

ANIMALES GENÉTICAMENTE MODIFICADOS QUE TIENEN TOLERANCIA

INCREMENTADA AL CALOR

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

5 Esta solicitud reclama la prioridad a las Solicitudes Provisionales de E.U.A. No. 62/221,444 presentada el 21 de septiembre del 2015, y 62/327,115 presentada el 25 de abril del 2016 cada una de las cuales se incorpora en la presente a manera de referencia en su totalidad.

10

CAMPO DE LA INVENCION

La invención se dirige a animales de ganado genéticamente modificados para que tengan mayor tolerancia al calor al expresar el fenotipo SLICK.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

15 Los animales de ganado se crían en todo el mundo. Las prácticas de agricultura y cría de animales globales proponen que algunas razas de ganado se hayan desarrollado y criado en grandes números en todo el mundo por sus cualidades deseables. El ganado, en particular se cría en grandes
20 manadas para la producción tanto de leche como de carne. Sin embargo, las razas más populares de ganado se desarrollaron originalmente en Europa. Estas razas incluyen Angus, Holstein Friesian, Hereford, Shorthorn, Charolais, Jersey, Galloway, Brown Swiss, Chianina, and Belgian Blue por nombrar algunas.

La tolerancia al calor en los animales de ganado es esencial para criar animales sanos y mantenerlos en su capacidad de producción. En el ganado, por ejemplo, ser capaz de mantener una temperatura corporal normal significa que los animales son resistentes a enfermedades, producen más leche y se desarrollan más grandes y se producen más prolíficamente con terneros más sanos que el ganado que no es tolerante al estrés por calor. Esto es particularmente cierto para el ganado criado en climas tropicales y subtropicales.

"SLICK" es una mutación encontrada en el ganado del nuevo mundo incluyendo Senepol, Carora, Criollo Limonero y Romosinuano. El término "SLICK" se inventó para referirse al pelo brillante, corto del ganado. Este fenotipo también incluye densidad del pelo, tipo de pelo y densidad de las glándulas sudoríparas y eficiencia de termorregulación. El ganado que tiene el fenotipo SLICK muestra capacidades en gran medida incrementadas a termoregulares en medios ambientes tropicales y experimentan en consecuencia considerablemente menos estrés en medios ambientes calientes.

La mutación "SLICK" se ha mapeado al cromosoma 20 del genoma del ganado y codifica para el receptor de prolactina (PRLR). El gen tiene nueve exones que codifican para un polipéptido de 581 aminoácidos. La investigación previa en el ganado Senepol ha mostrado que el fenotipo resulta de una

supresión base individual en el exón 10 (no hay exón 1, los exones reconocidos son 2-10) que introduce un codón de detención prematuro (p.Leu462) y pérdida de los 120 aminoácidos terminales del receptor. Este fenotipo es
5 referido en la presente como SLICK1. El ganado Senepol es extremadamente tolerante al calor y se ha cruzado con muchas otras razas de ganado para proporcionar el beneficio de tolerancia al calor. Sería deseable conferir atributos que incluyan tolerancia al calor a otras razas de animales sin
10 apareamiento sexual que de por resultado la pérdida de los atributos por el cual se desean razas animales particulares.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

Se describen en la presente animales de ganado con genes editados, criados con precisión y métodos para hacer que
15 expresen el fenotipo slick. Los animales descritos en la presente expresan un alelo truncado para el gen del receptor de prolactina (PRLR). Cuando se expresa, los animales de ganado producen un PRLR que se pierde hasta los 148 residuos de aminoácidos (aa) terminales de la proteína. En algunas
20 modalidades el animal expresa una proteína que es truncada por 147 o 146 aa. En algunos casos, el animal pierde el 121 aa terminal. En algunas modalidades, el animal de ganado expresa una PRLR que pierde el 69 aa terminal y muestra el fenotipo SLICK. Los artífices apreciarán inmediatamente que

todos los intervalos y valores dentro del intervalo explícitamente establecidos son contemplados: por ejemplo de 148 a 69. Es decir, cualquier PRLR que exprese como su último aminoácido tirosina en la posición 433 de la proteína que
5 tenga el Número de Acceso de GenBank AAA51417 (SEQ ID NO 64), traducido de ARNm identificado por tener el Número de Acceso NM_001039726 (SEQ ID NO 65). Los animales que expresan SLICK tienen capacidad termorreguladora superior comparada con los animales sin el fenotipo slick y experimentan una depresión
10 menos drástica en la producción de leche durante el verano.

En varias modalidades ejemplares, la descripción proporciona un animal de ganado genéticamente modificado para expresar un gen del receptor de prolactina modificado (PRLR) que da por resultado un PRLR truncado. En algunas
15 modalidades, el PRLR se trunca después de la tirosina en el residuo 433 del residuo identificado por el Número de Acceso de GenBank AAA51417 (SEQ ID NO 64). En varias modalidades, el PRLR se trunca después del residuo en AA 461, 496 o 464. En estas modalidades ejemplares, el animal de ganado es menos
20 susceptible al estrés por calor. En varias modalidades ejemplares el animal es un artiodáctilo. En algunas modalidades ejemplares el artiodáctilo es un bovino. En varias modalidades ejemplares las modificaciones genéticas hechas por la edición de genes de precisión se hace por la

edición de genes de introgresión no meiótica utilizando la tecnología de nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, TALENs o CRISPR/CAS. En algunas modalidades ejemplares, la modificación genética es heterocigota. En otras modalidades ejemplares, la modificación genética es homocigota. En algunas modalidades ejemplares, el gen PRLR se modifica después del residuo 1383 del ARNm como es identificado por el Número de Acceso de GenBank NM_001039726 (SEQ ID NO 65). En varias modalidades ejemplares, la modificación da por resultado un rompimiento en la síntesis de proteínas del gen. En estas modalidades ejemplares, el animal expresa el fenotipo SLICK.

En todavía otras modalidades ejemplares, la descripción proporciona un animal de ganado genéticamente modificado que expresa un fenotipo SLICK que comprende la modificación del gen PRLR después del residuo 1383 como es identificado por el ARNm que tiene el Número de Acceso de GenBank NM_001039726. En varias modalidades, la modificación se hace por edición de genes de introgresión no meiótica utilizando tecnología de nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, TALENs o CRISPR/CAS. En algunas modalidades ejemplares, la modificación genética da por resultado una PRLR que tiene entre 433 aminoácidos y 511 aminoácidos como es identificado por el Número de Acceso de GenBank AAA51417. En otras modalidades ejemplares, la

modificación genética da por resultado una proteína PRLR que tiene 433 aminoácidos, 461 aminoácidos, 464 aminoácidos, 496 aminoácidos, 511 aminoácidos o residuos que terminan entre 433 aminoácidos y 511 aminoácidos. En varias modalidades
5 ejemplares, la modificación se hace a una célula somática y el animal es clonado por transferencia nuclear de la célula somática a un huevo enucleado. En algunas modalidades ejemplares, la modificación comprende una mutación que rompe la síntesis de proteína al proporcionar en una supresión,
10 inserción o mutación del marco de lectura genético.

En aún todavía otras modalidades ejemplares, la descripción proporciona un método para modificar genéticamente animales de ganado que expresan un fenotipo SLICK que comprende, que expresa un gen del receptor de
15 prolactina (PRLR) modificado para romper la síntesis de la proteína del receptor de prolactina (PRLR) después del residuo de aminoácido 433 como es identificado por el Numero de Acceso de GenBank AAA51417 al utilizar tecnología de edición de genes de precisión incluyendo tecnología de
20 nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, TALENs o CRISPR/CAS y una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR) homóloga a una porción del PRLR diseñado para introducir una mutación de cambio de marco o codón de detención. En estas modalidades ejemplares, el rompimiento en la síntesis se

introduce después del nucleótido 1383 de la ARNm identificado por el Número de Acceso de GenBank NM_001039726. En algunas modalidades, la descripción incluye además introducir un sitio de restricción de nucleasa próximo a la modificación genética. En varias modalidades, el sitio de restricción de nucleasa esta cadena debajo de la modificación genética. En varias modalidades, la restricción del sitio de introducción de nucleasa se dirige por la misma plantilla HDR. En varias modalidades ejemplares, la modificación genética y la introducción del sitio de restricción de nucleasa se dirigen por las diferentes plantillas HDR.

Estas y otras características y ventajas de la presente invención se expondrán o serán más fácilmente evidentes en la descripción que sigue y en las reivindicaciones adjuntas. Las características y ventajas se pueden llevar a cabo y obtener por medio de los instrumentos y combinaciones particularmente indicados en las reivindicaciones adjuntas. Además, las características y ventajas de la invención pueden ser aprendidas por la práctica de la invención o serán evidentes a partir de la descripción, como se expone a partir de ahora.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Varias modalidades ejemplares de las composiciones y métodos de acuerdo con la invención se describirán con detalle, con referencia a las siguientes figuras en donde:

La FIGURA 1 es un dibujo del receptor de prolactina (PRLR) que muestra varias isoformas del péptido. El receptor wt es un dímero con cada monómero que tiene una longitud de 581 aa. Se muestran isoformas de origen natural del péptido.

5 La región transmembrana es representada por la estructura bilipídica horizontal a través del centro de la figura. El dominio extracelular es representado por el área arriba de la región transmembrana y, el dominio intracelular es el área por debajo del dominio intracelular. El fenotipo slick se

10 encuentra en 3 razas de ganado que tiene cada una isoforma diferente del PRLR. El Slick I expresado por la raza Senepol tiene un monómero truncado en el aa 461, por ejemplo, una pérdida del 120 aa final. El SLICK2 expresado por la raza Carora/Limonero tiene un monómero truncado en aa 496, una

15 pérdida de los 85 aa finales. El SLICK3 expresado por la raza Limonero se trunca en aa 464, una pérdida de los 115 aa finales. Los monómeros truncados son dominantes en la acción genética y herencia Mendeliana. Sin embargo, en una modalidad ejemplar de acuerdo con la invención, un rompimiento en el

20 péptido en cualquier lugar después de Y433 dará por resultado el fenotipo SLICK.

FIGURAS 2A y 2B. La FIGURA 2A muestra la secuencia genómica del Exón 10 (ver, GenBank AJ966356.4). El número de superíndice por los residuos subrayados identifica los

siguientes componentes de la secuencia: ¹⁾ Inicio del Exón 10 (9° exón); ²⁾ "tac" que codifica para tirosina 433; ³⁾ primeros 3 residuos en el mapa mostrados en la FIGURA 3; ⁴⁾ Residuos modificados para introducir el sitio Xbal "tctaga" para la
 5 identificación del SLICK1 RFLP; ⁵⁾ La supresión de SLICK1 de "c" da por resultado el cambio de marco; ⁶⁾ "t" a "a" introduce el sitio Nsil "atgcat" para la identificación de SLICK3; ⁷⁾ SLICK3 "c" a "a" da por resultado el codón de detención "taa"; ⁹⁾ residuos modificados para introducir el
 10 sitio Xball "tctaga" para la identificación de SLICK2 RFLP; 10) Últimos 3 residuos de la FIGURA 3. La FIGURA 2B es la secuencia de aminoácidos del péptido PRLR de longitud completa. En este mapa, los residuos subrayados identificados por superíndices son: ¹¹⁾ el dominio extracelular (1-251); ¹²⁾
 15 dominio transmembrana; dominio intracelular (295-581); ¹³⁾ Y433; ¹⁴⁾ la mutación de SLICK1 da por resultado rompimiento en la síntesis de proteínas; ¹⁵⁾ codón de detención prematuro SLICK3 generado; ¹⁶⁾ codón de detención prematuro SLICK2 generado.

20 La FIGURA 3 es un mapa del gen PRLR en el exón 10 que ilustra la estrategia de mutación utilizando TALENs.

La FIGURA 4 son lisados de células de bovino introgresadas para SLICK1 y que muestran los patrones de banda de enzimas de restricción para que el Xbal los digiera.

Mezclas de clones del panel izquierdo, clones individuales de panel derecho.

FIGURA 5 lisados celulares de células de bovino introgresadas para SLICK2 que muestra el corte con la enzima de restricción XbaI.

La FIGURA 6 es un gel que muestra el patrón de banda indicativo de la introgresión exitosa de la mutación SLICK2. RFLP = polimorfismo de longitud de fragmento de restricción.

FIGURA 7 geles que muestran lisados celulares de células de bovino transfectadas con TALENs y oligo para SLICK3. Panel izquierdo, lisado celular; panel derecho, lisado de la estrategia TALENs 9.12 que muestra la digestión positiva con NsiI.

FIGURA 8 análisis FLP de clones individuales transfectados con TALENs y oligo SLICK3.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Se describen en la presente animales de ganado editados con precisión y métodos para hacer que expresen el fenotipo slick. Los animales descritos en la presente expresan un alelo truncado para el gen del receptor de prolactina (PRLR). Cuando se expresan, los animales de ganado producen una PRLR que se está perdiendo en los residuos de 148 aminoácidos (aa) terminales de la proteína. En algunas modalidades el animal expresa una proteína que es truncada por 147 o 146 aa. En

algunos casos, el animal está perdiendo el 121 aa terminal. En algunas modalidades, el Animal de Ganado expresa una PRLR que está perdiendo el 69 aa terminal y muestra el fenotipo SLICK. Los artífices apreciarán inmediatamente que todos los intervalos y valores dentro del intervalo explícitamente establecidos son contemplados: por ejemplo, de 148 a 69. Es decir, cualquier PRLR que exprese como su último aminoácido tirosina en la posición 433 de la proteína traducida del ARNm que tiene el Número de Acceso de GenBank NM_001039726 expresará el fenotipo SLICK, con la advertencia de que el truncamiento después de la tirosina 512 puede no expresar el genotipo SLICK.

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen los mismos significados como es entendido comúnmente por uno de experiencia ordinaria en la técnica a la cual esta descripción pertenece. Todas las publicaciones y patentes mencionadas específicamente en la presente se incorporan a manera de referencia para todos los propósitos incluyendo describir y divulgar los químicos, instrumentos, análisis estadísticos y metodologías que se reportan en las publicaciones que se pueden utilizar en relación con la descripción. Todas las referencias citadas en esta especificación se van a tomar como indicativas del nivel de

experiencia en la técnica. Nada en la presente se va a considerar como una admisión de que la descripción no tiene derecho a anteceder esta descripción en virtud de la invención previa.

5 Cabe destacar que como se utiliza en la presente y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "uno/una", "el/la" incluyen referencias plurales a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. También, los términos "un" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se
10 pueden utilizar intercambiablemente en la presente. También se va a indicar que los términos "que comprende", "que incluye", "caracterizado por" y "que tiene" se pueden utilizar intercambiablemente.

 "Efectos Genéticos Aditivos" como se utiliza en la
15 presente significa efectos génicos individuales promedio que se pueden transmitir de padre a progenie.

 "Alelo" como se utiliza en la presente se refiere a una forma alterna de un gen. También puede ser pensado como variaciones de la secuencia de ADN. Por ejemplo si un animal
20 tiene el genotipo para un gen específico de Bb, entonces tanto B como b son alelos.

 Como se utiliza en la presente, el término "romper la síntesis de proteínas" se refiere a cualquier supresión, inserción o mutación que crea un codón de detención o cambio

de marco que hace una detención prematura de la síntesis de proteínas.

“Marcador de ADN” se refiere a una variación de ADN específico que se puede someter a prueba para asociación con
5 una característica física.

“Genotipo” se refiere a la constitución genética de un animal.

“Genotipificación (prueba del marcador de ADN)” se refiere al proceso por el cual el animal se somete a prueba
10 para determinar los alelos particulares que lleva para una prueba genética específica.

“Atributos simples” se refiere a atributos tal como color del pelaje y estado de los cuernos y algunas enfermedades que son llevadas por un gen individual.

15 “Atributos Complejos” se refiere a atributos tal como reproducción, crecimiento y canal que son controlados por genes numerosos.

“Alelo complejo” - región de codificación que tiene más de una mutación dentro de él. Esto hace más difícil
20 determinar el efecto de una mutación dada debido a que los investigadores no pueden estar seguros qué mutación dentro del alelo está provocando el efecto.

“Variación de número de copias” (CNVs) una forma de variación estructural-son alteraciones del ADN de un genoma

que da por resultado que la célula tenga una variación anormal o, para ciertos genes, una variación normal en el número de copias de una o más secciones del ADN. Las CNVs corresponden a regiones relativamente grandes del genoma que se han suprimido (menos del número normal) o duplicado (más del número normal) en ciertos cromosomas. Por ejemplo, el cromosoma que tiene normalmente secciones en orden como A-B-C-D en cambio podrían tener secciones A-B-C- patrones de "Elementos repetitivos" de ácidos nucleicos (ADN o ARN) que se presentan en varias copias por todo el genoma. El ADN repetitivo primero se detectó debido a su rápida cinética de asociación.

"Variación cuantitativa" la variación medida en unidades continuas (por ejemplo altura en seres humanos) en lugar de unidades discretas o categorías. Ver variación continua. La existencia de un intervalo de fenotipos para un carácter específico, diferenciado por grado menor que por las diferencias cualitativas distintas.

"Homocigoto" se refiere a tener dos copias del mismo alelo para un gen individual tal como BB.

"Heterocigoto" se refiere a tener diferentes copias de alelos para un gen individual tal como Bb."

"Sitio (plural "sitios") se refiere a las ubicaciones específicas de un marcador o un gen.

"Centimorgan (Cm)" una unidad de frecuencia recombinante para medir el linaje genético. Se define como la distancia entre las posiciones cromosómicas (también llamadas, sitios o marcadores) por lo cual el número promedio esperado de los cruces cromosómicos de intervención en una generación individual es 0.01. Se utiliza frecuentemente para inferir la distancia a lo largo de un cromosoma. Sin embargo no es una distancia física real.

"Cruce cromosómico" ("cruce") es el intercambio del material genético entre cromosomas homólogos heredados por un individuo de su madre y padre. Cada individuo tiene un conjunto diploide (dos cromosomas homólogos, por ejemplo $2n$) cada uno heredado de su madre y padre. Durante la meiosis I puede presentarse el duplicado de cromosomas ($4n$) y la cruza entre las regiones homologas de los cromosomas recibidos de la madre y padre dando por resultado nuevos conjuntos de información genética dentro de cada cromosoma. La meiosis I es seguida por dos fases de la división celular que da por resultado cuatro gametos haploides ($1n$) y lleva cada uno un conjunto único de información genética. Debido a que la recombinación genética da por resultado nuevas secuencias de genes o combinaciones de genes, se incrementa la diversidad. El cruce se presenta usualmente cuando las regiones homólogas en los cromosomas homólogos se rompen y después se vuelven a

conectar al otro cromosoma.

“Selección Asistida por Marcadores (MAS)” se refiere al proceso por el cual la información del marcador de ADN se utiliza para ayudar a hacer decisiones de manejo.

5 “Panel Marcador” una combinación de dos o más marcadores de ADN que se asocian con un atributo particular.

“Efectos Genéticos no Aditivos” se refiere a los efectos tal como dominancia y epistasis. La codominancia es la interacción de los alelos en el mismo sitio mientras que la
10 epistasis es la interacción de alelos de diferentes sitios.

“Nucleótido” se refiere a un componente estructural de ADN que incluye uno de los cuatro químicos base: adenina (A), timina (T), guanina (G), y citosina (C).

“Fenotipo” se refiere a la experiencia exterior de un
15 animal que se puede medir. Los fenotipos son influidos por la constitución genética de un animal y el medio ambiente.

“Polimorfismo de Nucleótidos Individuales (SNP)” es un cambio de nucleótidos individuales en una secuencia de ADN.

“Genotipo haploide” o “haplotipo” se refiere a una
20 combinación de alelos, sitios o polimorfismos de ADN que se ligan para co-segregarse de esta manera en una porción significativa de gametos durante la meiosis. Los alelos de un haplotipo pueden estar en desequilibrio de ligación (LD).

“Desequilibrio de ligación (LD)” es la asociación no

aleatoria de alelos en diferentes sitios es decir, la presencia de asociaciones estadísticas entre los alelos en diferentes sitios que son diferentes de los que se esperaría si los alelos fueran independientemente, aleatoriamente muestrados basado en sus frecuencias de alelos individuales. Si no hay desequilibrio de ligación entre los alelos en diferentes sitios se dice que están en equilibrio de ligación.

El término "polimorfismo de longitud de fragmento de restricción" o "RFLP" se refiere a cualquiera de una de las diferentes longitudes de fragmentos de ADN producidas por la digestión de restricción del ADN genómico o ADNc con una o más enzimas endonucleasa, en donde la longitud del fragmento varía entre los individuos en una población.

"Introgresión" también conocida como "hibridación introgresiva", es el movimiento de un gen o alelo (flujo de genes) de una especie en el grupo de genes de otro por el retrocruzamiento repetido de un híbrido inter-específico con uno de su especie precursora. La introgresión intencionada es un proceso a largo plazo, puede hacer muchas generaciones de híbridos antes de que se presente el retrocruzamiento.

"Introgresión no meiótica" introgresión genética a través de la introducción de un gen o alelo en una célula diploide (no genética). La introgresión no meiótica no

depende de la reproducción sexual y no requiere retrocruzamiento y, significativamente, se lleva a cabo en una generación individual. En la introgresión no meiótica un alelo se introduce en un haplotipo a través de la
5 recombinación homóloga. El alelo se puede introducir en el sitio de un alelo existente para ser editado del genoma o el alelo se puede introducir en cualquier otro sitio deseable.

Como se utiliza en la presente el término "modificación genética" se refiere a la manipulación directa de un genoma
10 del organismo utilizando biotecnología.

Como se utiliza en la presente la frase "edición de genes de precisión" significa una modificación genética de proceso que permite que el genetista introduzca (introgrese) cualquier atributo natural en cualquier raza, en una manera
15 específica de sitio sin el uso del ADN recombinante.

"Nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALENs)" una tecnología para la edición de genes son enzimas de restricción artificiales generadas para enfocar un dominio de enlace a ADN de efector TAL a un dominio de escisión de
20 ADN.

"Nucleasas de dedo de zinc (ZFNs)" como se utiliza en la presente es otra tecnología utilizada para la edición de genes y son una clase de proteínas de enlace a ADN modificadas que facilitan la edición orientada del genoma al

crear rompimientos de hebra doble en el ADN en las ubicaciones especificadas de usuario.

“Meganucleasa” como se utiliza en la presente es otra tecnología útil para la edición de genes y son
5 endodesoxirribonucleasas caracterizadas por un sitio de reconocimiento grande (secuencias de ADN de doble hebra de 12 a 40 pares bases); un resultado de este sitio se presenta en general solo una vez en cualquier genoma dado. Por ejemplo, la secuencia de 18 pares bases reconocida por la I-SceI
10 meganucleasa en promedio requeriría un genoma veinte veces el tamaño del genoma humano que se encuentra una vez por probabilidad (aunque las secuencias con una coincidencia individual se presenta aproximadamente tres veces por genoma de tamaño humano). La meganucleasas por lo tanto se considera
15 que son las enzimas de restricción de origen natural más específicas.

Tecnología “CRISPR/CAS” como se utiliza en la presente se refiere a “CRISPRs” (repeticiones palindrómicas cortas regularmente interespaciadas agrupadas) segmentos de
20 repeticiones cortas que contienen ADN procariota de secuencias base. Cada repetición es seguida por segmentos cortos de “ADN espaciador” de exposiciones previas a un virus bacteriano o plásmido. “CAS” (proteína 9 asociada CRISPR) es una enzima de ADN endonucleasa guiada por ARN asociada con el

CRISPR. Al suministrar la proteína Cas9 y los ARNs guía apropiados en una célula, el genoma del organismo se puede cortar en cualquier ubicación deseada.

“Indel” como se utiliza en presente es abreviado para
5 “inserción” o “supresión” que se refiere a una modificación del ADN en un organismo.

Como se utiliza en la presente el término “huevo renucleado” se refiere a un huevo enucleado utilizado para la transferencia nuclear de células somáticas en el cual el
10 núcleo modificado de las células somáticas se ha introducido.

“Marcador genético” como se utiliza en la presente se refiere a un gen/alelo o secuencia de ADN conocida con una ubicación conocida en un cromosoma. Los marcadores pueden ser cualquier marcador genético, por ejemplo, uno o más alelos,
15 haplotipos, haplogrupos, sitios, sitios de atributos cuantitativos, o polimorfismos de ADN [polimorfismos de longitud de fragmento de restricción (RFLPs), polimorfismos de longitud de fragmento amplificado (AFLPs), polimorfismos nucleares individuales (SNPs), indeles, repeticiones en
20 tándem cortas (STRs), microsatélites y minisatélites]. Convenientemente, los marcadores son SNPs o STRs tal como microsatélites y de manera más preferente SNPs. De manera más preferente, los marcadores dentro de cada segmento de cromosoma están en desequilibrio de ligación.

Como se utiliza en la presente el término "animal hospedero" significa un animal que tiene un complemento genético nativo de una especie reconocida o raza de animal.

Como se utiliza en la presente "haplotipo nativo" o
5 "genoma nativo" significa el ADN natural de una especie particular o raza de animal que se elige para ser el recipiente de un gen o alelo que no está presente en el animal hospedero.

Como se utiliza en la presente el término "sitio
10 objetivo" significa una ubicación específica de un alelo conocido en un cromosoma.

Como se utiliza en la presente, el término "atributo cuantitativo" se refiere a un atributo que se ajusta en categorías discretas. Los atributos cuantitativos se
15 presentan como un intervalo continuo de variación tal como cantidad de leche que una raza particular puede dar o la longitud de una cola. En general, un grupo más grande de genes controla los atributos cuantitativos.

Como se utiliza en la presente, el término "atributo
20 cualitativo" se utiliza para referirse a un atributo que se encuentra en diferentes categorías. Estas categorías no tienen ningún cierto orden. Como regla general, los atributos cualitativos son monogénicos, significa que el atributo es influenciado por un gen individual. Ejemplos de atributos

cualitativos incluyen tipo de sangre y color de la flor, por ejemplo.

Como se utiliza en la presente, el término "sitio de atributo cuantitativo (QTL)" es una sección de ADN (el sitio) que se correlaciona con la variación en un fenotipo (el atributo cuantitativo).

Como se utiliza en la presente, el término "clonación" significa la producción de organismos genéticamente idénticos asexualmente.

"Transferencia nuclear de células somáticas" ("SCNT") es una estrategia para clonar un embrión viable de una célula del cuerpo y una célula de huevo. La técnica consiste tomar un ovocito enucleado (célula de huevo) e implantar un núcleo donador de una célula somática (cuerpo).

"Ortólogo" como se utiliza en la presente se refiere a un gen con función similar a un gen en una especie evolucionariamente relacionada. La identificación de ortólogos es útil para la predicción de la función génica. En el caso del ganado, los genes ortólogos se encuentran por todo el reino animal y aquellos encontrados en otros mamíferos pueden ser particularmente útiles para el reemplazo transgénico. Esto es particularmente cierto para animales de la misma especie, raza o linajes en donde las especies se definen dos animales tan relacionados estrechamente y son

capaces de producir descendientes fértiles a través de la reproducción sexual; raza se define como un grupo específico de animales domésticos que tienen fenotipo homogéneo, comportamiento homogéneo y otras características que definen al animal de otros de la misma especie; y en donde el linaje se define como una línea continua de descendientes; una serie de organismos, poblaciones, células, o genes conectados por relaciones de ancestros/descendientes. Por ejemplo el ganado domesticado son de dos linajes distintos que surgen ambos de uros antiguos. Un linaje desciende de la domesticación de uros en Este Medio mientras que el segundo linaje distinto desciende de la domesticación de los uros en el subcontinente Indio.

“Genotipificación” o “prueba genética” se refiere en general a detectar uno o más marcadores de interés por ejemplo, SNPs en una muestra de un individuo que se somete a prueba, y analizar los resultados obtenidos para determinar el haplotipo del sujeto. Como será evidente a partir de la descripción y en la presente, es una modalidad ejemplar detectar el uno o más marcadores de interés utilizando un sistema de alto rendimiento que comprende un soporte sólido que consiste esencialmente de o que tiene ácidos nucleicos de diferente secuencia enlazados directamente o indirectamente a la misma, en donde cada ácido nucleico de diferente secuencia

comprende un marcador genético polimórfico derivado de un ancestro o fundador que es representativo de la población actual y, de manera más preferente en donde el sistema de alto rendimiento comprende suficientes marcadores para ser
5 representantes del genoma de la población actual. Las muestras preferidas para genotipificación comprende el ácido nucleico, por ejemplo, ARN o ADN genómico y de manera preferente ADN genómico. Una raza de animal de ganado se puede establecer fácilmente al evaluar sus marcadores
10 genéticos.

"SLICK" como se utiliza en la presente se refiere a un fenotipo de artiodáctilos y ganado en particular que tiene una longitud de pelaje recortada, la densidad de pelo, tipo de pelo, densidad de glándulas sudoríparas y eficiencia
15 termorreguladora incrementada. El gen que afecta a este fenotipo se ha identificado como el gen receptor de prolactina encontrado en cromosoma 20 del ganado.

El término "próximo" como se utiliza en la presente significa cercano a.

20 El ganado se puede genotipificar para identificar varios marcadores genéticos. La Genotipificación es un término que se refiere al proceso para determinar diferencias en la constitución genética (genotipo) de un individuo al determinar la secuencia de ADN del individuo utilizando un

ensayo biológico y comparándolo con otra secuencia del individuo o a una secuencia de referencia. Un marcador genético es una secuencia de ADN conocida, con una ubicación conocida en un cromosoma; se transmiten constantemente a través de la crianza, de modo que se pueden rastrear a través de una ascendencia o filogenia. Los marcadores genéticos pueden ser una secuencia que comprende una pluralidad de bases, o un polimorfismo de un nucleótido individual (SNP) en una ubicación conocida. La raza de un animal de ganado se puede establecer fácilmente al evaluar sus marcadores genéticos. Muchos marcadores son conocidos y hay muchas técnicas de medición diferentes que intentan correlacionar los marcadores a los atributos de interés, o establecer un valor genético de un animal para propósitos de reproducción futura o valor esperado.

Reparación dirigida por homología (HDR)

La reparación dirigida por homología (HDR) es un mecanismo en las células para reparar las lesiones de ADNss y ADN de hebra doble (ADNds). Este mecanismo de reparación se puede utilizar por la célula cuando existe una plantilla de HDR presente que tiene una secuencia con homología significativa al sitio de la lesión. El enlace específico, como ese término se utiliza comúnmente en las técnicas biológicas, se refiere a una molécula que se enlaza a un objetivo con una afinidad

relativamente alta comparada con los tejidos no objetivo, e implica en general una pluralidad de interacciones no covalentes, tal como interacciones electrostáticas, interacciones de van der Waals, enlace de hidrógeno y similar. La hibridación específica es una forma de enlace específico entre ácidos nucleicos que tienen secuencias complementarias. Las proteínas también se pueden enlazar específicamente al ADN, por ejemplo, en los sistemas TALENs o CRISPR/Cas9, o por motivos Gal4. La introgresión de un alelo se refiere a un proceso para copiar un alelo exógeno sobre un alelo endógeno con un proceso guiado por plantilla. El alelo endógeno actualmente se podría escindir y reemplazar por un alelo de ácido nucleico exógeno en algunas situaciones pero la presente teoría es que el proceso es un mecanismo de copiado. Puesto que los alelos son pares de genes, existe homología significativa entre ellos. El alelo podría ser un gen que codifica una proteína, o podría tener otras funciones tal como codificar una cadena de ARN bioactiva o proporcionar un sitio para recibir una proteína reguladora o ARN.

La plantilla de HDR es un ácido nucleico que comprende el alelo que está siendo introgresado. La plantilla puede ser un ADNds o un DNA de hebra individual (ADNss). Las plantillas de ADNss son de manera preferente de aproximadamente 20 a aproximadamente 5000 residuos aunque otras longitudes se

pueden utilizar. Los artífices apreciarán inmediatamente que todos los intervalos y valores dentro del intervalo explícitamente establecido son contemplados; por ejemplo, de 500 a 1500 residuos, de 20 a 100 residuos, y así sucesivamente. La plantilla puede comprender además secuencias flanco que proporcionan homología al ADN adyacente al alelo endógeno o al ADN que se va a reemplazar. La plantilla también puede comprender una secuencia que se enlaza a un sistema de nucleasa objetivo, y de esta manera el sitio de enlace cognado para el miembro de enlace ADN del sistema. El término cognado se refiere a dos biomoléculas que interactúan típicamente, por ejemplo, un receptor y su ligando. En el contexto de los procesos HDR, una de las biomoléculas se puede diseñar con una secuencia que se enlaza con uno propuesto, es decir, cognado, sitio de ADN o sitio de proteína.

Sistemas de Endonucleasa Objetivo

Las herramientas de edición de genoma tal como nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALENs) y nucleasas de dedo de zinc (ZFNs) han impactado los campos de la biotecnología, la terapia génica y los estudios genómicos funcionales en muchos organismos. De manera más reciente, las endonucleasas guiadas por ARN (RGENs) se dirigen a sus sitios objetivo por una molécula de ARN complementaria. El sistema

Cas9/CRISPR es un REGEN. tracrARN es otra de esta herramienta. Existen ejemplos de sistemas de nucleasa objetivo: estos sistemas tienen un miembro de enlace ADN que localiza la nucleasa a un sitio objetivo. El sitio entonces se corta por la nucleasa. TALENs y ZFNs tienen la nucleasa fusionada al miembro de enlace ADN. Cas9/CRISPR son cognados que se encuentran entre sí en el ADN objetivo. El miembro de enlace ADN tiene una secuencia cognada en el ADN cromosómico. El miembro de enlace ADN se diseña típicamente en vista de la secuencia cognada y propuesta para obtener una acción nucleolítica en o cerca de un sitio propuesto. Ciertas modalidades son aplicables a todos estos sistemas sin limitación; incluyendo, modalidades que minimizan la rescisión de nucleasa, modalidades para hacer los SNPs con precisión en un residuo propuesto, y colocación del alelo que está introgresado en el sitio de enlace ADN.

TALENS

El término TALEN, como se utiliza en la presente, es amplio e incluye un TALEN monomérico que puede escindir el ADN de hebra doble sin ayuda de otro TALEN. El término TALEN también se utiliza para referirse a uno o ambos miembros de un par de TALENs que se modifican para funcionar conjuntamente para escindir el ADN en el mismo sitio. Los TALENs que funcionan conjuntamente pueden ser referidos como un TALEN izquierdo y

TALEN derecho, que hace referencia a la destreza del ADN o un par de TALEN.

El cifrado para los TALs se ha reportado (Publicación del PCT WO 2011/072246) en donde cada repetición de enlace a
5 ADN es responsable por reconocer un par base en la secuencia de ADN objetivo. Los residuos se pueden ensamblar para fijar como objetivo una secuencia de ADN. En resumen, un sitio objetivo para el enlace de un TALEN se determina y una molécula de fusión que comprende una nucleasa y una serie de
10 RVDs que reconoce el sitio objetivo se crea. En el enlace, la nucleasa escinde el ADN de modo que la maquinaria de reparación celular puede operar para hacer una modificación genética en los extremos cortados. El término TALEN significa una proteína que comprende un dominio de enlace efector tipo
15 Activador de Transcripción (TAL) y un dominio de nucleasa e incluye TALENs monoméricos que son funcionales *per se* así como otros que requieren dimerización con otro TALEN monomérico. La dimerización puede dar por resultado un TALEN homodimérico cuando ambos TALEN monoméricos son idénticos o
20 pueden dar por resultado un TALEN heterodimérico cuando el TALEN monomérico es diferente. Los TALENs han mostrado que inducen la modificación génica en las células humanas inmortalizadas por medio de las dos rutas de reparación de ADN eucariota principales, la unión de extremo no homólogo

(NHEJ) y la reparación dirigida por homología. Los TALENs se usan frecuentemente en pares pero son conocidos TALENs monoméricos. Las células para el tratamiento por TALENs (y en otras herramientas genéticas) incluyen una célula cultivada, una célula immortalizada, una célula primaria, una célula somática primaria, un cigoto, una célula germinal, una célula germinal primordial, un blastocito o una célula madre. En algunas modalidades, un efector TAL se puede utilizar para fijar como objetivo otros dominios de proteínas (por ejemplo, dominios de proteína no de nucleasa) para secuencias de nucleótidos específicas. Por ejemplo, un efector TAL se puede ligar a un dominio de proteína de, sin limitación, una enzima de interacción de ADN (por ejemplo, una metilasa, una topoisomerasa, una integrasa, una transposasa o una ligasa), activadores de transcripción o represores, o una proteína que interactúa con o modifica otras proteínas tal como histonas. Las aplicaciones de tales fusiones efectoras TAL incluyen, por ejemplo, crear o modificar elementos reguladores epigenéticos, hacer inserciones específicas de sitio, supresiones, o reparaciones en el ADN, controlar la expresión génica, y modificar la estructura de cromatina.

El término nucleasa incluye exonucleasas y endonucleasas. El término endonucleasa se refiere a cualquier enzima de tipo natural o variante capaz de catalizar la

hidrólisis (escisión) de enlaces entre los ácidos nucleicos dentro de una molécula de ADN o ARN, de manera preferente una molécula de ADN. Ejemplos no limitantes de endonucleasas incluyen endonucleasas de restricción tipo II tal como *FokI*,
5 *HhaI*, *HindIII*, *NotI*, *BbvCI*, *EcoRI*, *BglII* y *AlwI*. Las endonucleasas comprenden también endonucleasas de corte raro cuando tienen típicamente un sitio de reconocimiento de polinucleótidos de aproximadamente 12-45 pares bases (bp) en longitud, de manera más preferente de 14-45 bp. Las
10 endonucleasas de corte raro inducen los rompimientos de ADN de doble hebra (DSBs) en un sitio definido. Las endonucleasas de corte raro por ejemplo pueden ser una endonucleasa orientada, una nucleasa de dedos de zinc quimérica (ZFN) que resulta de la fusión de dominios de dedo de zinc modificados
15 con el dominio catalítico de una enzima de restricción tal como *FokI* o una endonucleasa química. En las endonucleasas químicas, un escindidor químico o peptídico se conjuga ya sea con un polímero de ácidos nucleicos o con otro ADN que reconoce una secuencia objetivo específica, fijando como
20 objetivo de esta manera la actividad de escisión de una secuencia específica. Las endonucleasas químicas también abarcan nucleasas sintéticas tipo conjugados de ortofenantrolina, una molécula de escisión de ADN, y oligonucleótidos formadores de triplex (TFOs), conocidos por

enlazar secuencias de ADN específicas. Estas endonucleasas químicas están comprendidas en el término "endonucleasa" de acuerdo con la presente invención. Ejemplos de estas endonucleasa incluyen *I-Sce I*, *I-Chu I*, *I-Cre I*, *I-Csm I*, *PI-Sce I*, *PI-Tti I*, *PI-Mtu I*, *I-Ceu I*, *I-Sce II*, *I-Sce III*, *HO*, *PI-Civ I*, *PI-Ctr I*, *PI-Aae I*, *PI-Bsu I*, *PI-Dha I*, *PI-Dra I*, *PI-Mav I*, *PI-Meh I*, *PI-Mfu I*, *PI-Mfl I*, *PI-Mga I*, *PI-Mgo I*, *PI-Min I*, *PI-Mka I*, *PI-Mle I*, *PI-Mma I*, *PI-Msh I*, *PI-Msm I*, *PI-Mth I*, *PI-Mtu I*, *PI-Mxe I*, *PI-Npu I*, *PI-Pfu I*, *PI-Rma I*, *PI-Spb I*, *PI-Ssp I*, *PI-Fae I*, *PI-Mja I*, *PI-Pho I*, *PI-Tag I*, *PI-Thy I*, *PI-Tko I*, *PI-Tsp I*, *I-MsoI*.

Una modificación genética hecha por los TALENs u otras herramientas puede ser, por ejemplo, elegida de la lista que consiste de una inserción, supresión, inserción de un fragmento de ácido nucleico exógeno y una sustitución. El término inserción se utiliza ampliamente para proponer ya sea inserción literal en el cromosoma o el uso de la secuencia exógena como una plantilla para reparación. En general, se define un sitio de ADN objetivo y se crea un par de TALEN que se enlazarán específicamente al sitio. El TALEN se suministra a la célula o embrión, por ejemplo, como una proteína, ARNm o por un vector que codifica el TALEN. El TALEN escinde el ADN para hacer un rompimiento hebra doble que después se repara, dando por resultado frecuentemente la creación de un indel, o

incorporando secuencias o polimorfismos contenidos en un ácido nucleico exógeno acompañante que ya sea se inserta en el cromosoma o sirve como una plantilla para reparación del rompimiento con una secuencia modificada. Esta reparación
5 conducida por plantilla es un proceso útil para cambiar un cromosoma, y proporciona cambios efectivos a los cromosomas celulares.

El término ácido nucleico exógeno significa un ácido nucleico que se agrega a la célula o embrión, sin considerar
10 si el ácido nucleico es el mismo o distinto de las secuencias de ácido nucleico naturalmente en la célula. El término fragmento de ácido nucleico es amplio e incluye un cromosoma, casete de expresión, gen, ADN, ARN, ARNm, o porción de los mismos. La célula o embrión puede ser, por ejemplo, elegido
15 del grupo que consiste de vertebrados no humanos, primates no humanos, ganado, caballo, cerdo, oveja, pollo, aviar, conejo, cabras, perros, gatos, animal de laboratorio y peces.

Algunas modalidades implican una composición o un método para hacer un ganado genéticamente modificado y/o
20 artiodáctilo que comprende introducir un par de TALEN en la célula o embrión del ganado y/o artiodáctilo que hace una modificación genética al ADN de la célula o embrión en un sitio que se enlaza específicamente por el par de TALEN, y produce el animal/artiodáctilo de ganado de la célula. La

inyección directa se puede utilizar para la célula o embrión, por ejemplo, en un cigoto, blastocito o embrión. Alternativamente, el TALEN y/u otros factores se pueden introducir en la célula utilizando cualquiera de muchas técnicas conocidas para la introducción de proteínas, ARN, ARNm, ADN o vectores. Los animales genéticamente modificados se pueden hacer de dos embriones o células de acuerdo con los procesos conocidos, por ejemplo, implante del embrión en un hospedero gestacional, o varios métodos de clonación. La frase "una modificación genética al ADN de la célula en un sitio que se enlaza específicamente por el TALEN", o similar, significa que la modificación genética se hace en el sitio cortado por la nucleasa en el TALEN cuando el TALEN se enlaza específicamente a su sitio objetivo. La nucleasa no se corta exactamente donde el par de TALEN se enlaza, sino más bien en un sitio definido entre los dos sitios de enlace.

Algunas modalidades implican una composición o un tratamiento de una célula que se utiliza para clonar el animal. La célula puede ser una célula de ganado y/o de artiodáctilo, una célula cultivada, una célula primaria, una célula somática primaria, un cigoto, una célula germinal, una célula germinal primordial, o una célula madre. Por ejemplo, una modalidad es una composición o un método para crear una modificación genética que comprende exponer una pluralidad de

células primarias en un cultivo a las proteínas TALEN o un ácido nucleico que codifica un TALEN o TALENs. Los TALENs se pueden introducir como proteínas o como fragmentos de ácido nucleico, por ejemplo, codificados por el ARNm o una
5 secuencia de ADN en un vector.

Nucleasas de Dedo de Zinc

Las nucleasas de dedo de zinc (ZFNs) son enzimas de restricción artificiales generadas al fusionar un dominio de enlace a ADN de dedo de zinc a un dominio de escisión de ADN.
10 Los dominios de dedo de zinc se pueden modificar para fijar como objetivo secuencias de ADN deseadas y esto permite que las nucleasas de dedo de zinc fijen como objetivo secuencias únicas dentro de los genomas complejos. Al tomar ventaja de la maquinaria de reparación de ADN endógeno, estos reactivos
15 se pueden utilizar para alterar los genomas de organismos superiores. Las ZFNs se pueden utilizar en el método para inactivar genes.

Un dominio de enlace a ADN de dedo de zinc tiene aproximadamente 30 aminoácidos y se pliega en una estructura
20 estable. Cada dedo se enlaza principalmente a un triplete dentro del sustrato de ADN. Los residuos de aminoácidos en posiciones claves contribuyen a la mayoría de las interacciones específicas de secuencia con el sitio de ADN. Estos aminoácidos se pueden cambiar mientras que mantienen

los aminoácidos restantes para conservar la estructura necesaria. El enlace a secuencias de ADN más largas se logra al ligar varios dominios en tándem. Otras funcionalidades tipo dominio de escisión FokI no específico (N), dominios 5 activadores de transcripción (A), dominios de represores de transcripción (R) y metilasas (M) se pueden fusionar a una ZFPs para formar ZFNs respectivamente, los activadores de transcripción de dedo de zinc (ZFA), represores de transcripción de dedo de zinc (ZFR y dedo de zinc metilasas 10 (ZFM)). Los materiales y métodos para utilizar dedos de zinc y nucleasas de dedo de zinc para hacer animales genéticamente modificados se describen en, por ejemplo, U.S. 8,106,255; U.S. 2012/0192298; U.S. 2011/0023159; y U.S. 2011/0281306.

Vectores y Ácidos Nucleicos

15 Una variedad de ácidos nucleicos se pueden introducir en las células, para propósitos de inactivación, para inactivación de un gen, para obtener la expresión de un gen, o para otros propósitos. Como se utiliza en la presente, el término ácido nucleico incluye ADN, ARN, y análogos de ácido nucleico, y 20 ácidos nucleicos que son de doble hebra o hebra individual (es decir, una hebra individual de sentido o antisentido). Los análogos de ácido nucleico se pueden modificar en la porción base, porción de azúcar, o cadena principal de fosfato para mejorar, por ejemplo, la estabilidad,

hibridación o solubilidad del ácido nucleico. La cadena principal de fosfato desoxirribosa se puede modificar para producir ácidos nucleicos morfolinos, en los cuales cada porción base se liga a un anillo morfolino, de seis miembros, o ácidos nucleicos peptídicos, en los cuales la cadena principal de desoxifosfato se reemplaza por una cadena principal de pseudopéptido y se retienen las cuatro bases.

La secuencia de ácido nucleico objetivo se puede ligar operablemente a una región reguladora tal como un promotor. Las regiones reguladoras pueden ser regiones reguladoras de porcino o pueden ser de otra especie. Como se utiliza en la presente, operablemente ligado se refiere al posicionamiento de una región reguladora con respecto a una secuencia de ácido nucleico de tal manera para permitir o facilitar la transcripción del ácido nucleico objetivo.

En general, el tipo de promotor se puede ligar operablemente a una secuencia de ácido nucleico objetivo. Ejemplos de promotores incluyen, sin limitación, promotores específicos de tejido, promotores constitutivos, promotores inducibles, y promotores sensibles o no sensibles a un estímulo particular. En algunas modalidades, un promotor que facilita la expresión de una molécula de ácido nucleico sin especificidad de tejido o temporal significativa se puede utilizar (es decir, un promotor constitutivo). Por ejemplo,

un promotor de beta-actina tal como el promotor del gen de beta-actina de pollo, promotor de ubiquitina, promotor de miniCAGs, promotor de gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), o promotor de 3-fosfoglicerato cinasa (PGK) se puede
5 utilizar, así como promotores virales tal como el promotor timidina cinasa (HSV-TK) del virus de herpes simple, el promotor SV40, o un promotor de citomegalovirus (CMV). En algunas modalidades, una fusión del promotor del gen de beta-actina de pollo y el potenciador de CMV se utiliza como un
10 promotor. Ver por ejemplo, Xu y colaboradores, Hum. Gene Ther., 12:563, 2001; y Kiwaki y colaboradores, Hum. Gene Ther., 7:821, 1996.

Las regiones reguladoras adicionales que pueden ser útiles en los constructos de ácido nucleico incluyen, pero no
15 se limitan a, secuencias de poliadenilación, secuencias de control de traducción (por ejemplo, un segmento de entrada de ribosoma interno, IRES), potenciadores, elementos inducibles, o intrones. Estas regiones reguladoras pueden no ser necesarias, aunque pueden incrementar la expresión al afectar
20 la transcripción, estabilidad del ARNm, la eficiencia traduccional, o similar. Estas regiones reguladoras se pueden incluir en un constructo de ácido nucleico como se desee para obtener la expresión óptima de los ácidos nucleicos en la célula(s). La expresión suficiente, sin embargo, algunas

veces se puede obtener sin estos elementos adicionales.

Se puede utilizar un constructo de ácido nucleico que codifica los péptidos señal o los marcadores expresados seleccionables. Se pueden utilizar péptido señal tal que un polipéptido codificado se dirige a una ubicación celular particular (por ejemplo, la superficie celular). Ejemplos no limitantes de marcadores seleccionables incluyen puromicina, ganciclovir, adenosina desaminasa (ADA), aminoglicósido fosfotransferasa (neo, G418, APH), dihidrofolato reductasa (DHFR), higromicina-B-fosfotransferasa, timidina cinasa (TK), y xantina-guanina fosforibosiltransferasa (XGPRT). Estos marcadores son útiles para seleccionar transformantes estables en el cultivo. Otros marcadores seleccionables incluyen polipéptidos fluorescentes, tal como proteína fluorescente verde o proteína fluorescente amarilla.

En algunas modalidades, una secuencia que codifica un marcador seleccionable se puede flanquear por secuencias de reconocimiento para una recombinasa tal como, por ejemplo, Cre o Flp. Por ejemplo, el marcador seleccionable se puede flanquear por sitios de reconocimiento *loxP* (sitios de reconocimiento de 34-pb reconocidos por la Cre recombinasa) o los sitios de reconocimiento FRT tal que el marcador seleccionable se puede escindir del constructo. Ver, Orban y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., 89:6861, 1992, para

una revisión de Cre/lox technology, y Brand y Dymecki, Dev. Cell, 6:7, 2004. Un transposon que contiene un transgen activable Cre- o Flp ininterrumpido por un gen de marcador seleccionable también se puede utilizar para obtener los
5 animales transgénicos con la expresión condicional de un transgen. Por ejemplo, un promotor que conduce la expresión del marcador/transgen puede ser ya sea ubicuo o específico de tejido, lo cual podría dar por resultado que la expresión ubicua o específica de tejido del marcador en animales F0
10 (por ejemplo, cerdos). La activación específica de tejido del transgen se puede lograr, por ejemplo, al cruzar un cerdo que expresa ubicuamente un transgen interrumpido por marcador a un cerdo que expresa Cre o Flp en una manera específica de tejido, o al cruzar un cerdo que expresa un transgen
15 interrumpido por marcador en una manera específica de tejido a un cerdo que expresa ubicuamente la Cre o Flp recombinasa. La expresión controlada del transgen o escisión controlada de marcador permite la expresión del transgen.

En algunas modalidades, el ácido nucleico exógeno
20 codifica un polipéptido. Una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido puede incluir una secuencia tag que codifica una "tag" designada para facilitar la manipulación subsecuente del polipéptido codificado (por ejemplo, para facilitar la localización o detección). Las secuencias Tag se

pueden insertar en la secuencia de ácido nucleico que codifica el polipéptido tal que la tag codificada se sitúa en ya sea la carboxilo o amino-terminal del polipéptido. Ejemplos no limitantes de tags codificadas incluyen glutationa S-transferasa (GST) y etiqueta FLAG^{MR} (Kodak, New Haven, CT).

Los constructos de ácido nucleico se pueden introducir en células de artiodáctilos/ganado embriónicos, fetales o adultos de cualquier tipo, incluyendo, por ejemplo, células germinales tal como ovocito o un huevo, una célula progenitora, una célula madre adulto o embriónica, una célula germinal primordial, una célula de riñón tal como una célula PK-15, una célula de islotes, un célula beta, una célula de hígado, o un fibroblasto tal como un fibroblasto dérmico, utilizando una variedad de técnicas. Ejemplos no limitantes de técnica incluyen el uso de sistemas de transposones, virus recombinantes que pueden infectar células, o liposomas u otros métodos no virales tal como electroporación, microinyección, o precipitación de fosfato de calcio, que son capaces de suministrar ácidos nucleicos a las células.

En los sistemas de transposones, la unidad transcripcional de un constructo de ácido nucleico, es decir, la región reguladora ligada operablemente a una secuencia de ácido nucleico exógena, se flanquea por una repetición

invertida de un transposon. Varios sistemas de transposones, incluyendo, por ejemplo, Bella Durmiente (ver, U.S. 6,613,752 y U.S. 2005/0003542); Princesa Rana (Miskey y colaboradores, Nucleic Acids Res., 31:6873, 2003); Tol2 (Kawakami, Genome Biology, 8(Suppl.1):S7, 2007); Minos (Pavlopoulos y colaboradores, Genome Biology, 8(Suppl.1):S2, 2007); Hsmar1 (Miskey y colaboradores, Mol Cell Biol., 27:4589, 2007); y Pasaporte se han desarrollado para introducir ácidos nucleicos en las células, incluyendo células de ratón, humano y cerdo. El transposon Bella Durmiente es particularmente útil. Una transposasa se puede suministrar como una proteína, codificada en el mismo constructo de ácido nucleico como el ácido nucleico exógeno, se puede introducir en un constructo de ácido nucleico separado, o se proporciona como un ARNm (por ejemplo, un ARNm transcripto y terminado *in vitro*).

Los ácidos nucleicos se pueden incorporar en vectores. Un vector es un término amplio que incluye cualquier segmento de ADN específico que se diseña para moverse de un portador en un ADN objetivo. Un vector se puede referir como un vector de expresión, o un sistema de vectores, que se un conjunto de componentes necesarios para llevar a cabo la inserción de ADN en un genoma u otra secuencia de ADN objetivo tal como un episoma, plásmido, o aún un segmento de ADN del virus/fago. Los sistemas de vectores tal como vectores virales (por

ejemplo, retrovirus, virus asociado a adeno y virus de fago de integración), y vectores no virales (por ejemplo, transposones) utilizados para el suministro de genes en animales tiene dos componentes básicos: 1) un vector
5 comprendido de ADN (o ARN que se transcribe de manera inversa en un ADNc) y 2) una transposasa, recombinasa, u otro enzima de integrasa que reconoce tanto el vector como una secuencia objetivo de ARN e inserta el vector en la secuencia de ADN objetivo. Los vectores más frecuentes contienen uno o más
10 casetes de expresión que comprenden una o más secuencias de control de expresión, en donde una secuencia de control de expresión es una secuencia de ADN que controla y regula la transcripción y/o traducción de otra secuencia de ADN o ARNm, respectivamente.

15 Muchos tipos diferentes de vectores son conocidos. Por ejemplo, los plásmidos y vectores virales, por ejemplo, vectores retrovirales, son conocidos. Los plásmidos de expresión de mamífero tienen típicamente un origen de replicación, un promotor adecuado y potenciador opcional, y
20 también cualquiera de los sitios de enlace de ribosoma necesarios, un sitio de poliadenilación, sitios donadores y aceptores de empalme, secuencias de terminación transcripcionales, y secuencias no transcriptas de flanqueo 5'. Ejemplos de vectores incluyen: plásmidos (que también

pueden ser un portador de otro tipo de vector), adenovirus, virus asociado a adeno (AAV), lentivirus (por ejemplo, HIV-1 modificado, SIV o FIV), retrovirus (por ejemplo, ASV, ALV o MoMLV), y transposones (por ejemplo, Bella Durmiente, 5 elementos *P*, *Tol-2*, Princesa Rana, piggyBac).

Como se utiliza en la presente, el término ácido nucleico se refiere tanto a ARN como ADN, incluyendo, por ejemplo, ADNc, ADN genómico, ADN sintético (por ejemplo, químicamente sintetizado), así como ácidos nucleicos de 10 origen natural y químicamente modificados, por ejemplo, bases sintéticas o cadenas principales alternativas. Una molécula de ácido nucleico puede ser de doble hebra o de hebra individual (es decir, una hebra individual de sentido o anti-sentido). El término transgénico se utiliza ampliamente en la 15 presente y se refiere a un organismo genéticamente modificado u organismo genéticamente diseñado cuyo material genético se ha alterado utilizando técnicas de modificación genética. Un artiodáctilo inactivado de esta manera es transgénico sin considerar si los genes exógenos o ácidos nucleicos se 20 expresan o no en el animal o su progenie.

Animales genéticamente modificados

Los animales se pueden modificar utilizando TALENs u otras herramientas de modificación genética, incluyendo proteínas de fusión de recombinasa, o varios vectores que son

conocidos. Una modificación genética hecha por esas herramientas puede comprender la alteración de un gen. El término alteración de un gen se refiere a prevenir la formación de un producto génico funcional. Un producto génico es funcional solo si cumple con sus funciones normales (tipo natural). La alteración del gen impide la expresión de un factor funcional codificado por el gen y comprende una inserción, supresión, o sustitución de una o más bases en una secuencia codificada por el gen y/o un promotor y/o un operador que es necesario para la expresión del gen en el animal. El gen alterado se puede alterar por, por ejemplo, al remoción de al menos una porción del gen de un genoma del animal, alteración del gen para prevenir la expresión de un factor funcional codificado por el gen, un ARN de interferencia, o expresión de un factor negativo dominante por un gen exógeno. Los materiales y métodos para modificar genéticamente animales se detallan adicionalmente en U.S. 8,518,701; U.S. 2010/0251395; y U.S. 2012/0222143 que se incorpora en la presente a manera de referencia para todos los propósitos; en caso de conflicto, la presente especificación lo controlará. El término acción trans se refiere a procesos que actúan en un gen objetivo de una molécula diferente (es decir, intermolecular). Un elemento de acción trans es usualmente una secuencia de ADN que contiene

un gen. Este gen codifica para una proteína (o microARN u otra molécula difundible) que se utiliza en la regulación del gen objetivo. El gen de acción trans puede estar en el mismo cromosoma como el gen objetivo, pero la actividad es a través de la proteína intermediaria o ARN que lo codifica. Las modalidades del gen de acción trans son, por ejemplo, genes que codifican endonucleasas objetivo. La inactivación de un gen utilizando un negativo dominante implica en general un elemento de acción trans. El término regulador cis o acción cis significa una acción sin codificar para una proteína o ARN; en el contexto de la inactivación del gen, esto significa en general la inactivación de la porción de codificación de un gen, o un promotor y/u operador que es necesario para la expresión del gen funcional.

15 Varias técnicas conocidas en el campo se pueden utilizar para inactivar los genes para hacer animales inactivados y/o para introducir constructos de ácido nucleico con los animales para producir animales fundadores y para hacer líneas animales, en los cuales la inactivación o el
20 constructo de ácido nucleico se integran en el genoma. Estas técnicas incluyen, sin limitación, microinyección pro-nuclear (U.S. 4,873,191), transferencia de genes mediada por retrovirus en líneas germinales (Van der Putten y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., 82:6148-6152, 1985),

orientación génica en las células madre embriónicas (Thompson y colaboradores, Cell, 56:313-321, 1989), electroporación de embriones (Lo, Mol. Cell. Biol., 3:1803-1814, 1983), transferencia de genes mediados por esperma (Lavitrano y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., 99(22):14230-14235, 2002; Lavitrano y colaboradores, Reprod. Fert. Develop., 18:19-23, 2006), y transformación *in vitro* de células somáticas, tal como células del cúmulo o mamarias, o células madre adultas, fetales o embriónicas, seguido por trasplante nuclear (Wilmut y colaboradores, Nature, 385:810-813, 1997; y Wakayama y colaboradores, Nature, 394:369-374, 1998). La microinyección pronuclear, transferencia de genes mediada por esperma y transferencia nuclear de células somáticas son particularmente técnicas útiles. Un animal que se modifica genómicamente es un animal en donde todas sus células tienen la modificación genética, incluyendo sus células de línea germinal. Cuando se utilizan métodos que producen un animal que es mosaico en su modificación genética, los animales pueden ser endógamos y la progenie que se modifica genómicamente se puede seleccionar. La clonación, por ejemplo, se puede utilizar para ser un animal mosaico si sus células se modifican en el estado de blastocitos, o la modificación genómica puede llevarse a cabo cuando se modifica una célula individual. Los animales que se modifican

que no son sexualmente maduros pueden ser homocigotos o heterocigotos para la modificación, dependiendo del procedimiento específico que se utiliza. Si un gen particular se inactiva por una modificación de inactivación, la homocigocidad sería requerida normalmente. Si un gen particular se inactiva por una interferencia de ARN o estrategia negativa dominante, entonces la heterocigosidad es frecuentemente adecuada.

Típicamente, en la microinyección pronuclear, un constructo de ácido nucleico se introduce en un huevo fertilizado; 1 o 2 huevos fertilizados celulares se utilizan como los pronúcleos que contienen el material genético de la cabeza del espermatozoide y el huevo es visible dentro del citoplasma. Los huevos fertilizados estadificados pronucleares se pueden obtener *in vitro* o *in vivo* (es decir, quirúrgicamente recuperados del oviducto de los animales donadores). Los huevos fertilizados *in vitro* se pueden producir como sigue. Por ejemplo, los ovarios porcinos se pueden recolectar en un matadero, y mantener a 22-28°C durante el transporte. Los ovarios se pueden lavar y aislar para aspiración folicular, y los folículos que varían de 4-8 mm se pueden aspirar en tubos de centrifuga cónicos de 50 mL utilizando agujas de calibre 18 y bajo vacío. El fluido folicular y los ovocitos aspirados se pueden enjuagar a

través de pre-filtros con TL-HEPES comercial (Minitube, Verona, WI). Los ovocitos rodeados por una masa de cúmulo compactas se pueden seleccionar y colocar en un medio de maduración de ovocitos TCM-199 OOCYTE MATURATION MEDIUM (Minitube, Verona, WI) complementado con 0.1 mg/mL de cisteína, 10 ng/mL de factor de crecimiento epidérmico, 10% de fluido folicular de porcino, 50 μ M de 2-mercaptoetanol, 0.5 mg/ml de cAMP, 10 IU/mL de cada uno de la gonadotropina en suero de yegua preñada (PMSG) y gonadotropina coriónica humana (hCG) por aproximadamente 22 horas en aire humidificado a 38.7°C y 5% de CO₂. Subsecuentemente, los ovocitos se pueden mover a un medio de maduración TCM-199 fresco, el cual no contendrá cAMP, PMSG o hCG y se incubará durante 22 horas adicionales. Los ovocitos maduros se pueden raspar de sus células del cúmulo por movimiento vorticial en 0.1% de hialuronidasa durante 1 minuto.

Para el cerdo, los ovocitos maduros se pueden fertilizar en 500 μ l de SISTEMA DE MEDIO Minitube PORCPRO IVF (Minitube, Verona, WI) en cajas de fertilización de 5 pocillos Minitube. En la preparación para la fertilización *in vitro* (IVF), el semen de jabalí recientemente recolectado congelado se puede lavar y volver a suspender en el medio PORCPRO IVF a 4×10^5 espermatozoides. Las concentraciones de espermatozoides se pueden analizar por el análisis de semen asistido por computadora

(SPERMVISION, Minitube, Verona, WI). La inseminación *in vitro* final se puede llevar a cabo en un volumen de 10 μ l en una concentración final de aproximadamente 40 espermias/ovocitos móviles, dependiendo del jabalí. Incubar todos los ovocitos fertilizantes a 38.7°C en una atmósfera de 5.0% de CO₂ durante 6 horas. Seis horas pos-inseminación, los presuntos cigotos se pueden lavar dos veces en NCSU-23 y mover a 0.5 mL del mismo medio. Este sistema puede producir 20-30% de blastocitos rutinariamente a través de la mayoría de jabalíes con una velocidad de inseminación poliespérmica de 10-30%.

Los constructos de ácido nucleico linealizados se pueden inyectar en uno de los pronúcleos. Después los huevos inyectados se pueden transferir a una hembra receptora (por ejemplo, en los oviductos de una hembra receptora) y dejar desarrollar en la hembra receptora para producir los animales transgénicos. En particular, los embriones utilizados *in vitro* se pueden centrifugar a 15,000 X g durante 5 minutos para sedimentar los lípidos que permiten la visualización del pronúcleo. Los embriones se pueden inyectar utilizando un inyector Eppendorf FEMTOJET y se pueden cultivar hasta la formación de blastocitos. Las velocidades de formación de escisión de embriones y blastocitos y la cavidad se pueden registrar.

Los embriones se pueden transferir quirúrgicamente en

los úteros de recipientes asincrónicos. Típicamente, 100-200 (por ejemplo, 150-200) embriones se pueden depositar en la unión de ampulla-isthmus del oviducto utilizando un catéter TOMCAT^{MR} de 13.97 cm (5.5 pulgadas). Después de la cirugía, se
5 puede llevar a cabo examen de ultrasonido en tiempo real del embarazo.

En la transferencia nuclear de células somáticas, una célula de artiodáctilo transgénica (por ejemplo, una célula de cerdo transgénico o célula de bovino) tal como un
10 blastómero embrionario, fibroblasto fetal, fibroblasto de oído adulto, o célula granulosa que incluye un constructo de ácido nucleico descrito en lo anterior, se puede introducir en ovocito enucleado para establecer una célula combinada. Los ovocitos se pueden enuclear por disección de la zona parcial
15 cerca del cuerpo polar y después prensar el citoplasma en el área de disección. Típicamente, una pipeta de inyección con una punta biselada aguda se utiliza para inyectar la célula transgénica en un ovocito enucleado detenido en la meiosis 2. En algunas convenciones, los ovocitos detenidos en la
20 meiosis-2 son huevos terminados. Después de la producción de un embrión de porcino o bovino (por ejemplo, al fusionar y al activar el ovocito), el embrión se transfiere a los oviductos de una hembra recipiente, alrededor de 20 a 24 horas después de la activación. Ver, por ejemplo, Cibelli y colaboradores,

Science, 280:1256-1258, 1998; y U.S. 6,548,741. Para los cerdos, las hembras recipientes se pueden verificar por embarazo aproximadamente 20-21 días después de la transferencia de los embriones.

5 Las técnicas de reproducción estándar se pueden utilizar para crear animales que son homocigotos para el ácido nucleico exógeno de los animales fundadores heterocigotos iniciales. La homocigocidad puede no ser requerida, sin embargo. Los cerdos transgénicos descritos en la presente se
10 pueden reproducir con otros cerdos de interés.

En algunas modalidades, un ácido nucleico de interés y un marcador seleccionable se puede proporcionar en los transposones separados y proporcionar a cualquiera de los embriones o células en una cantidad igual, donde la cantidad
15 de transposones que contienen marcadores seleccionables excede por mucho (exceso de 5-10 veces) el transposon que contiene el ácido nucleico de interés. Las células transgénicas o animales que expresan el ácido nucleico de interés se pueden aislar basados en la presencia y expresión
20 del marcador seleccionable. Debido a que los transposones se integrarán en el genoma en una forma precisa y no ligada (eventos de transposición independientes), el ácido nucleico de interés y el marcador seleccionable no se ligan genéticamente y se pueden separar fácilmente por segregación

genética a través de la reproducción estándar. De esta manera, se pueden producir animales transgénicos que no se restringen a retener marcadores seleccionables en las generaciones subsecuentes, un problema de algo de
5 preocupación desde una perspectiva de seguridad pública.

Una vez que se ha generado el animal transgénico, la expresión de un ácido nucleico exógeno se puede evaluar utilizando técnicas estándares. La clasificación inicial se puede lograr por el análisis de Southern blot para determinar
10 si la integración del constructo se ha llevado a cabo o no. Para una descripción del análisis de Southern, ver las secciones 9.37-9.52 de Sambrook y colaboradores, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, segunda edición, Cold Spring Harbor Press, Plainview; NY., 1989. Las técnicas de reacción
15 en cadena de la polimerasa (PCR) también se pueden utilizar en la clasificación inicial. La PCR se refiere a un procedimiento técnica en la cual los ácidos nucleicos objetivos se amplifican. En general, la información de secuencia de los extremos de la región de interés o más allá
20 se emplea para diseñar cebadores de oligonucleótidos que son idénticos o similares en secuencia a las hebras opuestas de la plantilla que se amplifica. La PCR se puede utilizar para amplificar secuencias específicas de ADN así como ARN incluyendo secuencias de ADN genómico total o ARN celular

total. Los cebadores son típicamente de 14 a 40 nucleótidos en longitud, pero pueden variar de 10 nucleótidos a cientos de nucleótidos de longitud. La PCR se describe en, por ejemplo PCR Primer: A Laboratory Manual, ed. Dieffenbach and Dveksler, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. Los ácidos nucleicos también se pueden amplificar por reacción en cadena de ligasa, amplificación de desplazamiento de hebra, replicación de secuencia auto sostenida, o amplificadas basadas en secuencia de ácido nucleico. Ver, por ejemplo, Lewis, Genetic Engineering News, 12:1, 1992; Guatelli y colaboradores, Proc. Natl. Acad. Sci., 87:1874, 1990; y Weiss, Science, 254:1292-1293, 1991. En la etapa de blastocitos, los embriones se pueden procesar individualmente para análisis por la PCR, hibridación de Southern y PCR splinkerette (ver, por ejemplo, Dupuy y colaboradores, Proc Natl Acad Sci, 99:4495, 2002).

La expresión de una secuencia de ácido nucleico que codifica un polipéptido en los tejidos de cerdos transgénicos se puede evaluar utilizando técnicas que incluyen, por ejemplo, análisis de Northern blot de las muestras de tejido obtenidas del animal, análisis de hibridación *in situ*, análisis de Western, inmunoensayos tal como ensayos inmunoabsorbentes ligados a enzimas, y PCR de transcriptasa inversa (RT-PCR).

ARNs de interferencia

Es conocida una variedad de ARN de interferencia (ARNi). El ARN de doble hebra (ARNds) induce la degradación específica de secuencia de los transcriptos de genes homólogos. El complejo de silenciamiento inducido por ARN (RISC) metaboliza el ARNds a ARNs de interferencia pequeños de 21-23-nucleótidos (ARNssi). El RISC contiene un RNasa de doble hebra (dsRNasa, por ejemplo, Dicer) y ssRNasa (por ejemplo, Argonaut 2 o Ago2). El RISC utiliza la hebra antisentido como una guía para encontrar un objetivo escindible. Tanto ARNssi como microARNs (miARNs) son conocidos. Un método para alterar un gen en un animal genéticamente modificado comprende inducir la interferencia de ARN contra un gen objetivo y/o ácido nucleico tal que la expresión del gen objetivo y/o ácido nucleico se reduce.

Por ejemplo, la secuencia de ácido nucleico exógena puede inducir la interferencia de ARN contra un ácido nucleico que codifica un polipéptido. Por ejemplo, un ARN de interferencia pequeño de doble hebra (ARNsi) o ARN de roquilla pequeño (ARNsh) homólogo a un ADN objetivo se puede utilizar para reducir la expresión de ese ADN. Los constructos para ARNsi se pueden producir como se describe, por ejemplo, en Fire y colaboradores, Nature, 391:806, 1998;

Romano y Masino, Mol. Microbiol., 6:3343, 1992; Cogoni y colaboradores, EMBO J., 15:3153, 1996; Cogoni y Masino, Nature, 399:166, 1999; Misquitta and Paterson Proc. Natl. Acad. Sci., 96:1451, 1999; y Kennerdell y Carthew, Cell, 5 95:1017, 1998. Los constructos para el ARNsh se pueden producir como se describe por McIntyre y Fanning (2006) BMC Biotechnology 6:1. En general, los ARNssh se transcriben como una molécula de ARN de hebra individual que contiene regiones complementarias, que pueden recocerse y formar horquillas 10 cortas.

La probabilidad de encontrar un ARNsi o ARNmi funcional individual, solo dirigido a un gen específico es alta. La capacidad de predicción de una secuencia específica de ARNsi, por ejemplo, es de aproximadamente 50% pero un número de ARN 15 de interferencia se pueden hacer con buena confianza de al menos uno de ellos será efectivo.

Las modalidades incluyen una célula in vitro, una célula in vivo, y un animal genéticamente modificado tal como un animal de ganado que expresa un ARNi dirigido contra un gen, 20 por ejemplo, un gen selectivo para una etapa de desarrollo. La ARNi se puede, por ejemplo, seleccionar del grupo que consiste de ARNsi, ARNsh, ARNds, RISC y ARNmi.

Sistemas inducibles

Un sistema inducible se puede utilizar para controlar la

expresión de un gen. Son conocidos varios sistemas inducibles que permiten el control espacio temporal de la expresión de un gen. Varios han probado que son funcionales in vivo en animales transgénicos. El término sistema inducible incluye
5 promotores adicionales y elementos de expresión génica inducibles.

Un ejemplo de un sistema inducible es el sistema promotor de tetraciclina (tet)-on, que se puede utilizar para regular la transcripción del ácido nucleico. En este sistema,
10 un represor de Tet mutado (TetR) se fusiona al dominio de activación de la proteína transactivadora VP16 del virus de herpes simple para crear un activador transcripcional controlado por tetraciclina (tTA), que se regula por tet o doxiciclina (dox). En ausencia de antibióticos, la
15 transcripción es mínima, mientras que en presencia de tet o dox, se induce la transcripción. Los sistemas inducibles alternativos incluyen los sistemas de ecdisona o rapamicina. La ecdisona es una hormona de muda de insecto cuya producción se controla por un heterómero del receptor de ecdisona del
20 producto del gen *ultraspiracle* (USP). La expresión se induce por el tratamiento con ecdisona o un análogo de ecdisona tal como muristerona A. El agente que se administra al animal para desencadenar el sistema inducible es referido como un agente de inducción.

El sistema inducible por tetraciclina y el sistema de Cre/loxP recombinasa (ya sea constitutivo o inducible) son entre los sistemas inducibles más comúnmente utilizados. El sistema inducible por tetraciclina implica un transactivador controlado por tetraciclina (tTA)/ tTA inverso (rtTA). Un método para usar estos sistemas in vivo implica generar dos líneas de animales genéticamente modificados. Una línea animal expresa el activador (tTA, rtTA, o Cre recombinasa) bajo el control de un promotor seleccionado. Otro conjunto de animales transgénicos expresa el aceptor, en el cual la expresión del gen de interés (o el gen que se modifica) está bajo el control de la secuencia objetivo para los transactivadores tTA/rtTA (o se flanquea por las secuencias loxP). El acoplamiento de las dos cepas de ratones proporciona el control de la expresión génica.

Los sistemas reguladores dependientes de tetraciclina (sistemas tet) dependen de dos componentes, es decir, un desactivador controlado por tetraciclina (tTA o rtTA) y un promotor dependiente de tTA/rtTA que controla la expresión de un ADNc cadena abajo, en una manera dependiente de tetraciclina. En ausencia de tetraciclina o sus derivados (tal como doxiciclina), tTA se enlaza a las secuencias tetO, que permiten la activación transcripcional del promotor dependiente de tTA. Sin embargo, en presencia de doxiciclina,

el tTA no puede interactuar con su objetivo y no se presenta la transcripción. El sistema tet que utiliza tTA es llamado tet-OFF, debido a que la tetraciclina o doxiciclina permite la regulación por decremento transcripcional. La administración de tetraciclina o sus derivados permite el control temporal de la expresión transgénica in vivo. El rtTA es una variante de tTA que no es funcional en la ausencia de doxiciclina pero requiere la presencia del ligando para la transactivación. Este sistema tet por lo tanto es llamado tet-ON. Los sistemas tet se han utilizado in vivo para la expresión inducible de varios transgenes, que codifican, por ejemplo, los genes reporteros, oncogenes, o proteínas implicadas en una cascada de señalización.

El sistema Cre/lox utiliza la Cre recombinasa, que cataliza la recombinación específica de sitio al cruzar entre dos secuencias de reconocimiento Cre distintas, es decir, los sitios loxP. Una secuencia de ADN de introducirá entre las dos secuencias loxP (llamado ADN floxado) se escinde por la recombinación mediada por Cre. El control de la expresión de Cre en un animal transgénico, utilizando ya sea el control espacial (con un promotor específico de tejido o célula) o control temporal (con un sistema inducible), da por resultado el control de la escisión de ADN entre los dos sitios loxP. Una aplicación es para inactivación de genes condicionales

(inactivación condicional). Otro procedimiento es para la sobreexpresión de proteínas, en donde un codón de detención floxado se inserta entre la secuencia promotora y el ADN de interés. Los animales genéticamente modificados no expresan el transgen hasta que el Cre se expresa, conduciendo a la escisión del codón de detención floxado. Este sistema se ha aplicado a la oncogénesis específica de tejido y la expresión del receptor de antígeno controlada en los linfocitos B. La Cre recombinasa inducibles también se han desarrollado. La Cre recombinasa inducible se activa solo por la administración de un ligando exógeno. Las Cre recombinasa inducibles son proteínas de fusión que contienen la Cre recombinasa original y un dominio de enlace a ligando específico. La actividad funcional de la Cre recombinasa es dependiente de un ligando externo que es capaz de enlazarse a este dominio específico en la proteína de fusión.

Las modalidades incluyen una célula in vitro, una célula in vivo, y un animal genéticamente modificado tal como un animal de ganado que comprende un gen bajo el control de un sistema inducible. La modificación genética de un animal puede ser genómica o de mosaico. El sistema inducible se puede, por ejemplo, seleccionar del grupo que consiste de Tet-On, Tet-Off, Cre-lox, y Hif1alpha. Una modalidad es un gen expuesto en la presente.

Negativos Dominantes

Los genes de esta manera se pueden alterar no solo por la remoción o supresión de ARNi sino también por la

5 creación/expresión de una variante negativa dominante de una proteína que tiene efectos inhibidores en la función normal de ese producto génico. La expresión de un gen negativo dominante (DN) puede dar por resultado un fenotipo alterado, ejercido por a) un efecto de titulación, el DN PASSIVELY

10 compete con un producto génico endógeno para ya sea un factor cooperativo o el objetivo normal del gen endógeno sin elaborar la misma actividad, b) un efecto de píldora venenosa (o llave inglesa) en donde el producto génico negativo dominante interfiere ACTIVAMENTE con un proceso requerido

15 para la función génica normal, c) un efecto de retroalimentación, en donde el DN ACTIVAMENTE estimula un regulador negativo de la función génica.

Animales fundadores, líneas de animales, atributos, y reproducción

20 Los animales fundadores (generación F0) se pueden producir por clonación y otros métodos descritos en la presente. Los fundadores pueden ser homocigotos para una modificación genética, como en el caso donde un cigoto o una célula primaria se someten a una modificación homocigota.

Similarmente, los fundadores también se puede hacer que sean heterocigotos. Los fundadores se pueden modificar genómicamente, significa que las células en su genoma tienen que someterse a la modificación. Los fundadores pueden ser
5 mosaicos para una modificación, como puede suceder cuando los vectores se introducen en una pluralidad de células en un embrión, típicamente en una etapa de blastocitos. La progenie de los animales mosaico se puede someter a prueba para identificar la progenie que se modifica genómicamente. Una
10 línea animal se establece cuando un grupo de animales se ha creado que puedan reproducirse sexualmente o por técnicas de reproducción asistida, con progenie heterogénea u homocigota que expresa consistentemente la modificación.

En el ganado, muchos alelos son conocidos por ser
15 ligados a varios atributos tal como atributos de producción, atributos de tipo, atributos de capacidad de trabajo, y otros atributos funcionales. Los artífices están acostumbrados a monitorear y cuantificar estos atributos, por ejemplo, Visscher y colaboradores, *Livestock Production Science*,
20 40:123-137, 1994; U.S. 7,709,206; U.S. 2001/0016315; U.S. 2011/0023140; y U.S. 2005/0153317. Una línea animal puede incluir un atributo elegido de un atributo en el grupo que consiste de un atributo de producción, un atributo de tipo, un atributo de capacidad de trabajo, un atributo de

fertilidad, un atributo de maternidad y un atributo de resistencia a enfermedades. Los atributos adicionales incluyen la expresión de un producto génico recombinante.

Recombinasas

5 Las modalidades de la invención incluyen la administración de un sistema de nucleasa objetivo con una recombinasa (por ejemplo, una proteína RecA, una Rad51) u otra proteína de enlace a ADN asociada con recombinación de ADN. Una recombinasa forma un filamento con un fragmento de ácido
10 nucleico y, en efecto, busca el ADN celular para encontrar una secuencia de ADN sustancialmente homóloga a la secuencia. Por ejemplo una recombinasa se puede recombinar con una secuencia de ácido nucleico que sirve como una plantilla para HDR. La recombinasa después se combina con la plantilla de
15 HDR para formar un filamento y se coloca en la célula. La recombinasa y/o plantilla de HDR que se combina con la recombinasa se puede colocar en la célula o embrión como una proteína, un ARNm, o con un vector que codifica la recombinasa. La descripción de U.S. 2011/0059160 (Solicitud
20 de Patente de E.U.A. No. 12/869,232) se incorpora en la presente a manera de referencia por este medio para todos los propósitos; en caso de conflicto, la especificación lo controlará. El término recombinasa se refiere a una enzima de recombinación genética que cataliza enzimáticamente, en una

célula, la unión de piezas relativamente cortas de ADN entre dos hebras de ADN relativamente más largas. La recombinasa se incluyen Cre recombinasa, Hin recombinasa, RecA, RAD51, Cre, y FLP. La Cre recombinasa es una topoisomerasa Tipo I del bacteriófago P1 que cataliza la recombinación específica de sitio del ADN entre los sitios loxP. La Hin recombinasa es una proteína de 21kD compuesta de 198 aminoácidos que se encuentra en la bacteria *Salmonella*. Hin pertenece a la familia de la serina recombinasa de las ADN invertasas en las cuales se sitúa la serina del sitio activo para iniciar la escisión de ADN y recombinación. El RAD51 es un gen humano. La proteína codificada por este gen es un miembro de la familia de proteínas RAD51 que ayuda en la reparación de los rompimientos de hebra doble del ADN. Los miembros de la familia RAD51 son homólogos al RecA bacteriano y Rad51 de levadura. La Cre recombinasa es una enzima que se utiliza en experimentos para suprimir las secuencias específicas que son flanqueadas por los sitios loxP. FLP se refiere a la enzima de recombinación Flippasa (FLP o Flp) derivada del plásmido 2 μ de la levadura del panadero *Saccharomyces cerevisiae*.

En este punto, "RecA" o "proteína RecA" se refiere a una familia de proteínas de recombinación tipo RecA que tienen esencialmente todo o la mayoría de las mismas funciones, particularmente: (i) la capacidad de colocar los

oligonucleótidos o polinucleótidos apropiadamente en sus objetivos homólogos para la extensión subsecuente por las ADN polimerasas; (ii) la capacidad de preparar topológicamente el ácido nucleico dúplex para la síntesis de ADN; y (iii) la capacidad de complejos de RecA/oligonucleótido o RecA/polinucleótido de encontrar eficientemente y enlazarse a las secuencias complementarias. La proteína RecA mejor caracterizada es de *E. coli*; además de la forma alélica original de la proteína se han identificados un número de proteínas tipo RecA mutantes, por ejemplo, RecA803. Además, muchos organismos tienen proteínas de transferencia de hebra tipo RecA incluyendo, por ejemplo, levadura, *Drosophila*, mamíferos incluyendo humanos, y plantas. Estas proteínas incluyen, por ejemplo, Rec1, Rec2, Rad51, Rad51B, Rad51C, Rad51D, Rad51E, XRCC2 y DMC1. Una modalidad de la proteína recombinante es la proteína RecA de *E. coli*. Alternativamente, la proteína RecA puede ser la proteína RecA-803 mutante de *E. coli*, una proteína RecA de otra fuente bacteriana o una proteína de recombinación homóloga de otro organismo.

Composiciones y Kits

La presente invención también proporciona composiciones y kits que contienen, por ejemplo, moléculas de ácido nucleico que codifican endonucleasas específicas de sitio, CRISPR,

Cas9, ZNFs, TALENs, fusiones RecA-gal4, polipéptidos de las mismas, composiciones que contienen estas moléculas de ácido nucleico o polipéptidos, o línea de células modificadas. También se puede proporcionar una HDR que sea efectiva para
5 introgresión de un alelo indicado. Estos artículos se pueden utilizar, por ejemplo, como herramientas de búsqueda, o terapéuticamente.

El fenotipo para SLICK fue claramente un atributo cualitativo que muestra herencia monogénica. La cruce del
10 ganado para tomar ventaja del fenotipo SLICK también mostró que al atributo dominante, mostrando expresión en los animales heterocigotos. Varios grupos han tratado recientemente de aislar el gen y Littlejohn y colaboradores (*Nat Commun* **5**: 5861 (2014) identificaron una supresión base
15 individual en el exón 10 (exones contados del exón 2 que dan por resultado el 9° exón que es llamado exón 10) en el ganado senepol dando por resultado un cambio de marco, introduciendo un codón de detención prematuro que da por resultado un péptido de 461AA debido a una pérdida de 120 aa terminal del
20 péptido WT. Ver, FIGURA 1.

El gen para el receptor de prolactina se encuentra en el cromosoma 20 del ganado (*Bos Taurus*) y tiene nueve exones y codifica para una proteína de 581 aminoácidos en longitud. Cada monómero tiene un dominio extracelular, dominio

transmembrana y un dominio intracelular y dimeriza como se muestra en la FIGURA 1 para formar un receptor funcional. Existen varias isoformas de PRLR incluyendo una que no tiene un dominio intracelular. La forma corta de 294AA no se
5 expresa en los animales bovinos y puede ser específica de tejido siempre que se exprese con la forma larga de la proteína.

Otras razas de ganado también expresan los fenotipos SLICK y los investigadores han aislado recientemente dos de
10 otras isoformas del gen PRLR que dan por resultados péptidos PRLR truncados. SLICK2 (como se inventó en la presente) se expresa por el ganado Carora/Limonero y es una mutación base individual que da por resultado un codón de detención prematuro que da por resultado un péptido de 496AA. El SLICK3
15 se expresa por el ganado Limonero y es una mutación base individual que da por resultado una proteína truncada en 464AA. Ver, FIGURA 1 y FIGURA 2A que muestra la secuencia de nucleótidos de PRLR ARNm como es identificado por el Número de Acceso de GenBank NM_001039726. Se muestra en el residuo
20 940 la estrella del exón 10 mientras que el sitio de codificación para la tirosina 433 se codifica para los residuos "tac" en 1381 a 1383. La mutación que conduce a SLICK1 es una supresión de "c" en 1466; SLICK3 es "c" en 1478 y la mutación que da origen a SLICK2 es una mutación del "c"

en 1573. Los aminoácidos y su posición en el péptido se ilustran en la FIGURA 2B.

La PRLR se somete a la fosforilación de tirosina después de la estimulación por PRL en la cual JAK2 fosforila múltiples sitios de tirosina en el bucle citoplásmico de PRLR y STAT5a y STAT5b asociado al bucle. La STAT5 subsecuentemente fosforilado con tirosina se disocia del bucle y forma un dímero activo y se traslada al núcleo que regula las funciones génicas asociadas con PRL. De esta manera, los residuos de tirosina se cree que son sumamente funcionales para la señalización de PRLR. Por lo tanto, sin que se mantenga por cualquier teoría específica, los presentes inventores hicieron la hipótesis de que, debido a la posibilidad de la tirosina, debido a que la tirosina Y261 están presentes sin considerar el fenotipo de pelaje y debido a que el SLICK es evidente al menos por el truncamiento de PRLR después de AA 461 que el truncamiento de PRLR hasta la tirosina precedente Y433 dará por resultado un fenotipo SLICK.

Como se describe en la presente se proporcionan animales de ganado, en una modalidad artiodáctilos y ganado especialmente, que expresan el fenotipo slick que se modifica genéticamente para expresar un gen PRLR que tiene un rompimiento en la síntesis del péptido PRLR debido a una

mutación que codifica un inserto, supresión, codón de detención prematuro u otra modificación que da por resultado un péptido PRLR que carece de hasta 148 aminoácidos terminales. En varias modalidades ejemplares, la modificación del gen PRLR se logra por introgresión no meiótica del gen PRLR utilizando los constructos de nucleasas efectoras tipo activadores de Transcripción derechas e izquierdas (TALENs) y las plantillas de reparación dirigida por homología apropiadas (HDR) para introducir las mutaciones que dan por resultado un rompimiento en la síntesis de proteínas en el PRLR en algún punto en el péptido después de que el residuo de tirosina en la posición 433 como es identificado en la secuencia de péptidos que tiene el Número de Acceso de GenBank AAA51417. En algunas modalidades el rompimiento en la síntesis de proteínas es antes del residuo de tirosina en 512 del péptido. El uso de introducción no meiótica es conocido en la técnica y se describe en longitud en las Solicitudes de Patente Publicadas de E.U.A. 2012/0222143; 2013/0117870 y 2015/0067898 incorporadas en la presente a manera de referencia por este medio en su totalidad para todos los propósitos.

Varias modalidades ejemplares de los dispositivos y compuestos se describen en general en lo anterior y los métodos de acuerdo con esta invención, se entenderá más

fácilmente por referencia a los siguientes ejemplos, que se proporcionan a manera de ilustración y no se proponen para ser limitantes de la invención de ninguna forma.

Ejemplo 1

5 Diseño y producción de TALEN

Diseño y producción de TALEN. Secuencias de ADN objetivo TALEN candidatas y secuencias RVD se identificaron utilizando la herramienta en línea "TAL Effector Nucleotide Targeter" (tale-nt.cac.cornell.edu/about). Los plásmidos para la transfección de TALEN ADN o la transcripción de TALEN ARNm in vitro después se construyeron al seguir el protocolo Golden Gate Assembly utilizando pC-GoldyTALEN (Addgene ID 38143) y RCIscripT-GoldyTALEN (Addgene ID 38143) como vectores de destilación final (2). Los vectores pC-GoldyTALEN finales se prepararon al utilizar el Kit PureLink^{MR} HiPure Plasmid Midiprep (Life Technologies) y se secuenciaron antes del uso. Los vectores RCIscripT ensamblados preparados utilizando el Equipo QIAprep Spin Miniprep (Qiagen) se linealizaron por SacI que se utiliza como plantillas para la transcripción de TALEN ARNm in vitro utilizando el Equipo mMESSAGE mMACHINE^{MR} T3 (Ambion) como se indica previamente. El ARNm modificado se sintetizó de los vectores RCIscripT-GoldyTALEN como se describe previamente sustituyendo un coctel de ribonucleótidos que consiste de análogo de terminación de 3'-

0-Me-m⁷G(5')ppp(5')G ARN (New England Biolabs), trifosfato de pseudouridina de trifosfato de 5-metilcitidina (TriLink Biotechnologies, San Diego, CA) y trifosfato de adenosina y trifosfato de guanosina. Las concentraciones de reacción de nucleótidos final son 6 mM para el análogo determinación, 1.5 mM para el trifosfato de guanosina, y 7.5 mM para los otros nucleótidos. El ARNm resultante fue ADNse tratado antes de la purificación utilizando el Equipo MEGAclean Reaction Cleanup (Applied Biosciences). La Tabla I proporciona una lista de secuencias RVD utilizadas.

15

20

TABLA I: Secuencias objetivo TALEN y CRISPR/Cas9.

Par Talen	Brazo Izquierdo de secuencia Talen RVD	Secuencia objetivo de ADN (hebra de sentido)
btSLICK1 9.1 Seq ID 1/2	NN NN HD HD NN NN HD NI HD HD NI HD NI NN HD HD NG NI NI NI NN HD NI NG NN NG NG NN NN NG HD NG NN NG	GGCCGGCACCACAGCCACTTCGCTGGACCAAAACAGACCAACATGCTTTA Seq ID 29
btSLICK1 9.2 Seq ID 3/4	NN HD NG NG NG NI NI NI NI NN HD HD NG HD NI NI NN HD HD NG NG NG HD HD NG NG HD HD HD NG NN HD HD NI	GCTTTAAAAGCCTCAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGC Seq ID 30
btSLICK1 9.3 Seq ID 5/6	NN NN HD HD NN NN HD NI HD HD NI HD NI NN HD HD NI HD NG NG NI NI NI NN HD NI NG NN NG NG NN NN NG HD NG NN	GGCCGGCACCACAGCCACTTCGCTGGACCAAAACAGACCAACATGCTTTAA Seq ID 31
btSLICK1 9.4 Seq ID 7/8	NN HD NG NG NG NI NI NI NI NN HD HD NG HD NI NI NI NI NN NN NG NG NN HD HD NG NG NG HD HD NG NG HD HD HD NG	GCTTTAAAAGCCTCAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGCAACC Seq ID 32
btSLICK1 9.5 Seq ID 9/10	NN HD NG NG NG NI NI NI NI NN HD HD NG HD NI NI NI NI NG NN NN NG NG NN HD HD NG NG NG HD HD NG NG HD HD HD	GCTTTAAAAGCCTCAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGCAACCA Seq ID 33
btSLICK1 9.6 Seq ID 11/12	NN NN HD HD NN NN HD NI HD HD NI HD NI NN HD HD NI NI NI NI NN HD NI NG NN NG NG NN NN NG HD NG NN NG NG	GGCCGGCACCACAGCCACTTCGCTGGACCAAAACAGACCAACATGCTTT Seq ID 34
btSLICK1 9.7 Seq ID 13/14	HD NI NN NI HD HD NI NI HD NI NG NN HD NG NG NG NI NI HD HD NI NG NG NN NI NI NI HD NG NN NN HD NI NN	CAGACCAACATGCTTTAAAAGCCTCAAAAACCATTGAAACTGGCAG Seq ID 35
btSLICK2 9.8 Seq ID 15/16	NN NG NN NN HD HD NI HD NN NI HD HD HD HD NI NI NN HD HD NI NI NN NN NN NG NG NG NI NN HD NI NN NI NN	GTGGCCACGACCCCAAGACAAAACCCCTTGATCTCTGCTAAACCCTTGG Seq ID 36
btSLICK2 9.9 Seq ID 17/18	HD NI NN NI NI NN NN HD NG NN HD NI NN NG NG HD HD HD NN NG NN NN HD HD NI HD NI HD HD NN NG NN NG	CAGAAGGCTGCAGTTCCAAGCCTGACCAAGACACGGTGTGGCCACG Seq ID 37
btSLICK2 9.10 Seq ID 19/20	NN NN HD HD NI HD NN NI HD HD HD HD NI NI NN NI HD NI NI NG NG HD HD NI NI NN NN NN NG NG NG NI NN HD NI	GGCCACGACCCCAAGACAAAACCCCTTGATCTCTGCTAAACCCTTGAAT Seq ID 38

5

btSLICK3 9.11 Seq ID 21/22	HD NI NI NI NI NI HD HD NI NG NG NN NI NI NI HD NG NN NI HD NG HD HD HD NG HD NG NN HD NG NG NN NN	CAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGCAACCAAGCAGAGGGAGTC Seq ID 39
btSLICK3 9.12 Seq ID 23/24	NG HD NN HD NG NN NN NI HD HD NI NI NI HD NI NN HD NI NI NG NN NN NG NG NG NG NG NN NI NN NN HD NG NG	TCGCTGGACCAACAGACCAACATGCTTTAAAGCCTCAAAAACCATTG Seq ID 40
btSLICK3 9.13 Seq ID 25/26	NI NI NI NI NN HD HD NG HD NI NI NI NI NI HD HD NI NG HD NG NN HD NG NG NN NN NG NG NN HD HD NG NG NG HD HD	AAAAGCCTCAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGCAACCAAGCAG Seq ID 41
btSLICK3 9.14 Seq ID 27/28	HD NI NI NI NI NI HD HD NI NG NG NN NI NI NI HD NG NN NN NI HD NG HD HD HD NG HD NG NN HD NG NG NN NN NG NG	CAAAAACCATTGAAACTGGCAGGGAAGGAAAGGCAACCAAGCAGAGGGAGTC Seq ID 42
btSLICK1 18.1 sgRNA		GAGGCTTTTAAAGCATGT (hebra inversa) Seq ID 43

Nota: Las secuencias RVD para los monómeros TALEN izquierda y derecha se muestran en la parte superior y fondo respectivamente orientados de la N a C terminal. El texto en negritas indica los sitios de enlace a TALEN.

Plantillas de oligonucleótidos

Todas las plantillas de oligonucleótidos se sintetizaron por tecnologías de ADN integrado, síntesis de 100 nmol purificadas por desalación estándar, y se volvieron a suspender a 400 μ M en TE. Ver, la Tabla II para la lista de plantillas oligo.

10

15

TABLA II: Plantillas de introgresión			
Par TALEN	Diseño ssODN	Secuencia	ID # de la Secuencia
btSLICK1 9.1	SLICK1_Xb al	ggccctgggcatggccggcaccacagccacttcttagaccaaacagaccaacatg[De lC]ttttaaagcctcaaaaaccattgaaactggcagg	Seq ID 44
btSLICK1 9.1	SLICK1_na tive	Ggccctgggcatggccggcaccacagccacttcgtggaccaaacagaccaacatgctt ttaaagcctcaaaaaccattgaaactggcagg	Seq ID 45
btSLICK2 9.8	SLICK2_Xb al	agcctgaccaagacacggtgtggccaTgacccaagactcttagacccttgatctctgcta aaccttggaatacgtggagatccacaagg	Seq ID 46
btSLICK2 9.8	SLICK2_na tive	Agcctgaccaagacacggtgtggccacgacccaagacaaaaccccttgatctctgct aaaccttggaatacgtggagatccacaagg	Seq ID 47
btSLICK3 9.12	SLICK3_Ns il	GcaccacagccacttcgctggaccaaacagaccaacatgcattaaaagcctAaaaaac cattgaaactggcaggaaggaaaggcaacca	Seq ID 48
btSLICK3 9.12	SLICK3_na tive	Gcaccacagccacttcgctggaccaaacagaccaacatgctttaaagcctcaaaaacc attgaaactggcaggaaggaaaggcaacca	Seq ID 49

20

El texto en mayúsculas representa SNPs propuestas; el texto en negritas indica cambios de nucleótidos para generar los sitios de restricción para la clasificación RFLP, el texto subrayado doble indica los sitios TALEN; los sitios de restricción novedosos están subrayados. [DelC] indica la supresión del nucleótido de citosina en esta posición. La anotación nativa indica la plantilla que solo se introducirá

en SLICK1, o la mutación 2 o 3 sin cambios base adicionales.

Ejemplo 2

Cultivo y transfección del tejido

Se mantuvieron fibroblastos de bovino a 37 o 30°C (como se indica) a 5% de CO₂ en DMEM complementado con 10% de suero bovino fetal, 100 I.U./ml de penicilina y estreptomicina, y L-Glutamina 2mM. Para la transfección, todos los TALENs, CRISPR/Cas9 y plantillas de HDR se suministraron a través de transfección utilizando el sistema de Transfección Neón (Life Technologies) a menos que se establezca de otra manera. Brevemente, los fibroblastos de bovino de pasaje bajo que alcanzan 100% de confluencia se dividieron 1:2 y se recolectaron al siguiente día en una confluencia de 70-80%. Cada transfección estuvo comprendida de 500,000-600,000 células resuspendidas en solución amortiguadora "R" mezclada con ARNm y oligos y se electroporaron utilizando las puntas de 100ul por los siguientes parámetros: Voltaje a la Entrada; 1800V; Anchura de Pulso; 20ms; y Número de Pulso; 1. Típicamente, 0.1-5 de TALEN ARNm y 2-5 µM de oligos específicos para la mutación SLICK deseadas se incluyeron en cada transfección junto con los oligos que ingresan al sitio de restricción requerido para el análisis RFLP. Después de la transfección, las células se dividieron 60:40 en dos pocillos preparados de una caja de 6 pocillos para el cultivo de tres

días en ya sea 30 o 37°C respectivamente. Después de los tres días, las poblaciones de células se expandieron y a 37°C hasta al menos 10 días para evaluar la estabilidad de las ediciones. La Tabla III proporciona un resumen de las células positivamente transformadas de cada grupo de tratamiento.

Clonación por dilución

Tres días pos-transfección, 50 a 250 células se sembraron en cajas de 10 cm y se cultivaron hasta que las colonias individuales alcanzaron 5mm en diámetro. En este punto, 6 ml de TrypLE (Life Technologies) 1:5 (vol/vol) diluidas en PBS se agregaron y las colonias se aspiraron, se transfirieron en pocillos de un pocillo de caja de 24 pocillos y se cultivaron bajo las mismas condiciones. Las colonias que alcanzan confluencias se recolectaron y se dividieron para crioconservación y genotipificación.

Tabla III

Nombre del Talen	% de Células
btPRLR 9.1 (SLICK1)	20.9
btPRLR 9.2 (SLICK1)	0
btPRLR 9.3 (SLICK1)	0
btPRLR 9.4 (SLICK1)	0
btPRLR 9.5 (SLICK1)	13.9
btPRLR 9.6 (SLICK1)	0
btPRLR 9.7 (SLICK1)	0

btPRLR 18.1 gRNA (SLICK1)	0
btPRLR 9.8 (SLICK2)	10.1
btPRLR 9.9 (SLICK2)	0
btPRLR 9.10 (SLICK2)	0
btPRLR 9.11 (SLICK3)	0
btPRLR 9.12 (SLICK3)	15.9
btPRLR 9.13 (SLICK3)	6.8
btPRLR 9.14 (SLICK3)	0

Ejemplo 3

Detección de la mutación surveyor y análisis rflp

Preparación de la muestra: Poblaciones de células transfectadas en el día 3 y 10 se recolectaron de un pocillo de una caja de 6 pocillos y 10-30% se volvieron a suspender en 50 µl de solución amortiguadora de lisis compatible 1X PCR: Tris-Cl 10 mM, pH 8.0, EDTA 2 mM, 0.45% de Tritón X-100(vol/vol), 0.45% de Tween-20(vol/vol) recientemente complementado con 200 µg/ml de Proteinasa K. Los lisados se procesaron en un ciclador térmico utilizando el siguiente programa: 55°C durante 60 minutos, 95°C durante 15 minutos. Las muestras de colonias de la clonación por dilución se trataron como en lo anterior utilizando 20-30 µl de solución amortiguadora de lisis.

La PCR que flanquea los sitios propuestos se condujo utilizando Platinum Taq ADN polimerasa HiFi (Life

Technologies) con 1 µl de lisado celular de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Los cebadores para cada sitios se listan en la Tabla IV. La frecuencia de mutaciones en una población se analizó con el Kit de Detección de Mutación Surveyor (Transgenomic) de acuerdo con las recomendaciones del fabricante utilizando 10 µl del producto de PCR como se describe en lo anterior. El análisis de RFLP se llevó a cabo en 10 µl de la reacción de PCR anterior utilizando la enzima de restricción indicada. Las reacciones Surveyor y RFLP se resolvieron en geles de poliacrilamida TBE al 10% y se visualizaron por tinción de bromuro de etidio. Las mediciones de densitometría de las bandas se llevaron a cabo utilizando ImageJ; y la velocidad de mutación de las reacciones Surveyor se calcularon como se describe en Guschin y colaboradores 2010(4). El porcentaje de HDR se calculó a través de la división de la suma de intensidad de los fragmentos RFLP por la suma de intensidad de los fragmentos de banda + RFLP precursores. Para el análisis de la incorporación del sitio de restricción, los productos de PCR pequeños que abarcan el sitio objetivo se resolvieron en geles de poliacrilamida al 10% y los alelos editados versus tipo natural se podrían distinguir por tamaño y se cuantificaron. El análisis RFLP de las colonias se trató similarmente excepto que los productos de PCR se amplificaron

por 1X MyTaq Red Mix (Bioline) y se resolvieron en geles de agarosa al 2.5%. La FIGURA 4 ilustra, en la parte superior, la estrategia para la introducción de TALENs de la mutación SLICK1 e introducción del sitio de restricción XbaI único; la

5 porción de fondos son los geles que muestran el análisis de RFLP de las células transfectadas SLICK1. La FIGURA 5, parte superior, estrategia de introgresión para introducir la mutación SLICK2 en las células de bovino e introducción del sitio XbaI único, fondo, gel de agarosa de la mezcla de

10 colonias que muestra la presencia del sitio de restricción XbaI. La FIGURA 6 es un gel de agarosa que muestra el análisis RFLP de clones individuales de los transformantes SLICK2. La FIGURA 7, parte superior muestra la estrategia de introgresión para introducir la mutación SLICK3 en las

15 células de bovino. El gel izquierdo es una mezcla de colonias de tratamiento 9.11, 9.12, 9.13 y 9.14 (izquierda a derecha), la confirmación del gel derecha de la introgresión que muestra la actividad de endonucleasa por la actividad de NsiI. La FIGURA 8 es un gel de agarosa que muestra los

20 resultados del análisis RFLP de los clones individuales. La secuencia de los TALENs RVDs se proporciona en el estado de secuencia que acompaña en esta descripción.

Para los propósitos de introgresión del fenotipo SLICK en la genética de Red Angus, 8 líneas de fibroblastos adultas

se derivaron del plasma germinal hembra elite (TABLA V). Utilizando los métodos de la introgresión SLICK1, (btPRLR9.1 + ssODN, SEQ ID 44 o 45) se co-transfectaron en las células que se analizaron para NHEJ y HDR en el día 3 de la producción de colonia precedente (TABLA V). El proceso había comenzado para 4 de las 8 líneas y continuó a terminación antes de la clonación de las células modificadas para producir los animales Red Angus con el fenotipo SLICK.

<u>Tabla IV: Pares de cebadores para análisis RFLP de introgresión</u>		
Sitio	Cebador Delantero 5' a 3'	Cebador Inverso 5' a 3'
SLICK1	ACCTTACATGTCTCCAGGCC Seq ID 50	GGGACACCTTTGAGTACTCCT Seq ID 51
SLICK2	ACCTTACATGTCTCCAGGCC Seq ID 52	GGGACACCTTTGAGTACTCCT Seq ID 53
SLICK3	ACCTTACATGTCTCCAGGCC Seq ID 54	GGGACACCTTTGAGTACTCCT Seq ID 55

Tabla V: Introgresión de SLICK1 en el Plasma Germinal Red Angus elite

ID de la línea	RFLP del Día 3	Célula del Día 3	RFLP de colonia
0545-X723	4.62%	7.62%	9/300 hets
D607	8.70%	20.70%	22/400 hets
C61	no determinado	no determinado	Pendiente
C107	no determinado	no determinado	Pendiente
C122	Pendiente	Pendiente	Pendiente
C312	Pendiente	Pendiente	Pendiente
C97	Pendiente	Pendiente	Pendiente
B427	Pendiente	Pendiente	Pendiente

Ejemplo 4**Producción de clones animales que expresan las mutaciones slick**

En la confirmación de las mutaciones SLICK estables descritas en lo anterior en un genoma de bovino, la transferencia nuclear de células somáticas, se utiliza para producir un animal clonado que expresa la mutación. Brevemente, una célula de bovino transgénica (u otro artiodáctilo si se desea) tal como un blastómero embrionario, fibroblasto fetal, fibroblasto adulto, o célula granulosa que incluye una mutación de ácido nucleico descrito en lo anterior, se introduce en un ovocito enucleado para establecer una célula combinada. Los ovocitos se pueden nuclear por disección por zona parcial cerca del cuerpo polar y después se prensan del citoplasma en el área de disección. Típicamente, una pipeta de inyección con una punta biselada agua se utiliza para inyectar la célula transgénica en un ovocito enucleado detenido en la meiosis 2. En algunas convenciones, los ovocitos detenidos en la meiosis-2 son llamados "huevos". Después de producir un embrión de bovino (u otro artiodáctilo) (por ejemplo, al fusionar y al activar el ovocito), el embrión se transfiere a los oviductos de una hembra recipiente, aproximadamente 20 a 24 horas después de la activación o hasta 8 días después de la activación en el

ganado. Ver, por ejemplo, Cibelli y colaboradores, Science, 280:1256-1258, 1990 y U.S. 6,548,741. Las hembras recipientes se pueden verificar para embarazo comenzando en los 17 días después de la transferencia de los embriones.

5 **Ejemplo 5**

Ganado de producción que expresa mutaciones slick mediante microinyección de embriones

Las mutaciones SLICK se han modificado en los embriones de bovino directamente, específicamente para los sitios SLICK2 y
10 SLICK3 (Tabla VI). Brevemente, cigotos de bovino madurados in vitro, fertilizados in vitro se inyectaron con una combinación de TALENs y plantilla de reparación 14-24 horas pos-fertilización. La inyección fue directamente en el citoplasma del cigoto; Las concentraciones de TALEN ARNm y
15 ssODN (plantilla HDR) se listan en la Tabla VI. La velocidad de formación de blastocitos (7 días pos-fertilización) no difirió significativamente entre los cigotos inyectados con solución amortiguadora e inyectados con TALENs. Cada condición fue exitosa en producir embriones con mutaciones
20 INDEL mediadas por NHEJ, y se observó el HDR preciso en 5-19% de embriones. La velocidad de mutación total fue más alta en los embriones inyectados con SLICK2 (>50% de NHEJ+HDR), sin embargo, la frecuencia de la introgresión precisa por HDR fue más alta para SLICK3. Considerando las altas velocidades de

mutación y el desarrollo de embriones no afectado, la transferencia de embriones producidos como en represas sustitutas, como en el Ejemplo 4, es probable que produzcan ganado con el fenotipo SLICK en alta eficiencia.

5 **Tabla VI: Mutaciones SLICK2 y SLICK3 en cigotos de bovino microinyectados.**

	No inyectado	Inyectado con solución amortiguadora	Inyectado con TALENs		
	Tasa de blastocitos (%)	Tasa de blastocitos (%)	Tasa de blastocitos (%)	NHEJ (%)	HDR (%)
10 mutación SLICK3					
ARNm <i>btPRLR9.12</i> 25 ng/μl <i>ssODN (Seq ID 48)</i> 100 ng/μl	31.3	33.3	26.2	12.5	5
ARNm <i>btPRLR9.12</i> 40 ng/μl <i>ssODN (Seq ID 48)</i> 100 ng/μl	37.8	27.1	22.1	7.31	19.51
15 mutación SLICK2					
ARNm <i>btPRLR9.8</i> 40 ng/μl <i>ssODN (Seq ID 46)</i> 100 ng/μl	33.1	17.2	24.9	42.1	10.5

Ejemplo 6

20 **Identificación de marcadores de haplotipo que confirman la introgresión de fenotipo de slick**

El sitio "SLICK" se ha mapeado al cromosoma 20 del genoma de ganado y la mutación causante que subyace al fenotipo para la termo-tolerancia reside dentro del *receptor de prolactina* (PRLR). El gen tiene nueve exones que codifican para un

polipéptido de 581 aminoácidos. La investigación previa en el ganado Senepol ha mostrado que el fenotipo resulta de una supresión base individual en el exón 10 (no existe el exón 1, los exones reconocidos son 2-10) que introduce un codón de
 5 detención prematuro (p.Leu462) y pérdida de los 120 aminoácidos terminales del receptor. Este genotipo es referido en la presente como SLICK1. El ganado Senepol es extremadamente tolerante al calor y se ha cruzado con muchas otras razas de ganado que proporcionan el beneficio de
 10 tolerancia al calor.

La Tabla VII, siguiente proporciona el análisis marcador de SNPs alrededor del sitio SLICK. Como se muestra, los marcadores 1-5 están cadena arriba del sitio SLICK en el cromosoma 20 y los marcadores 6-10 están cadena abajo del
 15 sitio SLICK. La fila etiquetada "alelo SNP" es el sitio en el cromosoma donde los marcadores (SNP) se encuentran naturalmente en el ganado Senepol. La fila etiquetada "Otro Alelo" es el residuo de nucleótidos de frecuencia de alelo menor más alta entre el ganado con pelo y no encontrado en el
 20 haplotipo ligado o que contiene SLICK. El MAF es la frecuencia de cada SNP comparado con el WT dentro de un conjunto experimental de DNAs genotipificado. La última columna muestra que la probabilidad de tener el alelo SNP en los 10 marcadores de flanco que no tenga la mutación slick

es de aproximadamente 8×10^{-5} . Sin embargo, cabe destacar que el muestreo de los animales para este estudio fue sumamente sesgado hacia las muestras de ADN del ganado derivadas de animales influenciadas por una base genética Criollo, las fuentes nativas de las mutaciones SLICK. Por lo tanto, la frecuencia de cada uno de los marcadores es mucho más prevalente que podría estar en una distribución global/aleatoria de estos marcadores. La pluralidad de que un animal no Senepol mostrará la supresión en Chr20-39136558 sin tener ninguno de los marcadores ligados sería 8×10^{-5} y este valor se desvirtúa por ser más probable debido al muestreo de una población Criollo sumamente influenciada. Como se indica en la Tabla VII, la longitud total de la región de validación es 296,033 pb, de 39,047,501 a 39,343,534.

Tabla VII:

Marcador en Serie	1	2	3	4	5	Slick
SNP	Chr20-39047501	Chr20-39067164	Chr20-39107872	Chr20-39118063	Chr20-39126055	Chr20-39136558
MAF	0.425	0.419	0.424	0.422	0.322	
Alelo SNP	G	A	C	G	G	DEL(Slick)
Otro Alelo	T	G	T	A	T	C

Tabla VII: Continuación

Slick	6	7	8	9	10	total=10
Chr20-39136558	Chr20-39179498	Chr20-39179527	Chr20-39235859	Chr20-39343400	Chr20-39343534	Sonda por probabilidad
	0.397	0.412	0.276	0.423	0.423	8.28733E-05
DEL(Slick)	T	G	G	T	T	Haplotipo

						SLICK
C	C	C	A	C	C	

MAF frecuencia de alelo menor; SNP=polimorfismo de nucleótido individual y se indica por la posición coordinada del SNP en el ensamble Chr 20 de la versión UMD 3.1 del genoma de bovino. La fila designada al alelo SNP se refiere al alelo SNP representado en el Haplotipo SLICK para la variante derivada del ganado Carribbean criollo (es decir la mutación causante SLICK encontrada en el ganado Senepol). Otro alelo representa el SNP alternativo en esta posición como es detectado por el equipo de marcador. Todo los SNP listados en esta tabla son bi-alélicos. La probabilidad de tener el alelo SNP en los 10 marcadores de flaqueo no tener la mutación SLICK es de aproximadamente 8×10^{-5} .

La Tabla VIII identifica los haplotipos mayores identificados por los marcadores de la Tabla VII.

Tabla VIII

SNP/Marcador	Haplotipo ¹	Conteo de Haplotipos
SLICK	GACGG-(Del)-TGTT	0.541 (n=915)
WT	TGTAT-C-CCACC	0.213 (n=360)
8	TGTAT-C-CCGCC	0.089 (n=151)
5	TGTAG-C-CCACC	0.029 (n=49)
5/8	TGTAG-C-CCGCC	0.027 (n=46)
5/6/7	TGTAG-C-TGACC	0.018 (n=30)
8/9/10	TGTAT-C-CCGTT	0.018 (n=22)
	Otros Haplotipos (<0.01)	0.070 (n=119)

Se identificaron siete haplotipos principales en la región de validación SLICK. Como se muestra en la Tabla 2,

los primeros dos haplotipos son SLICK y el WT.

De esta manera, una vez que se identifican los marcadores confiables, sigue la capacidad para identificar adicionalmente la fuente de una secuencia objetivo (SLICK como en la Tabla VII). En el caso de SLICK, no ha sido identificado ninguno de los haplotipos que tienen la supresión de la base de citosina que tampoco comparten todos los alelos del haplotipo SLICK. Por lo tanto, la probabilidad de que un animal de cualquier población tuviera la supresión de citosinas y no tuviera los otros 10 marcadores identificados de esta manera es tan excedentemente baja como que es imposible.

Aunque esta invención se ha descrito en conjunción con las diversas modalidades ejemplares descritas en lo anterior, varias alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sea conocidos o que son o pueden ser actualmente imprevistos, puede ser evidente para aquellos que tengan al menos experiencia ordinaria en la técnica. Por consiguiente, las modalidades ejemplares de acuerdo con esta descripción, como se expone en lo anterior, se proponen para ser ilustrativas no limitantes. Varios cambios se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, la invención se propone para abarcar todas las alternativas, modificaciones, variaciones,

mejoras y/o equivalentes sustanciales conocidos o desarrollados después de estas modalidades ejemplares.

Los siguientes párrafos enumerados consecutivamente de 1 a 73 proporcionan varios aspectos adicionales de la presente invención. En una modalidad, en un primer párrafo, 1:

1. La presente descripción proporciona un animal de ganado genéticamente modificado para expresar un gen de receptor de prolactina (PRLR) que da por resultado un PRLR truncado.
- 10 2. El animal de ganado del párrafo 1, en donde el PRLR está truncado después de la tirosina en el residuo 433 del residuo identificado por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.
- 15 3. El animal de ganado de los párrafos 1 y 2, en donde el PRLR está truncado después del residuo en AA 461.
4. El animal de ganado de los párrafos 1 a 3, en donde el PRLR está truncado después del residuo en AA 496.
5. El animal de ganado de los párrafos 1 a 4, en donde el PRLR está truncado después del residuo en AA 464.
- 20 6. El animal de ganado de los párrafos 1 a 5, en donde el animal es menos susceptible a estrés por calor.
7. El animal de ganado de los párrafos 1 a 6, en donde el animal es un artiodáctilo.
8. El animal de ganado de los párrafos 1 a 7, en donde

el artiodáctilo es un bovino.

9. El animal de ganado de los párrafos 1 a 8, en donde la modificación genética se hace por introgresión no meiótica.

5 10. El animal de ganado de los párrafos 1 a 9, en donde la modificación genética se hace por tecnología de CRISPR/CAS, nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, o TALENs.

10 11. El animal de ganado de los párrafos 1 a 10, en donde la modificación genética es heterocigota.

12. El animal de ganado de los párrafos 1 a 11, en donde la modificación genética es homocigota.

15 13. El animal de ganado de los párrafos 1 a 12, en donde el gen PRLR se modifica después del residuo 1383 del ARNm como es identificado por el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

14. El animal de ganado de los párrafos 1 a 13, en donde la modificación da por resultado un rompimiento en la síntesis de proteína del gen.

20 15. El animal de ganado de los párrafos 1 a 14, en donde el animal expresa el fenotipo SLICK.

16. Un animal de ganado modificado genéticamente para expresar un fenotipo SLICK comprende la modificación del gen PRLR después del residuo 1383 como es identificado por el

ARNm que tiene el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

17. El animal de ganado del párrafo 16, en donde la modificación es introgresión no meiótica hecha por la tecnología CRISPR/CAS, nucleasa de dedos de zinc, 5 meganucleasa, o TALENs.

18. El animal de ganado de los párrafos 16 y 17, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene entre 433 aminoácidos y 511 aminoácidos como es identificado por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.

10 19. El animal de ganado de los párrafos 16 a 18, en donde la modificación genética da por resultado una proteína PRLR que tiene 433 aminoácidos.

20. El animal de ganado de los párrafos 16 a 19, en donde la modificación genética da por resultado una proteína 15 PRLR que tiene 461 aminoácidos.

21. El animal de ganado de los párrafos 16 a 20, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 464 aminoácidos.

22. El animal de ganado de los párrafos 16 a 21, en 20 donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 496 aminoácidos.

23. El animal de ganado de los párrafos 16 a 22, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 511 aminoácidos.

24. El animal de ganado de los párrafos 16 a 23, en donde la modificación se hace a una célula somática y el animal es clonado por transferencia nuclear de la célula somática a un huevo enucleado.

5 25. El animal de ganado de los párrafos 16 a 24, en donde la modificación comprende una mutación que rompe la síntesis de proteína al proporcionar una supresión, inserción o mutación del marco de lectura genético.

26. Un método para modificar genéticamente animales de
10 ganado para expresar un fenotipo SLICK que comprende, expresar un gen del receptor de prolactina (PRLR) modificado para romper la síntesis de la proteína de receptor de prolactina (PRLR) después del residuo de aminoácido 433 como es identificado por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.

15 27. El método del párrafo 26, en donde la modificación se hace al proporcionar un par de TALENs y una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR) homóloga a una porción del PRLR diseñado para introducir una mutación de cambio de marco o codón de detención.

20 28. El método del párrafo 26 y 27, en donde el rompimiento de la síntesis se introduce después de nucleótido 1383 del ARNm identificado por el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

29. El método del párrafo 26 a 28, en donde la

modificación se hace por tecnología CRISPR/CAS utilizando el ARN guía.

30. El método de los párrafos 26 a 29, incluyen además introducir un sitio de restricción de nucleasa próximo a la
5 modificación genética.

31. El método de los párrafos 26 a 30, en donde el sitio de restricción de nucleasa está corriente abajo de la modificación genética.

32. El método de los párrafos 26 a 31, en donde la
10 modificación genética y la introducción del sitio de restricción de nucleasa se dirigen por la misma plantilla de HDR.

33. El método de los párrafos 26 a 32, en donde la modificación genética y la introducción del sitio de
15 restricción de nucleasa se dirigen por las diferentes plantillas de HDR.

34. El método de los párrafos 26 a 33, en donde la modificación genética se hace a una célula somática y el núcleo de la célula somática se transfiere a un huevo
20 enucleado de la misma especie.

35. El método de los párrafos 26 a 34, en donde el huevo enucleado se transfiere a una madre sustituta.

36. Un animal de ganado genéticamente modificado de acuerdo con cualquiera de los párrafos anteriores que

comprende un alelo PRLR convertido para expresar un fenotipo SLICK.

37. Una célula de animal de ganado que comprende un alelo del receptor de prolactina genéticamente modificado
5 (PRLR) que da por resultado un PRLR truncado.

38. La célula de animal de ganado del párrafo 37, en donde el PRLR se trunca después de la tirosina en el residuo 433 de la proteína identificada por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.

10 39. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 o 38, en donde el PRLR se trunca después del residuo de alanina en AA 461.

40. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 39, en donde el PRLR se trunca después del
15 residuo de prolina en 496.

41. La célula animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 40, en donde el PRLR se trunca después del residuo de alanina en 464.

42. La célula de animal de ganado de cualquiera de los
20 párrafos 37 a 41, en donde el animal es menos susceptible al estrés por calor.

43. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 42, en donde el animal es un artiodáctilo.

44. La célula de animal de ganado de cualquiera de los

párrafos 37 a 43, en donde el artiodáctilo es un bovino.

45. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 44, en donde la modificación genética se hace por introgresión no meiótica.

5 46. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 45, en donde la modificación genética se hace por la tecnología CRISPR/CAS, nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, o TALENs.

10 47. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 46, en donde la modificación genética es heterocigota.

48. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 47, en donde la modificación genética es homocigota.

15 49. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 48, en donde el gen PRLR se modifica después del residuo 1383 del ARNm como es identificado por el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

20 50. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 49, en donde el PRLR se modifica para ser truncado entre el residuo Y433 y Y512 del péptido como es identificado por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.

51. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 50, en donde la modificación da por resultado

un rompimiento en la síntesis de proteínas del gen.

52. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 37 a 51, en donde el animal expresa el fenotipo SLICK.

5 53. Una célula animal de ganado genéticamente modificada para expresar un fenotipo SLICK que comprende la modificación del gen PRLR después del residuo 1383 como es identificado por el ARNm que tiene el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

10 54. La célula animal de ganado del párrafo 53, en donde la modificación se hace por introgresión no meiótica utilizando la tecnología CRISPR/CAS, nucleasa de dedos de zinc, meganucleasa, o TALENs.

15 55. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 o 54, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene entre 433 aminoácidos y 511 aminoácidos como es identificado por el No. de Acceso de GenBank AAA51417.

20 56. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 55, en donde la modificación genética da por resultado una proteína PRLR que tiene de 433 aminoácidos.

57. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 56, en donde la modificación genética da por resultado una proteína PRLR que tiene 461 aminoácidos.

58. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 57, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 464 aminoácidos.

5 59. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 58, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 496 aminoácidos.

60. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 59, en donde la modificación genética da por resultado un PRLR que tiene 511 aminoácidos.

10 61. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 60, en donde la modificación se hace a una célula somática y el animal se clona por transferencia nuclear de la célula somática a un huevo enucleado.

15 62. La célula de animal de ganado de cualquiera de los párrafos 53 a 61, en donde la modificación comprende una mutación que rompe la síntesis de proteína proporcionar una supresión, inserción o mutación del marco de lectura genético.

20 63. Un método para modificar genéticamente células animales de ganado para tener un genotipo SLICK que comprende, expresar un gen de receptor de prolactina (PRLR) modificado para romper la síntesis de la proteína del receptor de prolactina (PRLR) después del residuo de aminoácido 433 como es identificado por el No. de Acceso de

GenBank AAA51417.

64. El método del párrafo 63, en donde la modificación se hace al proporcionar un par de TALENs y una plantilla de reparación dirigida por homología (HDR) homóloga a una
5 porción de PRLR diseñado para inducir una mutación de cambio de marco o codón de detención.

65. El método de cualquiera de los párrafos 63 o 64, en donde la modificación se hace por tecnología CRISPR/CAS utilizando un ARN guía.

10 66. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 65, en donde el rompimiento de la síntesis se introduce después del nucleótido 1383 del ARNm identificado por el No. de Acceso de GenBank NM_001039726.

15 67. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 66, que además incluye introducir un sitio de restricción de nucleasa próximo a la modificación genética.

68. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 67, en donde el sitio de restricción de nucleasa es cadena abajo de la modificación genética.

20 69. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 68, en donde la modificación genética y la introducción del sitio de restricción de nucleasa se dirigen por la misma plantilla de HDR.

70. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 69, en

donde la modificación genética y la introducción del sitio de restricción de nucleasa se dirige por diferentes plantillas de HDR.

71. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 70, en
5 donde la modificación genética se hace a una célula somática y el núcleo de la célula somática se transfiere a un huevo enucleado de la misma especie.

72. El método de cualquiera de los párrafos 63 a 71, en
donde el huevo enucleado se vuelve a nuclear y se transfiere
10 a una madre sustituta.

73. Una célula animal de ganado genéticamente modificada que comprende un alelo PRLR convertido para expresar un genotipo SLICK.

Todas las patentes, publicaciones, y artículos de
15 revista expuestos en la presente se incorporan por este medio a manera de referencia en la presente; en caso de conflicto, la presente especificación lo controlará.

Aunque esta invención se ha descrito en conjunción con las diversas modalidades ejemplares descritas en lo anterior,
20 varias alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales, ya sea conocidos o que son o pueden ser actualmente imprevistos, pueden ser evidentes para aquellas que tienen al menos experiencia ordinaria en la técnica. Por consiguiente, las modalidades ejemplares de

acuerdo con esta invención, como se expone en lo anterior, se proponen para ser ilustrativas, no limitantes. Varios cambios se pueden hacer sin apartarse del espíritu y alcance de la invención. Por lo tanto, la invención se propone para abarcar
5 todas las alternativas, modificaciones, variaciones, mejoras y/o equivalentes sustanciales conocidos o desarrollador después de estas modalidades ejemplares.

10

15

20

NOVEDAD DE LA INVENCION

Habiendo descrito la presente invención, se considera como novedad, y por lo tanto se reclama como propiedad lo contenido en las siguientes.

5

10

15

20