannten 41 ALV-J Varianten ab [156]. Zur Klärung dieser Fragestellung sind Folgestudien denkbar, die dies anhand eines größeren Spektrums an ALV-J Varianten untersuchen. Außerdem sollte das langfristige Adaptionsvermögen an die *chNHE1ΔW38* Struktur zukünftig überprüft werden.

Die Problematik der Anpassungsfähigkeit von Erregern an Schutzstrategien betrifft neben der Gen-Editierung auch andere verfügbare Präventionsmaßnahmen [154]. Da Mutationen ein Zufallsprodukt sind, kann nicht vorhergesagt werden wie lange ein Schutzmechanismus wirksam ist. In einer vollständig resistenten Population kann das Virus jedoch nicht zirkulieren und folglich während der Replikation mutieren. In diesem Fall ist die Wahrscheinlichkeit der Entwicklung neuer Varianten am geringsten. Bezüglich des ALV-J ist die Implementierung der Virusresistenz in kommerziellen Zuchtherden denkbar, dennoch bleibt ein Virus Reservoir in extensiv genutzten Hühnerrassen, Puten, dem Bankivahuhn sowie möglicherweise auch innerhalb anderer Wildvogelarten bestehen. Erste Anzeichen, dass Wildvögel potenziell als ALV-J Vektor fungieren könnten sind bereits 2014 in China veröffentlicht worden [120, 121]. Eine Etablierung des ALV-J innerhalb migrierender Vogelpopulationen hätte enorme Auswirkungen auf das Risiko erneuter globaler Ausbrüche.

Ob durch die Gen-Editierung prinzipiell ein vollständiger oder nur teilweiser Schutz erzeugt werden kann, hängt sowohl von dem viralen Lebenszyklus als auch von den Wirtskomponenten ab, die darin eine Rolle spielen. Die entsprechende Modifikation darf einerseits nicht mit der physiologischen Funktion der Wirtskomponente interferieren, muss andererseits aber essenziell für die Virus-Interaktion sein. Ein Beispiel dafür liefert die Erzeugung *porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV)*-resistenter Schweine. Die Ausschaltung des entsprechenden Wirtszellrezeptors mittels NHEJ resultierte in vollständiger PRRSV Resistenz, beeinträchtigte jedoch die physiologische Funktion des Rezeptors [157]. Durch Beschränkung der Modifikation auf die Bindestelle des Virus konnte dies in einem alternativen Ansatz umgangen werden [158, 159]. Neben der Erzeugung neuer Genvarianten ermöglicht die Gen-Editierung artübergreifende Gensubstitution. Dies konnte am Beispiel der Afrikanischen Schweinepest erfolgreich gezeigt werden, indem ein Resilienz-Gen des Wildschweins im Hausschwein gentechnisch rekonstruiert wurde [160]. Nachteil einer Resilienz ist, dass die Tiere weiterhin ein Virusreservoir darstellen, weshalb die Erzeugung einer vollständigen Resistenz zu bevorzugen ist [161].

### 5.2.2. Anwendbarkeit

Die Verwendung wirtschaftlich relevanter Hühnerlinien ist Grundvoraussetzung zur Nutzung ALV-J resistenter Tiere in der modernen Geflügelwirtschaft. Die hier verwendeten PGCs entstammen einer der vier Großelternlinien der kommerziell genutzten Linie *Lohmann-selected Leghorn (LSL)*. Weltweit haben White Leghorn Hühner hinsichtlich der Eiproduktion die größte wirtschaftliche Bedeutung [162]. Mit der in dieser Studie erstellten Hühnerlinie kann somit ein Beitrag zur ALV-J Prävention über den wissenschaftlichen Erkenntnisgewinn hinaus geleistet werden. Um die züchterische Implementierung der relevanten Genvariante effizienter zu gestalten, wäre eine Etablierung der Genvariante in allen vier Großelternlinien denkbar.

Im Gegensatz dazu kann die von Koslová et al. erstellte ALV-J resistente CB-Hühnerlinie neben ihrer wissenschaftlichen Bedeutung nicht direkt zur Verbesserung der Tiergesundheit beitragen, da es sich hierbei um eine rein experimentell verwendete Inzuchtlinie handelt [163]. Somit ist eine Einkreuzung in kommerziell relevante Hühnerlinien aufgrund des Inzuchthintergrundes und der damit einhergehenden Verarmung genetischer Diversität ausgeschlossen. Die



Inzuchtdepression schlägt sich unter anderem in geringer Fertilität und reduziertem allgemeinen Gesundheitszustand nieder [71]. Des Weiteren weisen Hühner dieser Linie immunologische Besonderheiten auf, die deren Anfälligkeit gegenüber bestimmter viraler Erreger beeinflussen [164].

Um einen möglichst weitreichenden Schutz des Wirtschaftsgeflügels gegenüber ALV-J zu erreichen, wäre die Erstellung der entsprechenden Genvariante innerhalb weiterer Hühnerrassen sinnvoll. Da ALV-J bevorzugt auch in Masthühnern auftritt [81], ist die Generierung von ALV-J resistenten Mastlinien ein weiterer denkbarer Schritt. Die hier beschriebene Strategie ließe sich möglicherweise auch auf Puten übertragen, da die Aminosäuresequenz der ALV-J Bindestelle mit der des Haushuhns übereinstimmt [105]. Die Gen-Editierung in Puten ist jedoch bisher nicht beschrieben worden, was einen direkten Übertrag erschwert.

Wirtschaftliches Interesse an ALV-J resistenten Hühnern könnte aktuell vor allem im asiatischen Raum bestehen, da ALV-J hier sowohl in Legehühnern als auch Masthühnern unverändert persistiert [127]. Einer derzeitigen Verwendung genetisch modifizierter Organismen (GMOs) auf kommerzieller Ebene stehen jedoch neben der zeitintensiven züchterischen Implementierung in Hühnerherden fehlende Langzeitstudien des hier verwendeten CRISPR/Cas9 Systems, gesetzliche Regulationen sowie eine differente Verbraucherakzeptanz entgegen.

### **5.3. Ausblick: Gen-Editierung in kommerzieller Hühnerzucht**

Die Leistungsfähigkeit moderner Nutztiere gründet auf jahrhundertelangen Zuchtprogrammen. Ein Nebeneffekt langjähriger Selektion zu Gunsten weniger Leistungsmerkmale ist die deutliche Reduktion der genetischen Diversität unserer Nutztierspezies [37]. Dagegen ermöglicht die Gen-Editierung die Erzeugung und Korrektur von Genvarianten, wobei andere Merkmale unberührt bleiben [36, 165]. Auf diese Weise kann die Gen-Editierung konventionelle Zuchtmethoden ergänzen.

Die Machbarkeit und Effizienz der Gen-Editierung mittels CRISPR/Cas9 konnte bereits in zahlreichen Nutztierspezies demonstriert und zur Krankheitsprävention genutzt werden [165]. Im Huhn ist dies erstmals anhand ALV-J resistenter Tiere beschrieben worden [110, 166]. Somit bietet die Gen-Editierung ein neu erworbenes und präzises Werkzeug zur Kontrolle von Tierseuchen, welches eine

wertvolle Alternative zu Eradikationsmaßnahmen und zur Immunprophylaxe darstellt. Wichtige Aspekte der Prävention wie Hygiene- und Herdenmanagement sowie Früherkennung durch Diagnostik können dadurch jedoch nicht ersetzt werden. Im Wirtschaftsgeflügel wird die Gen-Editierung zurzeit im Zusammenhang mit der Prävention aviärer Influenza wissenschaftlich diskutiert und erprobt [161]. Ein möglicher Ansatz kann die Modifikation einer dem Wirtszellrezeptor nachgeschalteten Komponente sein. In diesem Fall stellt das *acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32-A (ANP32A)* ein mögliches Zielgen dar, da das Protein essenziell für die Funktion der viralen Polymerase ist [167].

Von der züchterischen Anwendung der Gen-Editierung kann die landwirtschaftliche Nutztierhaltung nicht nur auf Ebene der Tiergesundheit durch nachhaltige Erregerkontrolle, sondern auch hinsichtlich einer nachhaltigen Produktion tierischer Produkte und des Tierwohls profitieren [168]. Ein solches Anwendungsgebiet liegt beispielsweise in der Aufzucht von Legelinien. Eine frühzeitige Erkennung und Auslese männlicher Bruteier mittels Gen-Editierung kann eine Alternative zur Tötung männlicher Eintagsküken in der Ei-Produktion bieten [169, 170].

Des Weiteren kommen gentechnische Anwendungen im Huhn humanmedizinischen Anwendungen zugute. Es ist beispielsweise möglich Allergene des Hühnereies zu eliminieren [67, 169]. Als „Bioreaktoren“ gewinnen transgene Hühner ebenfalls zunehmend an Bedeutung [171]. Hier kann das Hühnerei zur Produktion bestimmter Komponenten, beispielsweise humaner Antikörper [172, 173], antimikrobieller Peptide [174] und pharmazeutischer Substanzen dienen [175-177]. Das rekombinante Protein „Kanuma“, ein Enzym des menschlichen Fettstoffwechsels der Leber, wurde als pharmazeutisches Arzneimittel in den USA erstmals auf dem Markt zugelassen [176].

Der Umsetzung der Gen-Editierung auf kommerzieller Ebene steht die Beurteilung der Sicherheit, die nationale und weltweite Regulation von GMOs sowie die Verbraucherakzeptanz gegenüber [37]. Aktuell steht die Beurteilung des CRISPR/Cas9 Systems hinsichtlich der *off-target events* im Fokus [178]. Die Sequenzspezifität des DSB kann durch Auswahl geeigneter Tools, passender sgRNAs und optimierter Cas9-Varianten erhöht werden [161]. Dennoch können unerwünschte Effekte abseits der Zielsequenz auftreten und derzeit nicht ausgeschlossen werden. Aktuelle Studien weisen darauf hin, dass die Frequenz von

CRISPR/Cas9 verursachter *off-target events* im Rahmen der natürlichen *de novo* Mutationsrate liegt [179]. Weitere Untersuchungen in verschiedensten Spezies sind nötig, um die Sicherheit der Gen-Editierung in dieser Hinsicht besser beurteilen zu können. Innerhalb eines Verbundprojekts (Forschungsverbund „Tiergesundheit durch Genomik – FORTiGe“; Bayerische Forschungstiftung) finden anhand der hier erzeugten Hühnerlinien weiterführende Analysen zur Bewertung der Sicherheit der CRISPR/Cas9 Technologie statt.

Die Definition und Regulierung von GMOs ist weltweit uneinheitlich [180], was ein Problem in der Umsetzung der Technologie in der Landwirtschaft darstellt [37]. Während Argentinien und Brasilien GMOs, die ohne Einbringen von Fremd-DNA erzeugt wurden [161], grundsätzlich ohne weitere Regulierung genehmigen, ist dies in anderen Ländern noch nicht abschließend geklärt [37]. Uneinheitliche Regulationen können außerdem zu Problemen bezüglich des internationalen Handels und der Wettbewerbsfähigkeit „überregulierter“ Länder führen. Transparenz ist die Grundvoraussetzung für die Verbraucherakzeptanz. Die Aufklärung politischer Entscheidungsträger und der breiten Bevölkerung durch Experten und Wissenschaftler ist elementar für die Implementierung der Gen-Editierung in der Landwirtschaft.

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

ALV-J ist ein onkogenes, immunsuppressives Retrovirus, welches in Hühnern die myeloische Leukose und andere Tumore, Wachstums- und Legedepression verursachen kann. Die Eindämmung des Virus ist aufgrund fehlender Präventionsmaßnahmen, vor allem adäquater Impfstoffe, stark erschwert. Daher verursacht ALV-J trotz globaler Eradikationsmaßnahmen weiterhin enorme wirtschaftliche Einbußen, die vor allem asiatische Länder betreffen. Konventionelle Zuchtverfahren im Hinblick auf Selektion resistenter Hühnerrassen stehen nicht als Kontrollstrategie zur Verfügung, da keine natürlichen Resistenz-vermittelnden Genvarianten in der Hühnerpopulation vorkommen. Gen-Editierung ermöglicht die Erzeugung einer solchen Genvariante und kann so zur Eindämmung von ALV-J genutzt werden.

Gegenstand dieser Studie ist die Etablierung und anschließende Beurteilung einer gentechnisch erworbenen Resistenz gegenüber dem aviären Leukosevirus J (ALV-J) in einer kommerziellen Hühnerlinie. Dazu wurde die Bindestelle des Wirtszellrezeptors chNHE1 entsprechend modifiziert, sodass die Rezeptorbindung des ALV-J an die Zielzelle und eine Infektion daher nicht stattfinden kann.

Die Modifikation des chNHE1 beinhaltet die Deletion der Aminosäure W38, die sich als entscheidendes Schlüsselement für den Viruseintritt herausgestellt hat. Die W38-kodierende Sequenz ist unter Verwendung des CRISPR/Cas9-Systems in Kombination mit HDR deletiert worden. Anhand eines etablierten Testsystems konnte die vollständige ALV-J Resistenz in der erstellten Hühnerlinie bestätigt werden. Die erzeugte Genvariante hatte keine unerwünschten Effekte auf den Phänotyp der Tiere.

In dieser Arbeit konnte am Beispiel des relevanten Geflügelpathogens ALV-J gezeigt werden, dass die Gen-Editierung effektiv zur Krankheitsprävention im Huhn eingesetzt werden kann.

## 7. SUMMARY

ALV-J is an oncogenic, immunosuppressive retrovirus which infects chickens. It causes myeloid leucosis and leads to reduced growth and laying performance. The virus is difficult to control due to a lack of adequate prevention measures, such as an effective vaccine. Despite global efforts eradicating ALV-J it still causes severe economic losses, especially in Asian countries. Conventional breeding methods are not suitable to generate disease resistant chicken lines as a naturally resistant gene variant does not exist within the chicken population. Gene editing can be used to generate a resistant gene variant and thus contributing to the control of ALV-J.

The objective of this work is the establishment and subsequent characterisation of genetically introduced ALV-J resistance in a commercial chicken line. For this purpose the binding site of the host cell receptor chNHE1 was modified to prevent ALV-J infection.

The modification of chNHE1 implies the deletion of amino acid W38, which has been proven to be a key element for virus binding. The W38 coding sequence was deleted using CRISPR/Cas9 technology in combination with HDR. Complete ALV-J resistance in the generated chicken line was confirmed using an established testing system. No adverse phenotypic effects were observed.

In this work we show that gene editing is an effective alternative breeding method to generate disease resistance against viral pathogens such as ALV-J in a commercial chicken line.

## 8. LITERATURVERZEICHNIS

1. Sid, H. and B. Schusser, *Applications of Gene Editing in Chickens: A New Era Is on the Horizon*. Front Genet, 2018. **9**: p. 456.
2. Salter, D.W., et al., *Transgenic chickens: insertion of retroviral genes into the chicken germ line*. Virology, 1987. **157**(1): p. 236-40.
3. Salter, D.W., et al., *Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses*. Poult Sci, 1986. **65**(8): p. 1445-58.
4. McGrew, M.J., et al., *Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors*. EMBO Rep, 2004. **5**(7): p. 728-33.
5. Love, J., et al., *Transgenic birds by DNA microinjection*. Biotechnology (N Y), 1994. **12**(1): p. 60-3.
6. Cooper, C.A., et al., *Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE)*. Transgenic Res, 2017. **26**(3): p. 331-347.
7. Woodcock, M.E., A. Idoko-Akoh, and M.J. McGrew, *Gene editing in birds takes flight*. Mamm Genome, 2017. **28**(7-8): p. 315-323.
8. Tyack, S.G., et al., *A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells*. Transgenic Res, 2013. **22**(6): p. 1257-64.
9. Hamburger, V. and H.L. Hamilton, *A series of normal stages in the development of the chick embryo*. J Morphol, 1951. **88**(1): p. 49-92.
10. Vick, L., Y. Li, and K. Simkiss, *Transgenic birds from transformed primordial germ cells*. Proc Biol Sci, 1993. **251**(1332): p. 179-82.
11. Kuwana, T. and T. Rogulska, *Migratory mechanisms of chick primordial germ cells toward gonadal anlage*. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 1999. **45**(5): p. 725-36.
12. De Melo Bernardo, A., et al., *Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation*. Biol Open, 2012. **1**(11): p. 1146-52.
13. Tajima, A., et al., *Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (Gallus domesticus)*. Theriogenology, 1993. **40**(3): p. 509-19.
14. van de Lavoie, M.C., et al., *Germline transmission of genetically modified primordial germ cells*. Nature, 2006. **441**(7094): p. 766-9.
15. Whyte, J., et al., *FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal*. Stem Cell Reports, 2015. **5**(6): p. 1171-1182.
16. Looi, F.Y., et al., *Creating Disease Resistant Chickens: A Viable Solution to Avian Influenza?* Viruses, 2018. **10**(10): p. 561.
17. Trefil, P., et al., *Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: a new way towards efficient transgenesis in chicken*. Sci Rep, 2017. **7**(1): p. 14246.
18. Petersen, B., *Basics of genome editing technology and its application in livestock species*. Reprod Domest Anim, 2017. **52 Suppl 3**: p. 4-13.
19. Pastink, A., J.C. Eeken, and P.H. Lohman, *Genomic integrity and the repair*

- of double-strand DNA breaks*. Mutat Res, 2001. **480-481**: p. 37-50.
20. Burma, S., B.P. Chen, and D.J. Chen, *Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity*. DNA Repair (Amst), 2006. **5**(9-10): p. 1042-8.
  21. Pardo, B., B. Gomez-Gonzalez, and A. Aguilera, *DNA repair in mammalian cells: DNA double-strand break repair: how to fix a broken relationship*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(6): p. 1039-56.
  22. Davis, A.J. and D.J. Chen, *DNA double strand break repair via non-homologous end-joining*. Transl Cancer Res, 2013. **2**(3): p. 130-143.
  23. Kim, H. and J.S. Kim, *A guide to genome engineering with programmable nucleases*. Nat Rev Genet, 2014. **15**(5): p. 321-34.
  24. Johnson, R.D. and M. Jasin, *Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells*. EMBO J, 2000. **19**(13): p. 3398-407.
  25. Kakarougkas, A. and P.A. Jeggo, *DNA DSB repair pathway choice: an orchestrated handover mechanism*. Br J Radiol, 2014. **87**(1035): p. 20130685.
  26. Capecchi, M.R., *Altering the genome by homologous recombination*. Science, 1989. **244**(4910): p. 1288-92.
  27. Ishii, A., et al., *Analysis of the role of homology arms in gene-targeting vectors in human cells*. PLoS One, 2014. **9**(9): p. e108236.
  28. Leighton, P.A., et al., *Genetic modification of primordial germ cells by gene trapping, gene targeting, and phiC31 integrase*. Mol Reprod Dev, 2008. **75**(7): p. 1163-75.
  29. Schusser, B., et al., *Immunoglobulin knockout chickens via efficient homologous recombination in primordial germ cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2013. **110**(50): p. 20170-5.
  30. Jasin, M. and R. Rothstein, *Repair of strand breaks by homologous recombination*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2013. **5**(11): p. a012740.
  31. Kalds, P., et al., *Sheep and Goat Genome Engineering: From Random Transgenesis to the CRISPR Era*. Front Genet, 2019. **10**: p. 750.
  32. Fan, B., et al., *Assembly and in vitro functional analysis of zinc finger nuclease specific to the 3' untranslated region of chicken ovalbumin gene*. Anim Biotechnol, 2011. **22**(4): p. 211-22.
  33. Park, T.S., et al., *Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(35): p. 12716-21.
  34. Taylor, L., et al., *Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells*. Development, 2017. **144**(5): p. 928-934.
  35. Bahrami, S., et al., *Designing A Transgenic Chicken: Applying New Approaches toward A Promising Bioreactor*. Cell J, 2020. **22**(2): p. 133-139.
  36. Ricroch, A., *Global developments of genome editing in agriculture*. Transgenic Res, 2019. **28**(Suppl 2): p. 45-52.
  37. Ruan, J., et al., *Genome editing in livestock: Are we ready for a revolution in animal breeding industry?* Transgenic Res, 2017. **26**(6): p. 715-726.
  38. Cong, L., et al., *Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems*. Science, 2013. **339**(6121): p. 819-23.
  39. Jinek, M., et al., *RNA-programmed genome editing in human cells*. Elife, 2013. **2**: p. e00471.

40. Mali, P., et al., *RNA-guided human genome engineering via Cas9*. *Science*, 2013. **339**(6121): p. 823-6.
41. Song, F. and K. Stieger, *Optimizing the DNA Donor Template for Homology-Directed Repair of Double-Strand Breaks*. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2017. **7**: p. 53-60.
42. Miura, H., et al., *Easi-CRISPR for creating knock-in and conditional knockout mouse models using long ssDNA donors*. *Nat Protoc*, 2018. **13**(1): p. 195-215.
43. Chen, F., et al., *High-frequency genome editing using ssDNA oligonucleotides with zinc-finger nucleases*. *Nat Methods*, 2011. **8**(9): p. 753-5.
44. Ishino, Y., et al., *Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product*. *J Bacteriol*, 1987. **169**(12): p. 5429-33.
45. Bhaya, D., M. Davison, and R. Barrangou, *CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation*. *Annu Rev Genet*, 2011. **45**: p. 273-97.
46. Mojica, F.J., et al., *Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements*. *J Mol Evol*, 2005. **60**(2): p. 174-82.
47. Garneau, J.E., et al., *The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA*. *Nature*, 2010. **468**(7320): p. 67-71.
48. Ran, F.A., et al., *Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system*. *Nat Protoc*, 2013. **8**(11): p. 2281-2308.
49. Makarova, K.S., et al., *Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems*. *Nat Rev Microbiol*, 2011. **9**(6): p. 467-77.
50. Mir, A., et al., *Type II-C CRISPR-Cas9 Biology, Mechanism, and Application*. *ACS Chem Biol*, 2018. **13**(2): p. 357-365.
51. Chylinski, K., et al., *Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems*. *Nucleic Acids Res*, 2014. **42**(10): p. 6091-105.
52. Jiang, F. and J.A. Doudna, *The structural biology of CRISPR-Cas systems*. *Curr Opin Struct Biol*, 2015. **30**: p. 100-111.
53. Jinek, M., et al., *A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity*. *Science*, 2012. **337**(6096): p. 816-21.
54. Gasiunas, G., et al., *Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012. **109**(39): p. E2579-86.
55. Deltcheva, E., et al., *CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III*. *Nature*, 2011. **471**(7340): p. 602-7.
56. Anders, C., et al., *Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease*. *Nature*, 2014. **513**(7519): p. 569-73.
57. Hsu, P.D., et al., *DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases*. *Nat Biotechnol*, 2013. **31**(9): p. 827-32.
58. Ryan, O.W., S. Poddar, and J.H. Cate, *CRISPR-Cas9 Genome Engineering in *Saccharomyces cerevisiae* Cells*. *Cold Spring Harb Protoc*, 2016. **2016**(6).
59. Xing, H.L., et al., *A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants*. *BMC Plant Biol*, 2014. **14**: p. 327.
60. Yu, Z., et al., *Highly efficient genome modifications mediated by*



- CRISPR/Cas9 in Drosophila*. Genetics, 2013. **195**(1): p. 289-91.
61. Hwang, W.Y., et al., *Efficient genome editing in zebrafish using a CRISPR-Cas system*. Nat Biotechnol, 2013. **31**(3): p. 227-9.
  62. Dimitrov, L., et al., *Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells*. PLoS One, 2016. **11**(4): p. e0154303.
  63. Veron, N., et al., *CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken*. Dev Biol, 2015. **407**(1): p. 68-74.
  64. Zuo, Q., et al., *Site-Directed Genome Knockout in Chicken Cell Line and Embryos Can Use CRISPR/Cas Gene Editing Technology*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(6): p. 1787-92.
  65. Bai, Y., et al., *Efficient Genome Editing in Chicken DF-1 Cells Using the CRISPR/Cas9 System*. G3 (Bethesda), 2016. **6**(4): p. 917-23.
  66. Morin, V., N. Veron, and C. Marcelle, *CRISPR/Cas9 in the Chicken Embryo*. Methods Mol Biol, 2017. **1650**: p. 113-123.
  67. Oishi, I., et al., *Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 23980.
  68. Schusser, B., et al., *Expression of heavy chain-only antibodies can support B-cell development in light chain knockout chickens*. Eur J Immunol, 2016. **46**(9): p. 2137-48.
  69. Lapidou, M., *Analysis of the early B cell development in the domestic chicken by reverse genetics*, in Tierärztliche Fakultät. 2017, LMU München.
  70. Bertzbach, L.D., et al., *Unraveling the role of B cells in the pathogenesis of an oncogenic avian herpesvirus*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(45): p. 11603-11607.
  71. Aumann, D., *Generierung genetisch modifizierter Hühnermodelle für die immunologische Forschung*, in veterinary department. 2017, LMU Munich: ediss:21157.
  72. Payne, L.N., *Retrovirus-induced disease in poultry*. Poult Sci, 1998. **77**(8): p. 1204-12.
  73. Nathanson, N., *Viral Pathogenesis and Immunity*. 2nd ed. 2007: Academic Press. 280.
  74. Ellermann, V. and O. Bang, *Experimentelle Leukämie bei Hühnern. II*. Zeitschr. f. Hygiene, 1909. **63**: p. 231-272.
  75. Payne, L.N. and V. Nair, *The long view: 40 years of avian leukosis research*. Avian Pathol, 2012. **41**(1): p. 11-9.
  76. Payne, L.N., *Retroviridae*, in *Poultry Diseases*, M. Pattison, et al., Editors. 2008, Saunders Ltd. p. 276-293.
  77. Nair, V., et al., *Neoplastic Diseases*, in *Diseases of Poultry*, D.E. Swayne, et al., Editors. 2020. p. 548-715.
  78. Wang, X., P. Zhao, and Z.Z. Cui, *[Identification of a new subgroup of avian leukosis virus isolated from Chinese indigenous chicken breeds]*. Bing Du Xue Bao, 2012. **28**(6): p. 609-14.
  79. Lefkowitz, E.J., et al., *Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)*. Nucleic Acids Res, 2018. **46**(D1): p. D708-D717.
  80. Vogt, V.M., *Retroviral Virions and Genomes*, in *Retroviruses*, J.M. Coffin, S.H. Hughes, and H.E. Varmus, Editors. 1997, Cold Spring Harbor

Laboratory Press.

81. Venugopal, K., *Avian leukosis virus subgroup J: a rapidly evolving group of oncogenic retroviruses*. Res Vet Sci, 1999. **67**(2): p. 113-9.
82. Bai, J., et al., *Sequence of host-range determinants in the env gene of a full-length, infectious proviral clone of exogenous avian leukosis virus HPRS-103 confirms that it represents a new subgroup (designated J)*. J Gen Virol, 1995. **76** ( Pt 1): p. 181-7.
83. Crittenden, L.B., *Exogenous and endogenous leukosis virus genes--a review*. Avian Pathol, 1981. **10**(2): p. 101-12.
84. Hayward, W.S., B.G. Neel, and S.M. Astrin, *Activation of a cellular onc gene by promoter insertion in ALV-induced lymphoid leukosis*. Nature, 1981. **290**(5806): p. 475-80.
85. Payne, L.N., et al., *A novel subgroup of exogenous avian leukosis virus in chickens*. J Gen Virol, 1991. **72** ( Pt 4): p. 801-7.
86. Bai, J., L.N. Payne, and M.A. Skinner, *HPRS-103 (exogenous avian leukosis virus, subgroup J) has an env gene related to those of endogenous elements EAV-0 and E51 and an E element found previously only in sarcoma viruses*. J Virol, 1995. **69**(2): p. 779-84.
87. Payne, L.N., A.M. Gillespie, and K. Howes, *Myeloid leukaemogenicity and transmission of the HPRS-103 strain of avian leukosis virus*. Leukemia, 1992. **6**(11): p. 1167-76.
88. Payne, L.N., A.M. Gillespie, and K. Howes, *Recovery of acutely transforming viruses from myeloid leukosis induced by the HPRS-103 strain of avian leukosis virus*. Avian Dis, 1993. **37**(2): p. 438-50.
89. Arshad, S.S., et al., *Tissue tropism of the HPRS-103 strain of J subgroup avian leukosis virus and of a derivative acutely transforming virus*. Vet Pathol, 1997. **34**(2): p. 127-37.
90. Venugopal, K., et al., *Subgroup J avian leukosis virus infection in turkeys: induction of rapid onset tumours by acutely transforming virus strain 966*. Avian Pathol, 2000. **29**(4): p. 319-25.
91. Wang, Y., et al., *Identification of avian leukosis virus subgroup J-associated acutely transforming viruses carrying the v-src oncogene in layer chickens*. J Gen Virol, 2016. **97**(5): p. 1240-1248.
92. Payne, L.N., A.M. Gillespie, and K. Howes, *Induction of myeloid leukosis and other tumours with the HPRS-103 strain of ALV*. Vet Rec, 1991. **129**(20): p. 447-8.
93. Arshad, S.S., et al., *Tropism of subgroup J avian leukosis virus as detected by in situ hybridization*. Avian Pathol, 1999. **28**(2): p. 163-9.
94. Payne, L.N., *HPRS-103: A retro virus strikes back. The emergence of subgroup J avian leukosis virus*. Avian Pathology, 1998. **27**(S1): p. 36-45.
95. Prukova, D., et al., *Differences in pathogenicity among strains of the same or different avian leukosis virus subgroups*. Avian Pathol, 2007. **36**(1): p. 15-27.
96. Gao, Y.L., et al., *Avian leukosis virus subgroup J in layer chickens, China*. Emerg Infect Dis, 2010. **16**(10): p. 1637-8.
97. Smith, E.J., S.M. Williams, and A.M. Fadly, *Detection of avian leukosis virus subgroup J using the polymerase chain reaction*. Avian Dis, 1998. **42**(2): p. 375-80.
98. Smith, L.M., et al., *Development and application of polymerase chain*

- reaction (PCR) tests for the detection of subgroup J avian leukosis virus.* Virus Res, 1998. **54**(1): p. 87-98.
99. Kim, Y. and T.P. Brown, *Development of quantitative competitive-reverse transcriptase-polymerase chain reaction for detection and quantitation of avian leukosis virus subgroup J.* J Vet Diagn Invest, 2004. **16**(3): p. 191-6.
  100. Venugopal, K., et al., *Recombinant env-gp85 of HPRS-103 (subgroup J) avian leukosis virus: antigenic characteristics and usefulness as a diagnostic reagent.* Avian Dis, 1997. **41**(2): p. 283-8.
  101. Dorner, A.J. and J.M. Coffin, *Determinants for receptor interaction and cell killing on the avian retrovirus glycoprotein gp85.* Cell, 1986. **45**(3): p. 365-74.
  102. Mothes, W., et al., *Retroviral entry mediated by receptor priming and low pH triggering of an envelope glycoprotein.* Cell, 2000. **103**(4): p. 679-89.
  103. Barnard, R.J., D. Elleder, and J.A. Young, *Avian sarcoma and leukosis virus-receptor interactions: from classical genetics to novel insights into virus-cell membrane fusion.* Virology, 2006. **344**(1): p. 25-9.
  104. Chai, N. and P. Bates, *Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger type 1 is a receptor for pathogenic subgroup J avian leukosis virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(14): p. 5531-6.
  105. Kucerova, D., et al., *Nonconserved tryptophan 38 of the cell surface receptor for subgroup J avian leukosis virus discriminates sensitive from resistant avian species.* J Virol, 2013. **87**(15): p. 8399-407.
  106. Guan, X., et al., *Residues 28 to 39 of the Extracellular Loop 1 of Chicken Na<sup>(+)</sup>/H<sup>(+)</sup> Exchanger Type I Mediate Cell Binding and Entry of Subgroup J Avian Leukosis Virus.* J Virol, 2018. **92**(1).
  107. Reinisova, M., et al., *Genetic Diversity of NHE1, Receptor for Subgroup J Avian Leukosis Virus, in Domestic Chicken and Wild Anseriform Species.* PLoS One, 2016. **11**(3): p. e0150589.
  108. Lee, H.J., et al., *Precise gene editing of chicken Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange type 1 (chNHE1) confers resistance to avian leukosis virus subgroup J (ALV-J).* Dev Comp Immunol, 2017. **77**: p. 340-349.
  109. Koslova, A., et al., *Genetic Resistance to Avian Leukosis Viruses Induced by CRISPR/Cas9 Editing of Specific Receptor Genes in Chicken Cells.* Viruses, 2018. **10**(11).
  110. Koslova, A., et al., *Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2020. **117**(4): p. 2108-2112.
  111. Li, Y., et al., *Vertical transmission of avian leukosis virus subgroup J (ALV-J) from hens infected through artificial insemination with ALV-J infected semen.* BMC Vet Res, 2017. **13**(1): p. 204.
  112. Shittu, I., et al., *Avian leukosis virus subgroup - J as a contaminant in live commercially available poultry vaccines distributed in Nigeria.* Biologicals, 2019. **57**: p. 29-33.
  113. Bagust, T.J., S.P. Fenton, and M.R. Reddy, *Detection of subgroup J avian leukosis virus infection in Australian meat-type chickens.* Aust Vet J, 2004. **82**(11): p. 701-6.
  114. Pym, R., *Poultry health and disease control in developing countries, in Poultry Development Review.* 2013, Food and Agriculture Organization of

- the United Nations. p. 79-94.
115. Kaleta, E.F., L.N. Payne, and U. Heffels-Redmann. *International symposium on ALV-J and other avian retroviruses*. 2000. Giessen: Institut für Geflügelkrankheiten.
  116. Silva, R.F., A.M. Fadly, and H.D. Hunt, *Hypervariability in the envelope genes of subgroup J avian leukosis viruses obtained from different farms in the United States*. *Virology*, 2000. **272**(1): p. 106-11.
  117. Zavala, G., S. Cheng, and M.W. Jackwood, *Molecular epidemiology of avian leukosis virus subgroup J and evolutionary history of its 3' untranslated region*. *Avian Dis*, 2007. **51**(4): p. 942-53.
  118. Shen, Y., et al., *Genetic mutations of avian leukosis virus subgroup J strains extended their host range*. *J Gen Virol*, 2014. **95**(Pt 3): p. 691-9.
  119. Venugopal, K., et al., *Antigenic variants of J subgroup avian leukosis virus: sequence analysis reveals multiple changes in the env gene*. *J Gen Virol*, 1998. **79** ( Pt 4): p. 757-66.
  120. Jiang, L., et al., *Genetic diversity and phylogenetic analysis of glycoprotein gp85 of avian leukosis virus subgroup J wild-bird isolates from Northeast China*. *Arch Virol*, 2014. **159**(7): p. 1821-6.
  121. Zeng, X., et al., *Detection and molecular characterization of J subgroup avian leukosis virus in wild ducks in China*. *PLoS One*, 2014. **9**(4): p. e94980.
  122. Zeng, X., et al., *Molecular characteristics of the complete genome of a J-subgroup avian leukosis virus strain isolated from Eurasian teal in China*. *Virus Genes*, 2014. **49**(2): p. 250-8.
  123. Tomar, A.S., V. K., *Avian leukosis/sarcoma virus infections - status and socio-economic impact revisited*. *Indian Journal of Poultry Science*, 2007. **42**(3): p. 231-238.
  124. Feng, M. and X. Zhang, *Immunity to Avian Leukosis Virus: Where Are We Now and What Should We Do?* *Front Immunol*, 2016. **7**: p. 624.
  125. Xu, B., et al., *Occurrence of avian leukosis virus subgroup J in commercial layer flocks in China*. *Avian Pathol*, 2004. **33**(1): p. 13-7.
  126. Zhang, Y., et al., *The high conserved cellular receptors of avian leukosis virus subgroup J in Chinese local chickens contributes to its wide host range*. *Poult Sci*, 2018. **97**(12): p. 4187-4192.
  127. Zhou, D., et al., *Outbreak of myelocytomatosis caused by mutational avian leukosis virus subgroup J in China, 2018*. *Transbound Emerg Dis*, 2019. **66**(2): p. 622-626.
  128. Zhang, Q.C., et al., *Isolation and identification of a subgroup A avian leukosis virus from imported meat-type grand-parent chickens*. *Virol Sin*, 2010. **25**(2): p. 130-6.
  129. Dou, W., et al., *Maternal antibody induced by recombinant gp85 protein vaccine adjuvanted with CpG-ODN protects against ALV-J early infection in chickens*. *Vaccine*, 2013. **31**(51): p. 6144-9.
  130. Zhang, L., et al., *Liposomes containing recombinant gp85 protein vaccine against ALV-J in chickens*. *Vaccine*, 2014. **32**(21): p. 2452-6.
  131. Zhang, D., et al., *Antibody responses induced by recombinant ALV-A gp85 protein vaccine combining with CpG-ODN adjuvant in breeder hens and the protection for their offspring against early infection*. *Antiviral Res*, 2015. **116**: p. 20-6.

132. Cheng, J., et al., *gp85 protein vaccine adjuvanted with silica nanoparticles against ALV-J in chickens*. Vaccine, 2017. **35**(2): p. 293-298.
133. Pandiri, A.R., et al., *Subgroup J avian leukosis virus neutralizing antibody escape variants contribute to viral persistence in meat-type chickens*. Avian Dis, 2010. **54**(2): p. 848-56.
134. Chen, M., et al., *Inhibition of avian leukosis virus replication by vector-based RNA interference*. Virology, 2007. **365**(2): p. 464-72.
135. Meng, Q.W., et al., *Enhanced inhibition of Avian leukosis virus subgroup J replication by multi-target miRNAs*. Virol J, 2011. **8**: p. 556.
136. Dai, M., et al., *Recombinant chicken interferon-alpha inhibits the replication of exogenous avian leukosis virus (ALV) in DF-1 cells*. Mol Immunol, 2016. **76**: p. 62-9.
137. Spencer, J.L., et al., *Lymphoid leukosis: interrelations among virus infections in hens, eggs, embryos, and chicks*. Avian Dis, 1977. **21**(3): p. 331-45.
138. Spencer, J.L., *Laboratory Diagnostic Procedures for Detecting Avian Leukosis Virus Infections*, in *Avian Leukosis*, G.F. de Boer, Editor. 1987, Springer US. p. 292.
139. Spencer, J.L., *Progress towards eradication of lymphoid leukosis viruses--a review*. Avian Pathol, 1984. **13**(4): p. 599-619.
140. Payne, L.N.F., A. M. , *Leukosis/Sarcoma Group*, in *Diseases of Poultry*. 1997, Iowa State University Press: Ames, Iowa. p. 414-467
141. Slepko, E. and L. Fliegel, *Structure and function of the NHE1 isoform of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger*. Biochem Cell Biol, 2002. **80**(5): p. 499-508.
142. Bell, S.M., et al., *Targeted disruption of the murine Nhe1 locus induces ataxia, growth retardation, and seizures*. Am J Physiol, 1999. **276**(4): p. C788-95.
143. Wang, L., et al., *Enhancing Targeted Genomic DNA Editing in Chicken Cells Using the CRISPR/Cas9 System*. PLoS One, 2017. **12**(1): p. e0169768.
144. Abu-Bonsrah, K.D., D. Zhang, and D.F. Newgreen, *CRISPR/Cas9 Targets Chicken Embryonic Somatic Cells In Vitro and In Vivo and generates Phenotypic Abnormalities*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 34524.
145. Idoko-Akoh, A., et al., *High fidelity CRISPR/Cas9 increases precise monoallelic and biallelic editing events in primordial germ cells*. Scientific Reports, 2018. **8**(1).
146. Vester, B. and J. Wengel, *LNA (locked nucleic acid): high-affinity targeting of complementary RNA and DNA*. Biochemistry, 2004. **43**(42): p. 13233-41.
147. Montgomery, J., et al., *Simultaneous mutation scanning and genotyping by high-resolution DNA melting analysis*. Nat Protoc, 2007. **2**(1): p. 59-66.
148. King, C. and T. Scott-Horton, *Pyrosequencing: a simple method for accurate genotyping*. J Vis Exp, 2008(11).
149. Nordgard, O., et al., *Error propagation in relative real-time reverse transcription polymerase chain reaction quantification models: the balance between accuracy and precision*. Anal Biochem, 2006. **356**(2): p. 182-93.
150. Martino, A., T. Mancuso, and A.M. Rossi, *Application of high-resolution melting to large-scale, high-throughput SNP genotyping: a comparison with the TaqMan method*. J Biomol Screen, 2010. **15**(6): p. 623-9.
151. von Samson-Himmelstjerna, G., et al., *Molecular detection of benzimidazole resistance in Haemonchus contortus using real-time PCR and*

- pyrosequencing*. Parasitology, 2009. **136**(3): p. 349-58.
152. Leighton, P.A., et al., *Generation of chickens expressing Cre recombinase*. Transgenic Res, 2016. **25**(5): p. 609-16.
153. Hughes, S.H., *The RCAS vector system*. Folia Biol (Praha), 2004. **50**(3-4): p. 107-19.
154. Kurstak, E. and A. Hossain, *Virus variability and impact on epidemiology and control diseases*. Applied Virology Research, 1990. **2**: p. 1-7.
155. Kimman, T.G., et al., *Challenges for porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) vaccinology*. Vaccine, 2009. **27**(28): p. 3704-18.
156. Lin, W., et al., *Molecular epidemiology of J-subgroup avian leukosis virus isolated from meat-type chickens in southern China between 2013 and 2014*. Arch Virol, 2016. **161**(11): p. 3039-46.
157. Whitworth, K.M., et al., *Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(1): p. 20-2.
158. Burkard, C., et al., *Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function*. PLoS Pathog, 2017. **13**(2): p. e1006206.
159. Burkard, C., et al., *Pigs Lacking the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Domain 5 of CD163 Are Resistant to Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus 1 Infection*. J Virol, 2018. **92**(16).
160. Lillico, S.G., et al., *Mammalian interspecies substitution of immune modulatory alleles by genome editing*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 21645.
161. Proudfoot, C., S. Lillico, and C. Tait-Burkard, *Genome editing for disease resistance in pigs and chickens*. Anim Front, 2019. **9**(3): p. 6-12.
162. Leghorn, R. Curley, Editor. 2013, Encyclopædia Britannica.
163. Plachy, J., et al., *Prague inbred lines of chickens: a biological model for MHC research*. Folia Biol (Praha), 1989. **35**(4): p. 177-96.
164. Miller, M.M. and R.L. Taylor, Jr., *Brief review of the chicken Major Histocompatibility Complex: the genes, their distribution on chromosome 16, and their contributions to disease resistance*. Poult Sci, 2016. **95**(2): p. 375-92.
165. Laible, G., J. Wei, and S. Wagner, *Improving livestock for agriculture - technological progress from random transgenesis to precision genome editing heralds a new era*. Biotechnol J, 2015. **10**(1): p. 109-20.
166. Hellmich R., et al., *Acquiring Resistance Against a Retroviral Infection via CRISPR/Cas9 Targeted Genome Editing in a Commercial Chicken Line*. Frontiers in Genome Editing, 2020. **2**: p. 3.
167. Long, J.S., et al., *Species difference in ANP32A underlies influenza A virus polymerase host restriction*. Nature, 2016. **529**(7584): p. 101-4.
168. Tait-Burkard, C., et al., *Livestock 2.0 - genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed animals*. Genome Biol, 2018. **19**(1): p. 204.
169. Doran, T.J., et al., *Advances in genetic engineering of the avian genome: "Realising the promise"*. Transgenic Res, 2016. **25**(3): p. 307-19.
170. Lee, H.J., et al., *Targeted gene insertion into Z chromosome of chicken primordial germ cells for avian sexing model development*. FASEB J, 2019. **33**(7): p. 8519-8529.

171. Lillico, S.G., et al., *Transgenic chickens as bioreactors for protein-based drugs*. Drug Discov Today, 2005. **10**(3): p. 191-6.
172. Oishi, I., et al., *Cre-LoxP-regulated expression of monoclonal antibodies driven by an ovalbumin promoter in primary oviduct cells*. BMC Biotechnol, 2011. **11**: p. 5.
173. Ching, K.H., et al., *Chickens with humanized immunoglobulin genes generate antibodies with high affinity and broad epitope coverage to conserved targets*. MAbs, 2018. **10**(1): p. 71-80.
174. Liu, T., et al., *Oviduct-specific expression of human neutrophil defensin 4 in lentivirally generated transgenic chickens*. PLoS One, 2015. **10**(5): p. e0127922.
175. Lee, S.H., et al., *Transgenic chickens expressing human urokinase-type plasminogen activator*. Poult Sci, 2013. **92**(9): p. 2396-403.
176. Sheridan, C., *FDA approves 'farmaceutical' drug from transgenic chickens*. Nat Biotechnol, 2016. **34**(2): p. 117-9.
177. Oishi, I., et al., *Efficient production of human interferon beta in the white of eggs from ovalbumin gene-targeted hens*. Sci Rep, 2018. **8**(1): p. 10203.
178. Chen, S., et al., *CRISPR system: Discovery, development and off-target detection*. Cell Signal, 2020. **70**: p. 109577.
179. Dong, Y., et al., *Genome-Wide Off-Target Analysis in CRISPR-Cas9 Modified Mice and Their Offspring*. G3 (Bethesda), 2019. **9**(11): p. 3645-3651.
180. McFarlane, G.R., et al., *On-Farm Livestock Genome Editing Using Cutting Edge Reproductive Technologies*. Frontiers in Sustainable Food Systems 2019. **3**: p. 106.

## 9. DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich meinem Betreuer Herrn Prof. Dr. Benjamin Schusser für die Möglichkeit danken, meine Promotion an der Professur für Biotechnologie der Reproduktion durchzuführen. Vielen Dank für das entgegengebrachte Vertrauen, die Chance an zahlreichen spannenden Projekten mitzuwirken und die Begleitung durch alle Phasen dieser Reise.

In diesem Sinne möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. Bernd Kaspers für die fachliche Unterstützung und Anregungen bedanken. Ich möchte außerdem den Kooperationspartnern Prof. Dr. Rudolf Preisinger, Prof. Dr. Venugopal Nair und Prof. PhD Benedikt Kaufer für die gute Zusammenarbeit danken.

Ein besonderer Dank geht an alle Kollegen sowie ehemaligen Mitstreiter der AG Schusser, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Vor allem möchte ich Hicham Sid, Antonina Schlickerieder, Denise Bartsch, Kamila Lengyel, Sabrina Schleibinger und Theresa Thoma für das uneingeschränkte Vertrauen, die großartige Hilfe und die vielen schönen Momente danken!

Ein großes Dankeschön geht auch an die gesamte AG Schnieke für die schöne gemeinsame Zeit, den freundschaftlichen Zusammenhalt und fachlichen Austausch.

Für die sehr gute Betreuung der Hühner und die gute Teamarbeit möchte ich mich auch bei den Tierpflegern Helga Hagemann und Manuela Wanninger bedanken!

Zu guter Letzt möchte ich noch ein riesiges Dankeschön an meine Familie, meinen Partner und Freunde aussprechen, die mit mir in dieser Zeit durch Erfolge und Höhenflüge, aber auch Tiefpunkte und Zweifel gegangen sind. Ich danke meinen Eltern und insbesondere meiner Schwester für die kontinuierliche Unterstützung. Mein größter Dank richtet sich an meinen Partner Bernhard Klinger für seinen uneingeschränkten Rückhalt bei der Verwirklichung meiner Ziele.