

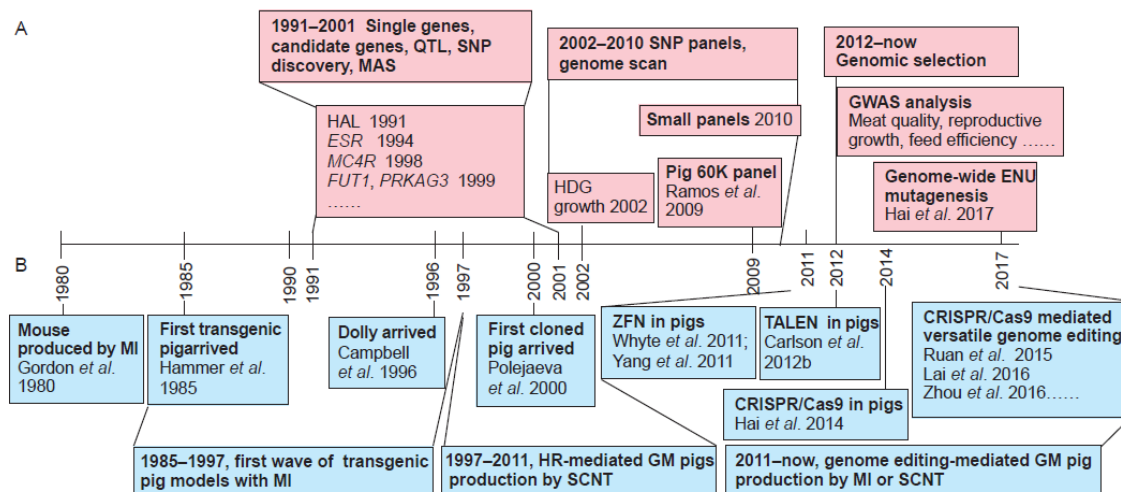


Геномното редактиране и инструментите на геномното инженерство в свиневъдството в борбата срещу ASFV, CSFV и други вирусни заболявания по свине

Научна информация

Учените имат дълга история в изследването на геномното разнообразие и генетичния състав, придаващ конкретни фенотипни характеристики при продуктивни животни, с цел оптимизиране производството на продуктивни животни и по-специално свиневъдството, в отговор на нарастващите глобални изисквания за висококачествено свинско месо, като по този начин допринасят за подобряване на хранителните навици на човешката популация и обезпечаване на продоволствената сигурност. В конвенционалните системи за селекция и репродукция, за да се получат генетични подобрения в чистите линии, които да допринасят за промишленото производство на продуктивни животни и месо, трябва да се осъществи сериозен подбор, фенотипен и генотипен, генетична оценка, подбор на родителски линии и др. Процесите като цяло са бавни, но някои икономически значими черти, като скорост на растеж и трупане на телесно тегло, увеличаване на лактацията се подобряват сравнително бързо (*Chen et al. 2002*). От 80-те години насам са открити и разработени генетични маркери, прилагани в програми за подобряване на генотипните и фенотипните характеристики на продуктивните животни, които показват голям потенциал за преодоляване на горните ограничения по време на селекцията. Много учени се опитват да идентифицират генетични маркери от микросателити до единични нуклеотидни полиморфизми (SNPs), които са свързани с икономически важни черти и характеристики чрез генни подходи и количествено определяне на локусите, кодиращи определени признаци (QTL). Идентифицирани са някои добре известни икономически важни гени, включително ESR, RN, MC4R и др. (*Van Eenennaam et al. 2014*). Подходът за подпомагане на маркера (MAS) значително подобрява точността на оценките на развъдната стойност за моногенните черти. Това обаче не важи за количествени или полигенни признаци с ниска наследственост, като например репродуктивни качества и качество на месото. Панелът 60K SNP за прасета е разработен и пуснат през 2009 г., което дава възможност за оценка и подбор на генетичните качества на кандидат-разплодни животни с по-голяма точност чрез анализ на целия геном (*GWAS- A genome-wide association study is an approach used in genetics research to associate specific genetic variations with particular diseases. The method involves scanning the genomes from many different species and looking for genetic markers that can be used to predict the presence of a disease.*), особено за полигенни признаци (*Ramos et al. 2009*). Чрез GWAS са успешно идентифицирани множество геномни маркери, контролиращи генетичните вариации в икономически важни фенотипове на свине, включително патогенни причинители и QTLs, (*Ernst and Steibel 2013*). По отношение на избора на геноми, развъждането, високата цена на изолирането на ДНК, генотипирането и събирането на фенотипни данни силно ограничават приложението на този метод. В допълнение, съвсем наскоро се съобщава за изкуствена случайна мутагенеза при N-етил-N-нитрозоурей (ENU) при прасета, която предоставя мощен инструмент за ефективно генериране на резервоар от мутанти на ниво геном и ефективен скрининг на мутанти с желани алелни модификации за селскостопански и

биомедицински цели (Hai et al. 2017). Времето историческа линия за използване на ДНК маркери в програми за отглеждане и развъждане на свине, както медираната от ENU мутагенеза на ниво геном при свинете и специфичните етапи на генното инженерство, инструментите за редактиране на генома и геномно модифицираните свине през последните 35 години е представена и обобщена на фиг. 1.

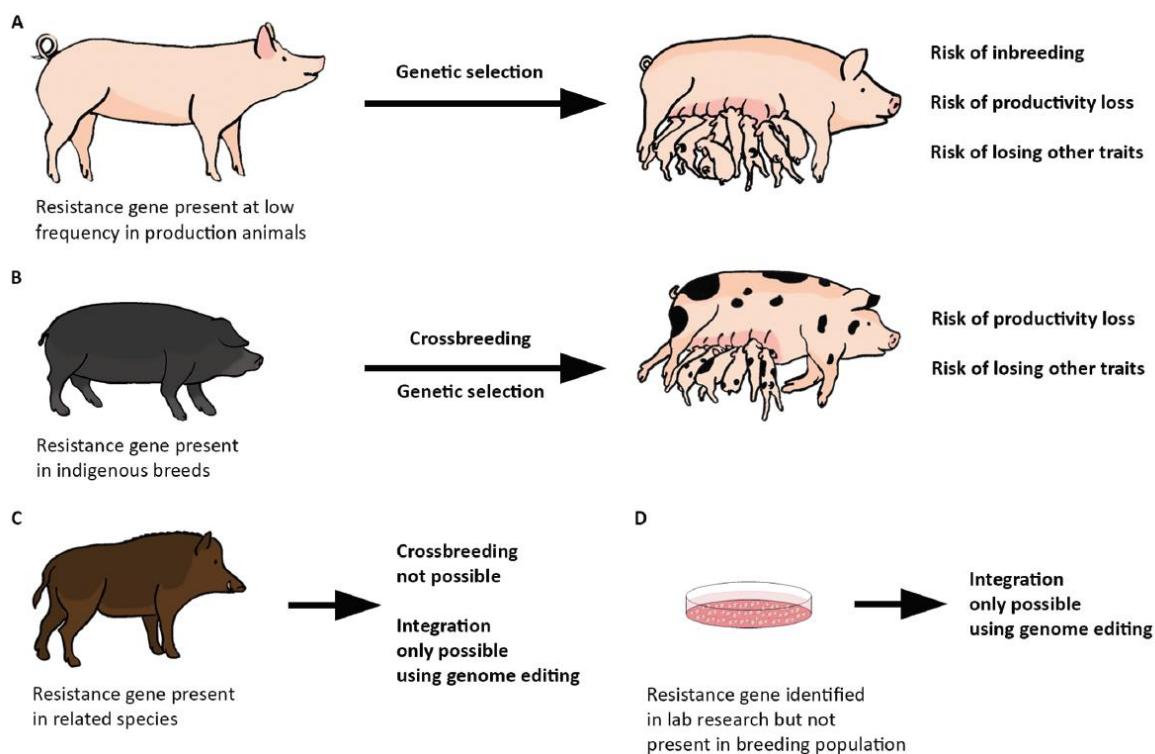


Фиг. 1: Времева графика на разработките в областта на генното инженерство, развитието на геномните маркери, както и генното редактиране, използвани в конвенционалното и модерното развъждане и селекцията в свиневъдството

Несъмнено конвенционалната или „изкуствена“ програма за селекция при свине е до голяма степен противоречива, но поради ограниченията, описани по-горе, се очаква нововъведенията в развъдните стратегии да подобрят ефективно производството на свине.

Техники за генно инженерство:

През последните три десетилетия, с нарастващата способност за разчитане и тълкуване на свинския геном и с развитието на съвременните биотехнологии и наскоро разработените и оптимизирани инструменти за редактиране на генома, желаните алели и фенотипните желани характеристики могат да бъдат почти незабавно въведени в генома на гостоприемника, който предлага потенциал за подобряване на свиневъдния сектор.



Фиг. 2: Схематично представени типовете техники и инструменти на генното инженерство и рисковете, свързани с тях

Случайно интегриране на чужда ДНК:

През 1980 г. се съобщава за генерирането на трансгенни мишки чрез директно инжектиране на екзогенна ДНК в едноклетъчни ембриони (*Gordon et al. 1980*) и тази техника бързо се прилага и при продуктивни животни. В продължение на много години, преди други алтернативни стратегии, пронуклеарното микроинжектиране (МИ) е единственият метод за създаване на трансгенни продуктивни животни (*Hammer et al. 1985*). Основното ограничение на стратегиите за МИ е случайната интеграция и променлива експресия на трансгена. Освен това тази процедура има ниска ефективност (1–4% трансгенно потомство) и е изключително времеемка и скъпа. Малко трансгенни прасета са генерирани с МИ, които целят подобряване на скоростта на растеж на свинете. С изключение на МИ, успешно са разработени няколко стратегии за трансфер на чужда ДНК при прасета, включително медиран от сперматозоиди генен трансфер (SMGT) (*Lavitrano et al. 1997; Chang et al. 2002*), медиран от вируси трансфер (*Cabot et al. 2001; Hofmann et al. 2003*), медирана от интрацитоплазматична спермална трансгенеза (*ICSI - Intracytoplasmic sperm injection is an in vitro fertilization (IVF) procedure in which a single sperm cell is injected directly into the cytoplasm of an egg.*) (*Pereyra-Bonnet et al. 2008*).

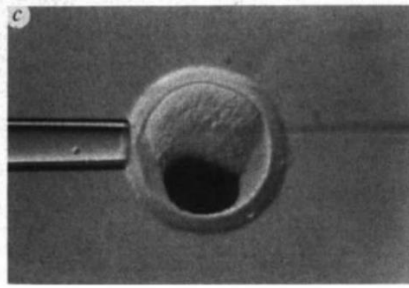
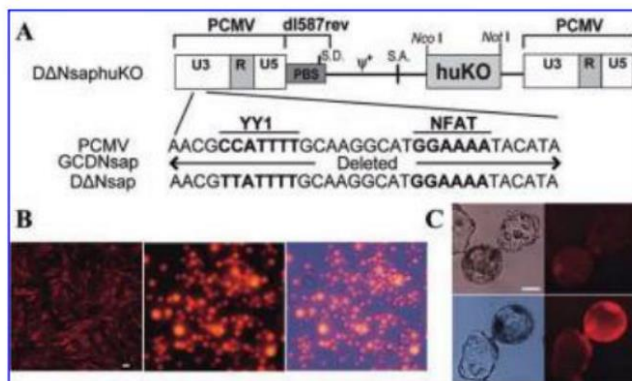
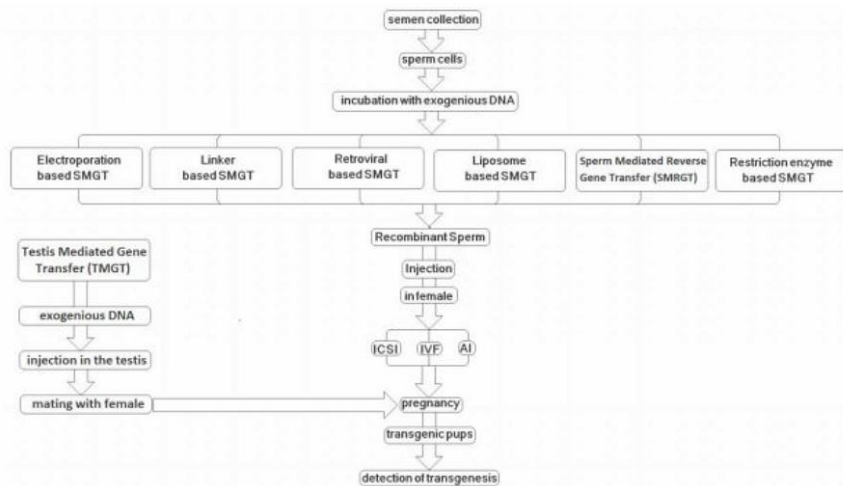
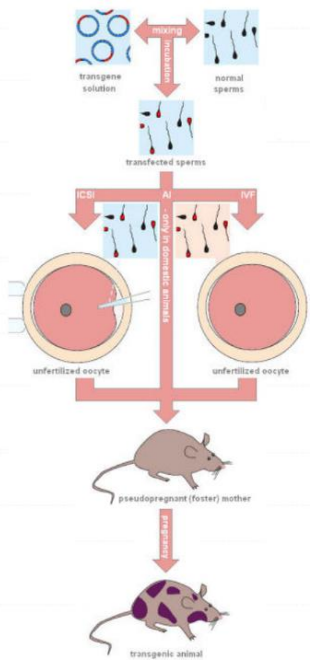


Fig. 1 Interference-contrast photomicrographs of one-cell fertilized ova from rabbit (a), sheep (b) and pig (c) following microinjection. Ova are held by a blunt holding pipette (diameter ~50 μm); an injecting pipette (diameter ~1.5 μm) has penetrated the zona pellucida, plasma membrane and pronuclear envelope. The tip is seen within the nucleoplasm immediately following injection of buffer containing DNA. The porcine ova (c) has been centrifuged at 15,000g for 3 min to reveal the normally obscure pronuclei¹⁵. Visualization of nuclear structures is aided by the use of interference-contrast optics, and microinjection is carried out under $\times 250$ magnification using a Leitz microinjecting apparatus^{10,14}. Injection was monitored by observing the diameter of the pronucleus or nucleus, which was expanded ~50%.

transgenic rabbits, sheep and pigs

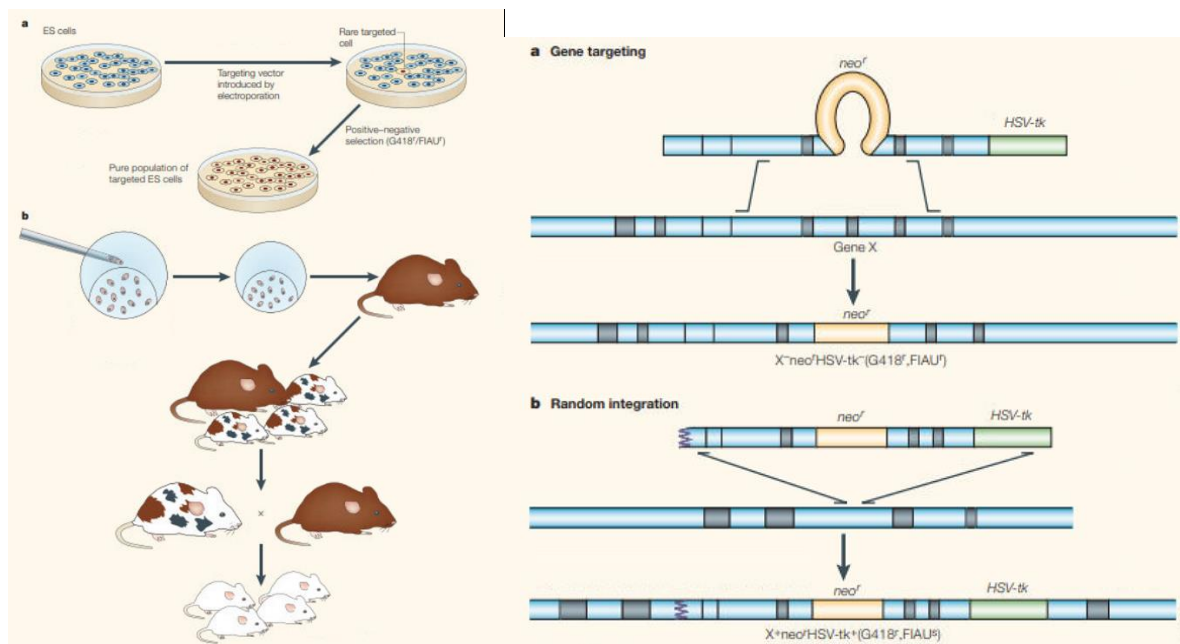
Species	Animal and sex	Gene copy (no. per cell)	hGH mRNA (molecules cell ⁻¹)	Immuno-assayable hGH (ng ml ⁻¹)
Pig	100-3*	4	0	ND
	163-4*	140	0	ND
	3-2♂	330	26	Neg.
	3-6♂	490	53	17
	7-3♀	90	12	80
	10-4♀	23	0	Neg.
	11-2♂	1	0	40
	16-3♀	3	0	Neg.
	16-8♀	10	18	53
	16-9♂	1	5	65
	17-4♀	3	0	Neg.
	18-3♀	3	6	60
	20-2♂	2	4	40
	20-8♂	110	1	2
	21-4♂	1	2	Neg.
	21-5♀	1	0	Neg.
22-1♀	50	24	56	
23-8♀	7	41	730	
25-2♀	17	0	108	
25-4♀	2	0	Neg	



Фиг. 3: Схематично представени процесите на MI и SMGT и медиран от вируси трансфер

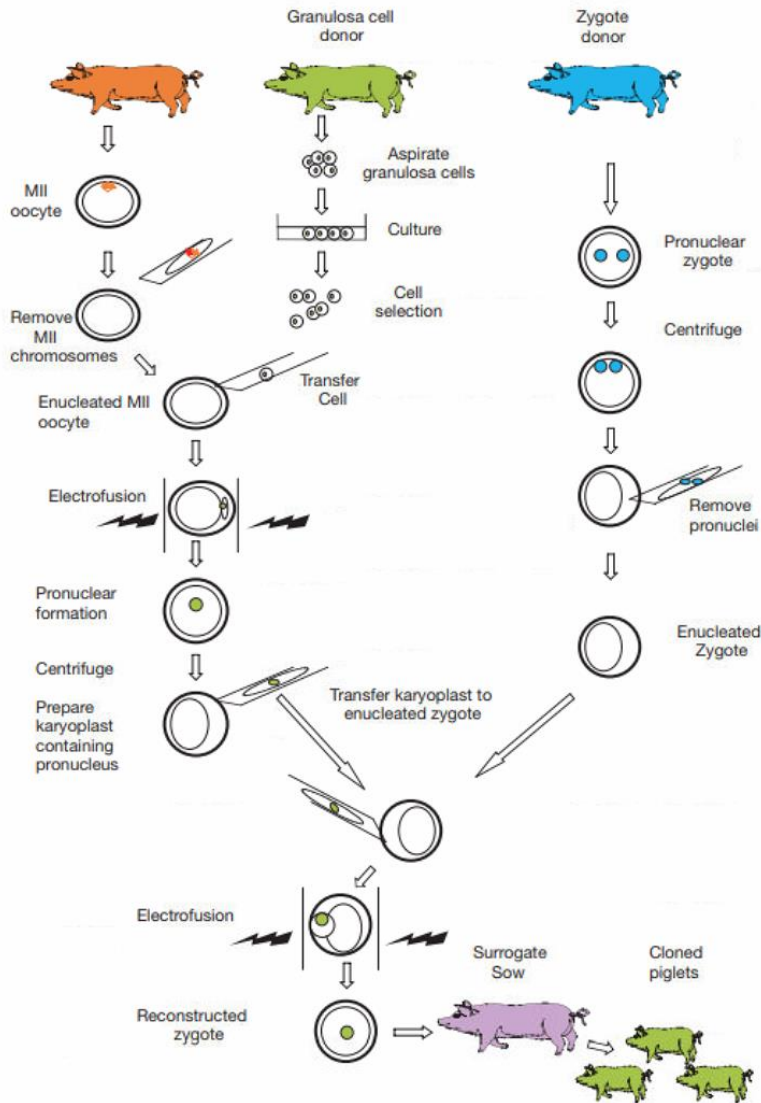
Клетъчно медиран трансгенен процес:

Забележителната промяна в стъпките при насочване на миши гени е откриването на миши ембрионални стволови клетки (ESC). Характеристиките на тези плурипотентни клетки, като неограничен растеж *in vitro*, висока ефективност на хомоложна рекомбинация (HR) и способността да се диференцират във всички видове клетки, осигуряват мощна клетъчно медирана трансгенна стратегия за генериране на генно модифицирани мишки (*Caracchi 2005*).



Фиг. 4: Схематично представен процеса по клетъчно медирана трансгенеза

Въпреки това, тази техника все още не е достъпна за генетични модификации при прасета, тъй като досега не са изолирани характерни свински ESC. Едно от най-забележителните открития, свързани с използването на тази техника е създаването през 1996 г. на клонираната овца Доли, която е първият бозайник, произведен чрез ядрено пренасяне на соматични клетки (SCNT) (*Campbell et al. 1996*). Клонирани прасенца от култивирана популация соматични клетки, са генерирани едва през 2000 г. (*Polejaeva et al. 2000*).



Фиг. 5: Схематично представен процеса по създаване на клонирани прасета

В сравнение с MI, SCNT има много ползи и предимства, като например необходимостта от по-малко експериментални животни и факта, че може да се приложи широк спектър от генни модификации. Въпреки това, медираното от SCNT генно инженерство при прасетата е възпрепятствано от ниската ефективност на клониране и трудностите при установяването на клетъчни линии с желаната генетична модификация поради липса на налични плурипотентни стволови клетки, компетентни за зародишната линия (Brevini et al. 2007; Keefer et al. 2007). Натрупващите се данни показват, че дефектното епигенетично препрограмиране на ДНК и хистоните вероятно е свързано с ниския общ процент на успех, свързан с клонирането (Dean et al. 2001; Kang et al. 2001; Santos et al. 2003). Преди появата на ефективни инструменти за редактиране на генома, ДНК HR, последвана от SCNT, е основният „инструментарий“ за генериране на *knock out* прасета. Въпреки това, само няколко успешни примера са създадени от тази стратегия поради изключително ниската честота на HR в соматични клетки (по-малко от 10^{-6}) и възможността само един алел да бъде насочен по време на една трансфекция. Ниската ефективност на генното насочване в култивирани соматични клетки крие доста пречки за генното инженерство и за създаването на трансгенни продуктивни животни.

Trait/Goal	Modification target	Technology ¹⁾	References
Growth	<i>GH</i>	Microinjection	Hammer <i>et al.</i> (1985); Pursel <i>et al.</i> (1990); Pursel and Rexroad (1993)
	<i>GRF</i>	Microinjection	Pursel <i>et al.</i> (1990)
	<i>IGF-1</i>	Microinjection	Pursel <i>et al.</i> (1990)
Meat fatty acids composition	<i>GHR</i>	TALEN and handmade cloning	Li <i>et al.</i> (2014)
	<i>Fat-1</i>	SCNT	Lai <i>et al.</i> (2006); Pan <i>et al.</i> (2010)
	<i>FAD2</i>	Microinjection	Saeki <i>et al.</i> (2004)
Meat production	<i>MSTN</i>	ZFN and SCNT	Qian <i>et al.</i> (2015)
	<i>MSTN</i>	CRISPR/Cas9 and SCNT	Wang K <i>et al.</i> (2015); Bi <i>et al.</i> (2016)
	<i>MSTN</i>	CRISPR/Cas9 and zygotes injection	Tanihara <i>et al.</i> (2016)
Disease resistance	<i>mlgA</i>	Microinjection	Lo <i>et al.</i> (1991); Weidle <i>et al.</i> (1991)
	<i>RELA</i>	TALEN or ZFN and zygotes injection	Lillico <i>et al.</i> (2013)
	<i>SIGLEC1</i>	HR and SCNT	Prather <i>et al.</i> (2013b)
	<i>CD163</i>	CRISPR/Cas9 and SCNT	Whitworth <i>et al.</i> (2014); Wells <i>et al.</i> (2017)
	<i>PBD-2</i>	SCNT	Yang <i>et al.</i> (2015)
	<i>CD1d</i>	CRISPR/Cas9 and SCNT	Whitworth <i>et al.</i> (2014)
	<i>Mx1</i>	Microinjection	Muller <i>et al.</i> (1992)
	<i>Mx1</i>	SCNT	Yan <i>et al.</i> (2014)
	<i>FMDV shRNA</i>	SCNT	Hu <i>et al.</i> (2015)
	<i>HDAC6</i>	SCNT	Lu <i>et al.</i> (2017)
Reproduction	<i>FSHa/β</i>	SCNT	Xu <i>et al.</i> (2016); Jiang <i>et al.</i> (2017)
Lactation performance	<i>rHLA</i>	SCNT	Ma <i>et al.</i> (2016)
Environmental friendly	<i>Phytase</i>	Microinjection	Golovan <i>et al.</i> (2001)

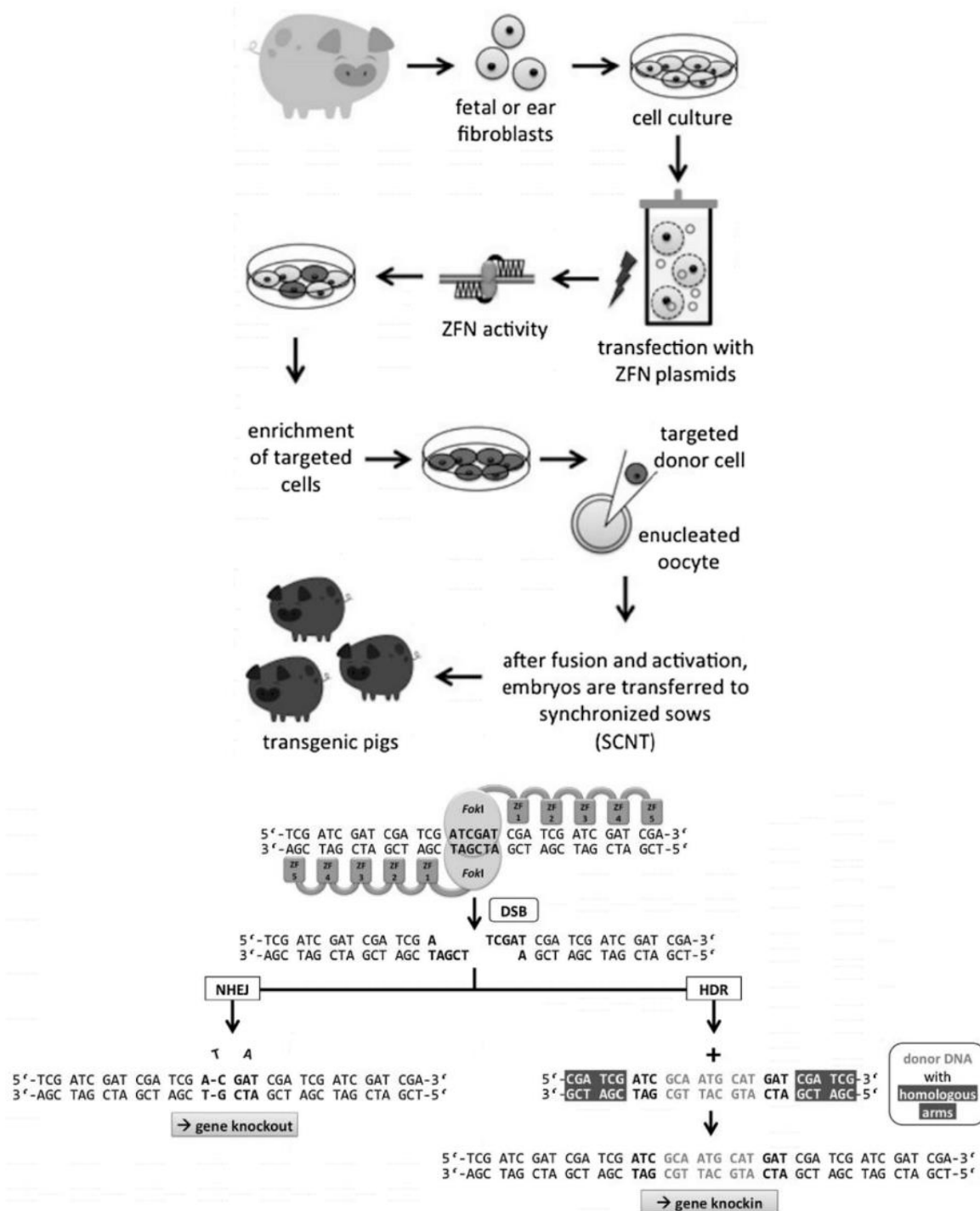
¹⁾TALEN, transcription activator-like effector nuclease; SCNT, somatic cell nuclear transfer; ZFN, zinc finger nuclease; CRISPR/Cas9, clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)/CRISPR-associated (Cas) protein 9 system; HR, homologous recombination.

Фиг. 6: История на генно модифицирани свине, създадени за промишленото свиневъдство

Нуклеазно медирано редактиране на генома:

Появата на усъвършенствани средства за редактиране на гени, медирано от мегануклеази, въвежда нова ера в генното инженерство и асистираното насочване на гените, особено при продуктивни животни, и предоставя мощни подходи за подобряване на ефективността на животновъдството. Има много мегануклеази, включително проектирани ендонуклеази и мегануклеази, които се използват за редактиране на гени. Petersen и Niemann (2015) в тяхното научно проучване правят преглед на всяка мегануклеаза и тяхното приложение при продуктивни животни. Три от най-често използваните мегануклеази са: нуклеаза тип цинкови пръсти (ZFN), транскрипционно-активаторна ефекторна нуклеаза (TALEN) и клъстерираната кратка палиндромна повторка (CRISPR)/CRISPR-свързана с (Cas) протеин 9 система. Тези нуклеази се използват за генериране на двувъдечно скъсане (DSB) в желания геномен локус и позволяват сайт насочено геномно инженерство, като същевременно притежават много предимства, включително висока ефективност и евтина, лесна и бърза употреба, даваща висока резултатност.

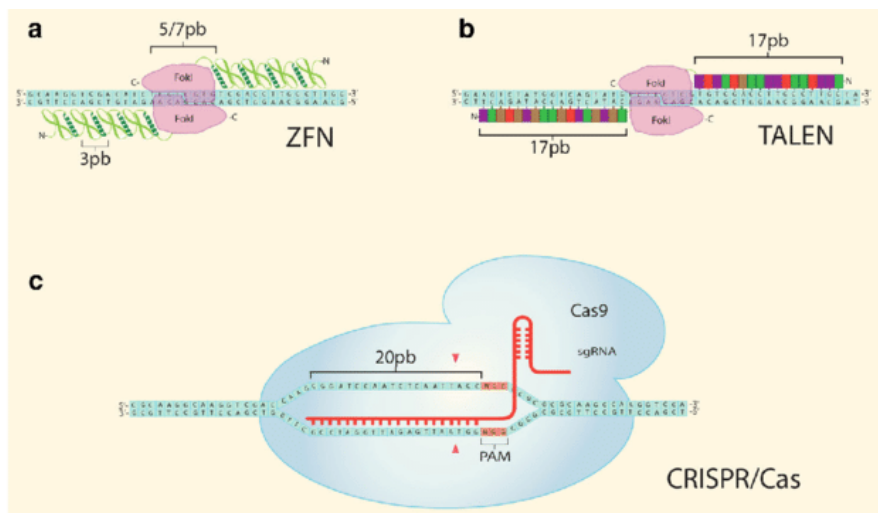
A ZFN targeting in cells and SCNT



Фиг. 7: Схематично представен процеса на генна редакция и създаване на трансгенни прасета посредством нуклеазите тип цинкови пръсти

Нещо повече, създаването на двуалелни *knock out* свине чрез HR е процес, отнемащ време, който изисква 3-5 години серийно клониране и размножаване. За разлика от това, хомозиготни *knock out* животни могат да бъдат постигнати в една стъпка от ZFN (Geurts et al. 2009; Whyte et al. 2011; Yu et al. 2011), TALENs (Song et al. 2013; Huang et al. 2014; Liu et al. 2014) и CRISPR/Cas9s (Hai et al. 2014; Wang et al. 2015, 2016), което забележително намалява времето, необходимо за генериране на хомозиготно

мутантно потомство при свинете. Най-важното е, че и трите инструмента за генетично редактиране на гени са стратегии без препрограмиране на соматични клетки, които избягват пренатална или постнатална смърт, причинена от непълно епигенетично препрограмиране (Yao *et al.* 2016). Нуклеазно-медирият ген насочен протеин, ZFNs (Kim *et al.* 1996) и TALEN (Christian *et al.* 2010), са модулни протеини, съдържащи два домена: домен за разпознаване на ДНК и домен на FokI нуклеаза.



Фиг. 8: схематично представена доменната структура на ZFNs, TALEN, CRISPR/Cas9

В ZFNs всеки отделен цинков пръст се свързва с три двойки в ДНК, докато в TALENs всяко повторение свързва една ДНК последователност. Тази характеристика прави всяка ДНК последователност теоретична мишена на TALEN. ZFN са подобрили значително ефективността на генетичното насочване (от 10^{-6} на 10%), но **недостатъците**, свързани с нецелевото разцепване, цитотоксичността и ограничените целеви сайтове, ограничават техните приложения в промишлеността (Cornu *et al.* 2008). TALEN показват съпоставими предимства, включително дори по-висока ефективност, по-ниска цитотоксичност и относителна лекота на генериране на хомозиготни мутанти. Въпреки че са генерирани много ZFN-медириани генетично модифицирани прасета, тъй като първият пример за използването на тази стратегия е докладван през 2011 г. (Whyte *et al.* 2011; Yang *et al.* 2011; Yao *et al.* 2016), ZFN стратегията е бързо заменен от TALEN поради предимствата, описани по-горе.

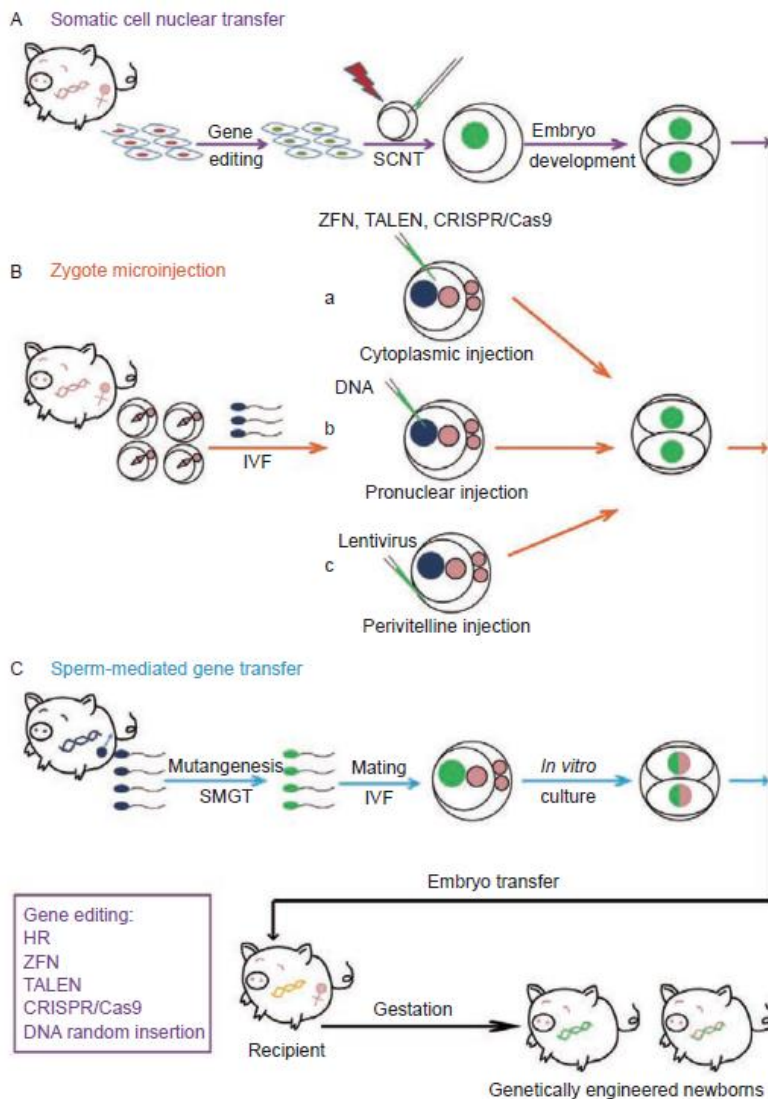
Истински технологичен пробив настъпва през 2013 г. с откриването на CRISPR/Cas9, който обещава още по-голяма ефективност, гъвкавост, простота и по-ниска цена и предизвика нова революция в много изследователски области (Mussolino and Cathomen 2013). Този последен инструмент е получен от бактериална имунна система и използва малка РНК за насочване на универсална мономерна нуклеаза (Cas9) към конкретната цел - ДНК сайт, където индуцира ДНК DSB. Най-често използваният вариант е протеинът Cas9, който е с дължина 1368 остатъка и е от *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) (Haft *et al.* 2005). Съвременните нуклеази на Cas9 могат да използват едноверижна направляваща РНК (sgRNA), за да образуват функционална направляваща РНК комплекс с Cas9, който постига програмирано от РНК разцепване на ДНК и опростява използването на системата CRISPR/Cas9 (Jinek *et al.* 2012). Ако се добавят повече насочващи РНК последователности теоретично, които могат да се насочат към множество различни гени, активността на Cas9 нуклеазата може да бъде насочена към множество различни целеви сайтове в генома. Тази способност да модифицира всички алели на множество гени са докладвани при мишки първо (Wang *et al.* 2013), скоро след

това са генерирани **трансгенни прасета с множество генни целеви редакции** (*Whitworth et al. 2014; Li et al. 2015; Zhou et al. 2016*). Освен това са докладвани модификации при прасета като: CRISPR/Cas9-медирано универсално редактиране на генома при свине, размяна на цял екзон (*Whitworth et al. 2014*), специфични за мястото разцепвания (*Peng et al. 2015; Ruan et al. 2015; Lai et al. 2016*) и единични аминокиселинни замествания, независими от SCNT (*Zhou et al. 2016*).

Поради много късата последователност за разпознаване на целта и толеранс за несъответствия, тази относително проста система **може да има нецелеви ефекти**, които могат да доведат до въвеждане на неволни или нецелеви мутации другаде в генома, грешки при прочитане на генома след това или погрешна експресия на гените. Положени са значителни усилия и са оценени множество стратегии за намаляване на броя на нецелевите ефекти, но все още тези геномни редакции остават стратегии за в бъдеще и не биха могли с лека ръка да бъдат приложени за промишлено развъждане и селектиране на продуктивни животни. С цел „гъвкаво“ редактиране на генома и по-малко нецелеви ефекти, няколко други естествени CRISPR нуклеази освен SpCas9 са разработени и използвани за редактиране на генома. Аналогът на Cas9 от *Staphylococcus aureus* (Sa) (SaCas9) е по-малък (1 053 остатъка) от SpCas9 и улеснява някои приложения (*Komor et al. 2017*). Повече от 10 вида Cas9 са идентифицирани с различни характеристики. Наскоро са идентифицирани допълнителни нуклеази, способни на РНК-насочено специфично разцепване на ДНК; например Cpf1 от *Acidaminococcus* sp. (AsCpf1) и от бактерията *Lachnospiraceae* Cpf1 (LbCpf1) са използвани за редактиране на генома при бозайници (*Zetsche et al. 2015*). Тези два ензима са различни по размер, изискване за съседен мотив на протоспейсър (PAM) и местоположение на въведения DSB в протопространството, освен това, разцепването на две ДНК вериги са разпределени в сравнение с SpCas9. Въпреки че тези ендонуклеази вече ни предоставят разнообразие от възможности за редактиране на генома, нарастващата популярност на редактирането на генома, съчетано с развитието на прецизни техники за редактиране на генома, означава важността на откриването на нови програмируеми ДНК-свързващи или ДНК-разцепващи ензими.

Генетично редактирани прасета за потенциални земеделски приложения:

През последните няколко години, забележителното развитие на нуклеаза медираните технологии за редактиране на гени направи революция в областта, тъй като големите животински геноми могат да бъдат модифицирани ефективно и усъвършенствано, макар и все още за *in vitro* експериментални проучвания. Не е изненадващо, че през последните няколко години са произведени много повече линии на трансгенни свине в сравнение с предходните три десетилетия. Голяма част от проучванията и публикациите описват създаването на трансгенни прасета за биомедицински изследвания, включително ксенотрансплантации, регенеративната медицина и туморната биология и др. (*Prather et al. 2013a; Butler et al. 2015; Redel and Prather 2016; Yao et al. 2016*). Въпреки резервите към тези технологии и към днешна дата са произведени около 20 трансгенни редактирани прасета, чиято цел на създаване е да бъдат за потенциални промишлени приложения. MSTN, CD163, RELA, GHR, CD1d и SIGLEC1 са едни от видовете трансгенни прасета, които са създадени чрез редактиране на генома, вместо въвеждане на екзогенни гени.



Фиг. 9: Схематично представени подходите при генно модифицирани свине

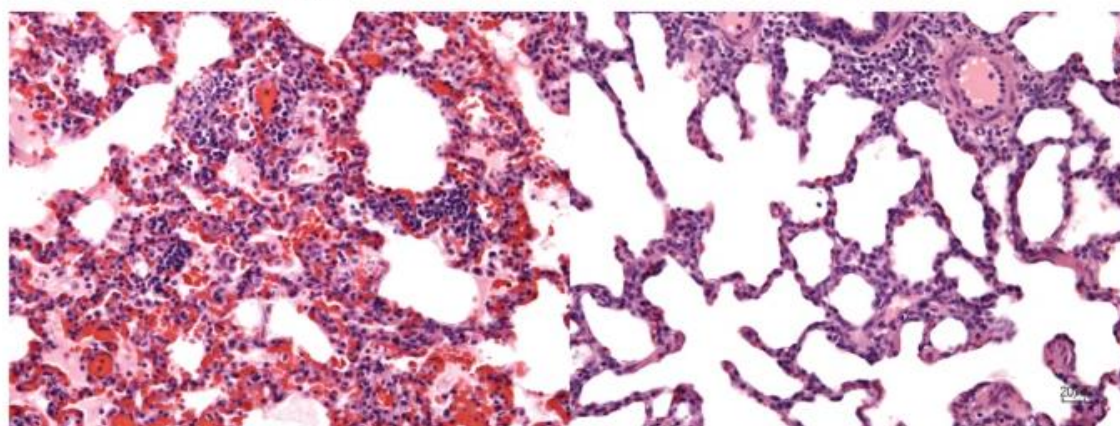
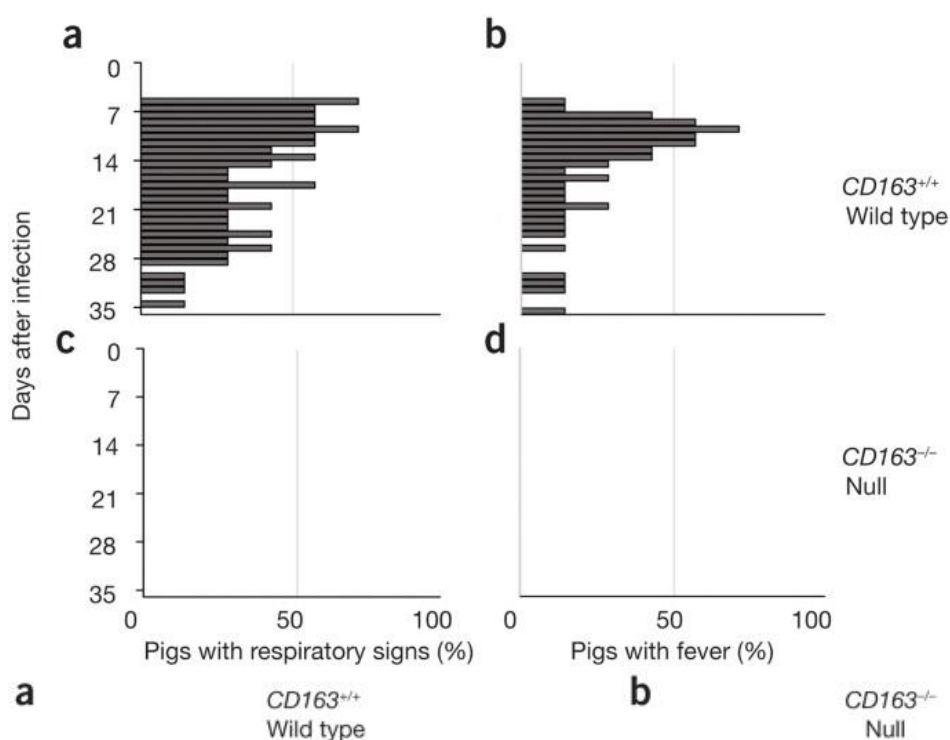
Устойчивост на заболявания

Основно направление в генното инженерство при продуктивни животни, бъдещо огромен интерес, е подобряването на резистентността/устойчивостта/толерантността към патогени чрез редактиране на генома с цел повишаване на здравния статус на свинете, намаляване на употребата на антибиотици, лекарства и медикаментозни фуражи и допълнително подобряване на ползите за качеството на свинското месо за човешка консумация. През последните няколко десетилетия традиционната генетична селекция за устойчивост на болести не беше толкова успешна, колкото селекцията за други икономически значими черти и характеристики, като растеж, наддаване на тегло, качество на месото и висока производителност. Основната причина за това е, че устойчивостта към болести е сложна и полигенна черта, а ваксинационните стратегии и използването на антибиотици забавиха до известна степен напредъка на програмирането и генното инженерство за подбор на устойчивост на болести. Въпреки това, с непрекъснато напредващите знания по отношение на генната функция, както и бързото развитие на инструментите за редактиране на геноми, целта на избора за устойчивост на

болести отново е във фокуса на учените и няколко генетично устойчиви трансгенни прасета са генерирани успешно.

Още през 1991 г. лека и тежка верига от миши моноклонални антитела (mAbs) са инокулирани в прасета чрез МІ с титри до $1\ 000\ \mu\text{g mAb mL}^{-1}$, открити в серумите на трансгенните прасета (*Lo et al. 1991 ; Weidle et al. 1991*). Повишените серумни нива на антителата могат да помогнат за подобряване на имунитета на тези свине и да ги предпазят от някои заболявания.

Една от най-икономически значимите заболявания по свинете в световен мащаб е **репродуктивният и респираторен синдром при свинете (PRRS)**, който застрашава промишлеността. Разработени са ваксини срещу този вирус, но индустрията не е в състояние да контролира болестта поради генетичното разнообразие и изменчивост на вируса. През 2010 г. вирусолозите предложиха модел на инфекция с PRRSV, при който SIGLEC1 (CD169) е идентифициран като необходим повърхностен рецептор за навлизане на PRRSV в свинските клетки. След това вирусът е непокрит от CD163 в ендозомата и вирусният геном е освободен в цитоплазмата (*Van Breedam et al. 2010*). Въз основа на хипотезата, че гостоприемник с дефектен рецептор ще бъде „имунизиран“ срещу PRRSV, генетиците преминават към предотвратяване на инфекция с PRRSV от страната на гостоприемника. *Knock out* прасетата SIGLEC1 са генерирани чрез HR и SCNT стратегия. Въпреки това, когато тези *Knock out* прасета са заразени с PRRSV, не са наблюдавани особени разлики във вирусната репликация в сравнение с прасетата от див тип (*Prather et al. 2013b*). След това учените насочиха вниманието си към гена CD163 и с помощта на системата CRISPR/Cas9 са създадени CD163 нулево трансгенно поколение свине (*Whitworth et al. 2014*). В сравнение с очевидните клинични признаци, съответстващи на PRRS при прасенца от див тип, при *knock out* прасета CD163 са наблюдавани липса на вiremия или клинични признаци, въпреки че са заразени и изложени на контакт със заразени животни (*Whitworth et al. 2016*). Трябва да се отбележи, че тези свине притежават пълна *knock out* на CD163, който е член на семейството на богатия на цистеин (SRCR) рецептор и се състои от 10 SRCR домена. Доказано е, че домен 5 от екзон 7 е отговорен за свързването на вируса. За да бъде напълно изяснена и проучена функцията на домен 5 при PRRSV инфекция са генерирани посредством технологията CRISPR/Cas9 генетично модифицирани прасета с нормален SRCR домен 5 или SRCR домен 5, заменени със синтетичен екзон, кодиращ хомолог на hCD163L1 SRCR домен 8 (размяна на домен). Проучванията на инфекции с различни PRRSV разкриха, че CD163 е вероятно да бъде рецепторът за всички вируси на PRRS и че *Knock out* прасета от домен 5 са устойчиви на тези вируси (*Wells et al. 2016*). Прецизирането на модификацията на CD163 предоставя възможност за отглеждане на **свине, които са устойчиви на PRRSV**, като същевременно запазват важните биологични функции, свързани с CD163.



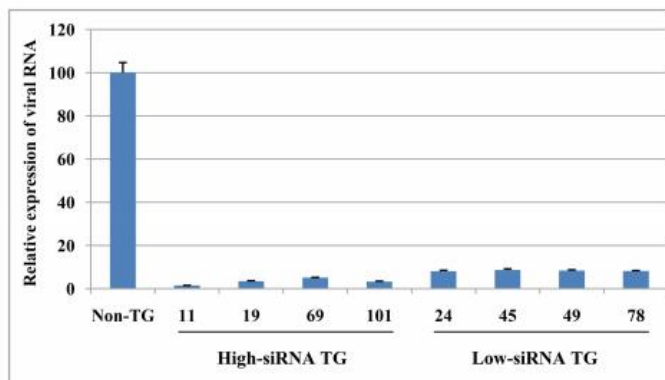
Фиг.10: Развитие или липса на инфекция при див тип прасета и при трансгенни прасета с knock out на CD163 на 35-ти ден след инфекция с PRRSV. Хистопатологична картина.

В допълнение, с изключение на CD163, е доказано, че хистон деацетилаза 6 (HDAC6) е критична за PRRS инфекция. Трансгенни прасета HDAC6 са произведени от SCNT и те показват повишена устойчивост към PRRS инфекция (Lu et al. 2017).

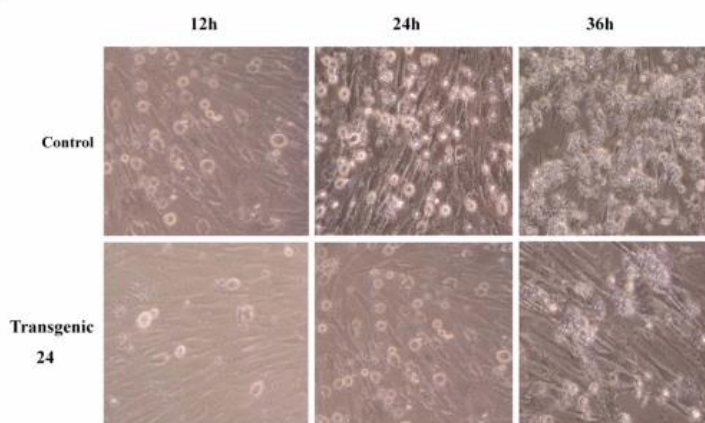
Вирუსът на шапа (FMDV) също е икономически опустошително вирусно заболяване, застрашаващо свинепроизводството в целия свят. Това заболяване е силно заразно и се разпространява много бързо. Ваксинационните програми имат за цел да предотвратят разпространението на това заболяване, обаче, след като настъпи пробив, може да е твърде късно ваксините да спрат разпространението му. Поколенията на генно „инженерни“ прасета които са устойчиви на инфекция, ще осигурят нова алтернативна стратегия за предотвратяване на огнища и разходи за болестта на шап. Трансгенните (TG) прасета, които конститутивно експресират специфични за FMDV кратко интерфериращи РНК (siRNAs), получени от малки shRNAs, са създадени и тествани чрез интрамускулно инжектиране с този вирус. Тези TG прасетата не показват клинични признаци на вирусна инфекция, докато дивите контролни прасета показват висока

температура, тежки клинични признаци на шап и типичните хистопатологични промени (Hu et al. 2015).

A



B



Фиг. 11: *shRNA* трансгенна резистентност към инфекцията с FMDV във фибробластни клетки на трансгенни свине. (A) Относителен израз на вирусна РНК във фибробластни клетки след инфекцията с FMDV. Данните са представени като средни стойности \pm SD. (B) Фибробластните клетки са наблюдавани за развитие на цитопатичен ефект чрез микроскопия 12, 24 и 36 часа след инфекцията.

Вирусът на африканската чума по свинете (ASFV) е силно инфекциозно заболяване, засягащо както домашни, така и диви свине. Инфектираните с ASFV прасета показват остра, бързо развиваща се с фатален край хеморагична треска и ASFV се счита за един от най-инфекциозните патогени при животните. Инфекциите с ASFV в популациите домашни свине имат сериозни социално-икономически последици в световен мащаб, особено в Африка.

Вирусът на африканската чума по свинете (ASFV) е широко разпространен ДНК вирус и единствен член на семейство *Asfarviridae*. Геномът на ASFV варира от 170 до 193 kbp и кодира 150-167 гена (Chapman et al., 2008 г.; de Villiers et al., 2010). Понастоящем са идентифицирани 23 генотипа ASFV въз основа на частично секвениране на гените, кодиращи основния капсиден протеин p72 (Achenbach et al., 2016). ASFV е ендемичен в цяла Субсахарска Африка и остров Сардиния, но през 2007 г. вирусът има огнища в Република Грузия, последвано от навлизане на вируса в Руската федерация и Източна Европа (Costard et al., 2013 г.; Rowlands et al., 2008). Изолатът от Грузия 2007/1, силно

вирулентен генотип 2, представлява голяма загриженост за световната свиневъдна индустрия (Rowlandset al., 2008; Chapman et al., 2011).

ASFV се поддържа в природата чрез паразитиране на меките кърлежи от рода *Ornithodoros* при диви свине (*Phacochoerus aethiopicus*, *Potamochoerus* sp.) (Costard et al., 2013). В тези гостоприемници вирусът причинява неклинична, персистираща инфекция. Инфекцията на домашни или диви свине от вида *Sus scrofa* води до фебрилно заболяване и широко разпространен системен кръвоизлив, който обикновено води до смърт в рамките на дни (Blome et al., 2013). Изолатите могат да бъдат разделени съобразно тяхната вирулентност - висока, умерена и ниска, всяка от които е свързана с редица клинични и патологични изяви (Blome et al., 2013 г.; Galindo-Cardiel et al., 2013). Силно вирулентните щамове могат да причинят остри и хиперостри инфекции, които водят до 100 % смъртност. Смъртта в резултат на хиперостра инфекция може да настъпи в рамките на 24 дни, често преди появата на клинични симптоми. Инфекциите с ASFV с ниска до умерена вирулентност са свързани с клинични симптоми, а смъртта настъпва между 12 и 20 дни при 30-60% от прасетата, но могат да се наблюдават леки или неочевидни клинични признаци без смъртност.

ASFV атакуват обикновено моноцити/макрофаги, а клетките на по-късните стадии на съзряване са преференциално инфектирани. Ранните *in vitro* проучвания установяват рецепторно-медиран механизъм за въвеждане на ASFV с помощта на адаптиран вирус върху *Vero* клетъчна линия. При тези проучвания са използвани лекарства - метаболитни инхибитори за блокиране на специфични компоненти на ендоцитозата и е установено, че инфекцията с ASFV е намалена. Освен това свързването на ASFV с повърхността на клетките *Vero* потвърждава, че е имало специфични рецептори, които се свързват с вируса (Alcami et al., 1989b). Тези резултати са проведени в първични макрофаги (Alcamiet al., 1990; Galindo et al., 2015). По-скорошните проучвания показват, че свързаната с клатрин, зависима от динамин ендоцитоза е основен път за въвеждане на ASFV (Galindo et al., 2015; Hernaez, Alonso, 2010; Cuesta-Geijo et al., 2012).

Клетъчният тропизъм на ASFV предполага, че за инфекцията е необходим макрофаг-специфичен рецептор. CD163 е повърхностен маркер, открит предимно върху зрели тъканни макрофаги (Pulford et al., 1992), и преди това е бил идентифициран като рецептор за ASFV (Sanchez-Torres et al., 2003). Това заключение се основава на наблюдението, че заразните макрофаги притежават зрял CD163- положителен фенотип, съчетан с капацитета на анти-CD163 моноклонални антитела за блокиране на инфекцията на първичните алвеоларни макрофаги в културата (Sanchez-Torres et al., 2003). Освен това местоположението на епитопите в N- терминалния край на CD163, разпознато от вирусното неутрализиращо моноклонално антитяло 2A10, показва домените на цистеин богатите рецептори (SRCR) - домени 1-3 - като региони на CD163, разпознавани от вируса (Van Gorpet et al., 2010). Едно от заключенията от тези проучвания е, че CD163 може да е необходим, но не достатъчен за инфекция, което предполага, че други макрофаг-повърхностни протеини, като CD45 и МНСII, вероятно също участват в процеса на инфекция (Lithgow et al., 2014).

Изолатът ASFV Georgia 2007/1 (Rowlandset al., 2008; Chapman et al., 2011) е любезно предоставен от Пърбрайт института. Вирусът се култивира върху първични култури на алвеоларни макрофаги от свине (PAMs), събрани от белодробна промивка от 3 до 5 седмични прасенца. Вирусът в серумната или тъканната култура е количествено определен чрез хемадсорбция. Степента на хемадсорбция е определена 5 дни след инфекцията и \log_{10} от 50 % доза хемадсорбция (HAD₅₀) е изчислена по метода Spearman-Kärber (Hierholzer u Killington, 1996).

Свинете CD163 KO са създадени чрез системата CRISPR/Cas9, ефикасен метод за въвеждане на хомозиготни мутации при прасета, както е описано по-рано (*Whitworth et al., 2016, 2014*). Използва се насочваща РНК (gRNA) и ендонуклеаза от *Staphylococcus pyogenes* Cas9 за прицелване на екзон 7 от гена за CD163. Една от техниките включва трансфектиране на свински фибробласти с gRNA и Cas9, внесени чрез вектора pX330. Ядрото от трансфектирания фибробласт се прехвърля в ооцити чрез ядрен трансфер (SCNT) и реконструираният ооцит се опложда *in vitro* (IVF). След това ембрионът се прехвърля на сурогатна свиня майка за износване на плода. Алтернативно, немодифицираните ембриони могат да преминат IVF и след това се култивират, докато не станат зиготи. Зиготите се инжектират директно с насочващата РНК, кодираща gRNA и Cas9. Модифицираните зиготи се прехвърлят в сурогатна свиня-майка. Опитните животни се отглеждат, за да произведат потомство, което е див тип (WT), пълен CD163 *knock out* (CD163 KO) или частичен *knock out*, където само един алел на CD163 ген е модифициран.

Свинете са заразени с HAD₅₀ ASFV Georgia 2007/1 интрамускулно (IM). Клиничните признаци и телесната температура са наблюдавани два пъти дневно. Кръвните проби са взети на ден 0 и 3 след инфекцията (PI) чрез югуларна венепункция. При прекратяването на проучването са избрани три прасета от всеки CD163 генотип за аутопсия. След обстоен преглед тъканните проби, събрани от белите дробове, далака, сливиците и ингвиналните или мезентералните лимфни възли са тествани в тънки микросрези, направени с микротом.

Първичните култури на РАМ са събрани от белодробна промивка от WT и CD163 KO прасета и са култивирани в продължение на 2 дни, след което са инокулирани с вируса Грузия 2007/1.

След инфекцията цялостното поведение на животните рязко се променя от ден 0 до 3-ти ден. Прасетата от WT групата показват цианоза, средната телесна температура се повишава и достига до 41,0°C на 3-ия ден за двата генотипа. Налице е значителна разлика между средните стойности на изходните температури при 1 DPI (*days post infection*) и пиковите температури при 3 DPI ($p < 0.0001$). На 2 и 3 дни след инфекцията всички свине са лекувани с нестероидни противовъзпалителни лекарства (НСПВС), флуниксин, меглумин (банамин, 50 mg/mL). Проучването е прекратено на 4-ия ден поради появата на пирексия, анорексия, дехидратация и неспособността на прасетата да се повлияват от лечението с НСПВС. Като цяло, няма видима разлика в клиничните признаци между CD163 WT и KO прасетата. Острата треска и неочевидните клинични симптоми са в съответствие с хиперостра инфекция с ASFV (*Blome et al., 2013; Galindo-Cardiel et al., 2013*).

При прекратяване на проучването резултатите от патолого-анатомичната проверка показват умерена до тежка хеморагична конгестия и некроза на белите дробове, далака, ингвиналните и мезентералните лимфни възли. Дробовете са с оток. На микроскопско ниво е наблюдаван остър оток при голяма част от прасетата. Мултифокална лимфоидна некроза в бялата и червената пулпа са налице в далака на всички свине. Пробите от лимфните възли от пет от шестте прасета показват мултифокална некроза. Сливиците са предимно в нормални граници. Резултатите показват, че CD163 KO и WT са показали признаци, съответстващи на хиперакутна инфекция с ASFV, типична за изолата на Грузия 2007/1 (*Blome et al., 2013 г.; Galindo-Cardiel et al., 2013*).

Виремията е измерена в серумни проби, събрани от всички тестови животни 3 дни след инфекцията. Нивата на вируса варират от $1,6 \times 10^4$ до $1,6 \times 10^7$ HAD₅₀/mL в групата на WT прасета и 5×10^4 до $1,6 \times 10^7$ HAD₅₀/mL за CD163 KO прасета.

Предишни проучвания, които показват ролята на CD163 при инфекцията с ASFV, са извършени с първични макрофаги. Тези проучвания показват, че PAM (~76 %) са възприемчиви за инфекция с ASFV *in vitro* в сравнение с моноцити или прекурсорни клетки от костния мозък, а инфекцията положително корелира с експресията CD163 (*Sanchez-Torres et al., 2003*).

Част от проучванията показват, че ролята на CD163 в ASFV инфекцията е спорна. Предишно проучване от *Sanchez-Torres et al. (2003)* силно подкрепя теорията, че CD163 е необходим като рецептор за ASFV върху макрофагите. По-нататъшната работа на *Lithgow et al., 2014* обаче не успява да потвърди тази хипотеза. Въпреки това, тези отрицателни резултати не изключват CD163 като необходим основен рецептор. CD163 самостоятелно може да не е достатъчен за инфекция, но изисква съдействие от допълнителни макрофаг-специфични протеини. Резултатите от настоящото проучване ясно показват, че CD163 не е от съществено значение за инфекцията на PAM с грузинския изолат. Въпреки че това проучване и предишните обстойни трудове в областта оценяват инфекцията на PAM, трябва да се отбележи, че използваните щамове на ASFV се различават и не могат да бъдат сравнявани резултатите.

При липса на CD163 е правдоподобно да се допусне, че други повърхностни маркери могат да бъдат отговорни за постъпването на вируса. За да се потвърди или изключи тази хипотеза е използван алвеоларния макрофаг-специфичен повърхностен протеин CD169, като контрола. CD169 и CD163 обикновено са със сходни нива на повърхността на PAM от свине (*Whitworth et al., 2016*). Въз основа на резултатите от това проучване и предишната характеристика на PAM от CD163 трансгенни прасета, е открито, че повърхностната експресия на CD169 остава подобна на WT PAMs в отсъствието на CD163. Други повърхностни маркери за макрофаг-специфични протеини, включително CD14, МНС II и CD172, също са представени на сходни нива както за WT, така и за CD163 KO генотиповете свине (*Whitworth et al., 2016*).

Докато съществува подкрепа за рецепторно-зависими механизми за навлизане на вируса, като например ендоцитоза, медирана от клатрин (*CME*) (*Galindo et al., 2015; Hernaez u Alonso, 2010*), съществуват и доказателства, че ASFV може да използва механизми, които не са рецепторно медиранни, като макропиноцитоза (*Sanchez et al., 2012; Hernaez et al., 2016*). В проучване на *Hernaez et al. (2016)* се демонстрира, че и двата пътя, *CME* и макропиноцитоза, се използват от ASFV за влизане в клетките. Това проучване включва флуоресценция и преносна електронна микроскопия (*TEM*) за документиране на ранните събития по време на инфекцията на PAM. Доказано е, че пречистените вириони се комбинират с декстран, маркер за макропиноцитоза, както и с трансферин, маркер за *CME*, като 68% от вирионите са колокализирани с декстран. Допълнителна подкрепа идва от проучванията посредством *TEM*, които показват вирусни частици в макропиноцитозни процеси; малък процент от вириони също са открити в гъстите мембранни инвагинации. Химическите инхибитори на *CME* или макропиноцитозата инхибират ASFV навлизането в PAM (*Hernaez et al., 2016*). Въпреки това, ако ASFV използва макропиноцитоза като неспецифичен механизъм за влизане, тогава трябва да се включат и други вътреклетъчни макрофаг-специфични взаимодействия, които определят ASFV тропизма.

Въпреки че настоящото проучване изключва изискването за наличие на CD163 за инфекция с ASFV, липсата на CD163 при трансгенните прасета KO може да повлияе на гостоприемниковия отговор на инфекцията. Например, експресията на CD163 е свързана със субпопулация на макрофагите, описани като противовъзпалителни. Както CD163 експресията, така и поляризацията на макрофагите до M2 фенотип се предизвикват от интерлевкин (IL)-6, IL-10 и глюкокортикоиди (*Hoggeret al., 1998 г.; Buechler et al., 2000*). M2 регулаторните макрофаги са отговорни за вродените и за адаптивните имунни

реакции и изглежда играят имуносупресивна роля, като произвеждат високи нива на противовъзпалителния цитокин IL-10. CD163 е компонент на хаптоглобин/хемоглобина, който намалява възпалението, което произтича от оксидативен стрес (*Kristiansen et al., 2001*). Освен това продуктите, произведени от CD163-положителни макрофаги, действат като мощни противовъзпалителни съединения (*Jeney et al., 2002; Soares and Bach, 2009*).

Взети заедно, резултатите от това проучване показват, че CD163 не е от решаващо значение за инфекцията с ASFV на PAM или прогресията на заболяването при прасетата. Въпреки това, тъй като репликацията на ASFV се ограничава главно до макрофагите, е ясно, че други макрофаг-свързани протеини участват в тропизма на ASFV и могат да представляват важни цели за генетична редакция.

За ASFV инфекция при диви брадавичести свине, която се счита за нископатогенна и персистираща, са съобщавани няколко експериментални проучвания с диви свине, но нито едно от 11те тестови животни, инокулирани с ASFV, не е имало клинични признаци или лезии и животните са оцелели поне 33 дни, до което време вирусът е изчистен. За разлика от това, част от домашните прасета умират в рамките на 9-тия ден след инфекция. Това предполага, че вариациите във факторите за възприемчивост на гостоприемника между тези генетично сходни видове влияят върху резултатите от инфекцията. 15 нуклеотидни разлики, водещи до 3 аминокиселинни промени, са установени между дивите и домашните свине в гена *RELA*, който кодира основен компонент на *NF-KB* транскрипционния фактор. *NF-KB* семейството на транскрипционните фактори се състои от отделни комбинации от протеини, които имат критична роля в активирането на имунните клетки. Като такива те регулират реакциите на инфекцията, включително развитието на Т и В-клетки и предизвикват разнообразна гама от противовъзпалителни цитокини и антиапоптични протеини. По време на инфекцията, ASFV е насочен към *NF-KB* фактора за транскрипция на гостоприемника. Вирусният протеин A238L е хомоложен със свинския *iKbA* и може да замести този протеин, свързвайки се с *RELA* (p65) субединицата *NF-KB* и така намалява способността му да се активира. Следователно разликите при диви и домашни свине на този централен регулатор на вродените и адаптивните имунни реакции могат да представляват форма на адаптация, която допринася за липсата на клиника при диви свине, която се наблюдава при домашните свине. Тази хипотеза е подкрепена от *in vitro* сравнения на вариациите на модификации на *RELA* при диви и домашни свине, които показват, че въпреки че двете модификации са представени с равни нива, е демонстрирана по-ниска транскрипционна активност при диви прасета *RELA*. Това поражда твърдението, че въвеждането на трите вариационни аминокиселини от диви свине *RELA* в домашни свине може да доведе до известна устойчивост на инфекцията с ASFV.

Тъй като дивите и домашни свине не се кръстосват, единственият начин за постигане на подобни фини модификации е посредством генното редактиране, за да се позволи целенасоченото въвеждане на геномни или генетични промени, които иначе биха били трудни за постигане чрез конвенционалните методи. Такива подобрения върху животните са възможен начин за повишаване на резистентността към болести по свинете и получаване на **трансгенни устойчиви хибриди**. Повишената резистентност или устойчивостта на болести увеличава не само производителността и устойчивостта, необходими за задоволяване на хранителните нужди на нарастващата популация в световен мащаб, но също би подобрило хуманното отношение към животните.

В някои проучвания са докладвани жизнеспособни поколения трансгенни прасета, създадени, използвайки нуклеаза тип цинкови пръсти при редактиране на ембриони, с 2 или 3 заместени аминокиселини, които преобразуват алелите на домашните прасета *RELA* в тези аминокиселини, присъстващи при дивите свине.

Интрамускулното заразяване с *ASFV*, което води до стабилен и последователен модел на инфекция, е широко използван за *in vivo* проучвания. Предаването на *ASFV* при домашни свине обаче се осъществява главно чрез контакт с вируса чрез пряк контакт с животни или поглъщане на заразен материал, но съответно интрамускулният инокулационен път заобикаля много от имунните защити на гостоприемника и става ясно, че интраназалният метод на заразяване и по-успешен за последваща оценка на ефектите от редактирането на гените върху инфекцията с *ASFV* при домашни свине чрез редакция на трите аминокиселини на протеин *RELA*.

Оказва се, че дозата на заразяване с *ASFV* влияе за симулиране на инфекция и влияе на резултатите от генетичната редакция. Тъй като вирусната доза може да повлияе на дела на заразените животни и е изследвана оптималната интраназална доза за щам *Ken05/Tk1*, предишни проучвания показват, че доза от 10^2 HAD₅₀ може да не заразява висок процент от животните, докато инфекцията със 10^6 HAD₅₀ е довела до кратко време на преживяемост. За идентифициране на доза, инфектираща висок процент животни, но с по-лека степен и по-бавна прогресия на заболяването, са определени ниски, средни и високи дози интраназални заразявания.

Клинични признаци на повишена температура, летаргия и намален апетит са наблюдавани при няколко животни, които получават най-висока доза 5 дни след инокулацията (dpi). Признаци са наблюдавани при две други животни в тази група от dpi 6/7. Клиничните картини впоследствие се повишават при тези животни, които са евтаназирани между 9 и 12 dpi. Не са наблюдавани клинични признаци при останалите животни в тази група.

Повишена температура, летаргия, намален апетит и еритема първоначално са наблюдавани при няколко животни в групата със средна доза на вирусно заразяване в 7 dpi. Клинични признаци първоначално са наблюдавани при останалите животни, ваксинирани със средна доза на 13, 15 и 17 dpi. След това болестта се развива бързо при тези животни, които са били евтаназирани 3 или 4 дни след появата на болестта. Повишаването на ректалната температура съответства на други клинични признаци. Повишаването на теллото също съответства на клиничната картина и температурните наблюдения със спиране или намаляване на повишаването на теллото от началото на клиничните признаци. Животните, заразени експериментално с най-ниската вирусна доза, остават здрави по време на експеримента и продължават да наддават на телло. Вирусната ДНК не е открита при животни от тази група. Тази инокулирана доза е твърде ниска, за да се инфектират тези животни интраназално.

Всички животни, заразени с най- високата доза, са положителни за *ASFV* ДНК на 5 dpi. Вирусната ДНК в кръвта на тези животни бързо достига високи нива, съвпадайки с бързото развитие на клинични признаци.

При аутопсия всички свине от групата, заразени с висока доза, са имали високи нива на вирусна ДНК и всички са имали лезии, характерни за *ASF*, като цианотични области по кожата, асцит, конгестивни дробове с интерстициален и алвеоларен оток, лимфаденит с петехиални кръвоизливи в лимфните възли и петехиални кръвоизливи в бъбреците.

Свинете, заразени със средна доза, са евтаназирани между 13 и 20 dpi. Животните имат макроскопични лезии, характерни за *ASF*, подобни на наблюдаваните в групата с високи дози. Хеморагичен лимфаденит например не се наблюдава при всички тестови животни.

За да се прецени дали промяната на аминокиселините в *RELA* на домашните свине е дала устойчивост на инфекцията с *ASFV*, животни с 2 или 3 аминокиселини редакции (2aa или 3aa) и съответстващите контроли на дивите видове са инокулирани интраназално със същия *ASFV Ken05/Tk1*, т.е. $1,4 \times 10^4$ HAD₅₀ на прасе.

Клинични промени първоначално са наблюдавани в групата 3aaa, която има тежка диария, намален апетит и летаргия на 4 dpi и е лекувана с рехидратираща терапия. След това са наблюдавани признаци между 5 до 7 dpi, при почти всички животни в групата 2aaa и някои в групата WT.

За да се прецени дали аминокиселинната промяна в *RELA* влияе на противовъзпалителния отговор на гостоприемника към *ASFV*, серумните нива на цитокин на IL8, TNF-а, IL1-3 и IL-6 са също оценени. Цитокиновата реакция е променлива при различните животни и относително ниска, като увеличението съответства на прогресия на клиничното заболяване, което се наблюдава само при някои животни от всяка група. Няма ясни индикации, че 2 или 3 аминокиселинни промени в рамките на *RELA* са повлияли на реакцията на гостоприемника към инфекцията с *ASFV* за някой от тези провъзпалителни цитокини.

Както е наблюдавано и при първоначалното проучване, общият брой левкоцити не показва, че левкопенията е свързана с развитието на клинично заболяване. При животни обаче е наблюдавано понижаване на лимфоцитите от 3 dpi нататък и се приближава или намалява под 50000 клетки/ml при животни, които са били евтаназирани между 9 и 12 dpi.

При аутопсията всички прасета са имали макроскопични лезии, характерни за ASF, както е описано в пилотния експеримент. Статистическият анализ на макроскопските резултати не показва значителни разлики между експерименталните групи.

Опустошителното разпространение на генотип II *ASFV* в свиневъдния сектор по целия свят и продължаващото присъствие на други генотипове в Африка и Сардиния, подчертават необходимостта от по-големи изследователски усилия за намиране на възможности за контрол на това заболяване. Такива изследвания изискват набор от подходящи и добре характеризирани *in vivo* животински модели за оценка на методите за борба с инфекциите особено за методи като генното редактиране. Ето защо в тези обстоятелни проучвания върху генно редактираните прасета се включва характеризиране на клиничните, вирусологичните и патологичните параметри, предизвикани от по-малко вирулентен генотипен щам *Ken 05/Tk1* на *ASF* вируса. Изолатът се счита за умерено вирулентен, тъй като процент от животните са успели да оцелеят след интрамускулно заразяване, с доза 10HAD₅₀, поне 70 дни.

Дозата, необходима за причиняване на инфекция по естествен път, е важен параметър за рисковите модели на предаване и тези данни предоставят допълнителна информация за дозата, необходима за заразяване на експериментални животни чрез различни преносни пътища.

Технологията за създаване на животни с редактиран геном, включително трансгенни прасета, се развива бързо и представлява потенциален метод за подобряване на резистентността на продуктивните животни към болести. Много генни редакции към целеви клетъчни рецептори са доказан потенциално ефективен метод за блокиране на вирусното навлизане и предотвратяване на репликацията и инфекцията. За съжаление, това, което действа при едно заболяване, може да не работи срещу друго, особено ако вирусите използват различни клетъчни рецептори. Насочването към имунната защита на гостоприемника, като например *НФ-КВ* главния регулатор на възпалителните реакции представлява също алтернативна стратегия за отглеждането на трансгенни животни с подобрени способности за справяне с редица инфекциозни заболявания.

Не са установени ясни разлики в параметъра, измерен между дивите животни от тип 2aa и трансгенните животни, съдържащи заместители на T448A и S485P, което показва, че тези две разлики в протеина от диви прасета *RELA*, които могат да участват

във взаимодействията в рамките на транскрипционния комплекс, не оказват пряко влияние върху резултата от *ASFV* инфекцията. Допълнителната замяна S531P при животните от групата 3а се намира в областта на трансактивация 1 на *RELA* и се очаква да се подложи на фосфорилиране. Преходната трансфекция на клетки от репортери NF-KB-луцифераза с варианти *RELA*, съдържащи индивидуални заместители на аминокиселините, показва, че по-голямата част от намалената активност на транскрипция, наблюдавана за дивия тип *RELA* се дължи на промяната на тази позиция. За съжаление обаче всички животни с трите заместители на аминокиселините развиват клинични признаци на *ASF*, след или директно заразяване или по-късно при контактна инфекция. Поради това тези 3 промени са недостатъчни, за да се повиши степента на устойчивост на инфекцията, наблюдавана при диви свине и в опит да бъде пренесена върху домашни свине. Все пак част от опитните животни показват леко забавяне на клиничните признаци и по-ниски нива на вирусна ДНК в кръвта и при някои от тези животни се развива по-скоро субакутно, отколкото остро заболяване. В заключение, не са документирани ясни корелации между промените в *RELA* и индукцията на провъзпалителни цитокини в отговор на *ASFV* инфекция, което може да означава, че модуляцията на провъзпалителния отговор не участва в това потенциално забавяне на репликацията на вируса. Нивото на индукция на тези цитокини обаче е относително ниско дори при дивите животни, което може да е отражение на умерената вирулентност на тестовия щам. Ще бъдат необходими допълнителни изследвания, за да се установи въздействието на промените в *RELA* върху вариабилната имунна реакция на медиранни NF-KB.

Няма значимо намаляване на лезиите след смъртта, което показва, че всяко предимство, което може да намали ранните клинични признаци или вiremия, не е свързано с промените на органите по време на евтаназията. Също така не е наблюдавано подобно забавяне на признаците или намаляването на вирусните натовавания при контактните заразени животни, което показва, че тези промени в *RELA* не са в състояние да намалят вирусната репликация след контактна инфекция и че всеки ефект е от значение само при инфекции с ниска доза в началото на инфекцията. Промените в *RELA* при диви свине имат потенциала да повлияят на реакцията на гостоприемника към *ASFV* по различни начини. Намалената базална транскрипционна активност на *RELA* от диви свине, демонстрирана от *Palgrave et al. (2011)* може да промени модела на експресия на огромен брой гени в различни тъкани, което може да доведе до потенциално предимство за гостоприемника и може да обясни намалените клинични признаци.

Недостатък на устойчивите на болести трансгенни животни е, че те могат да са вирусни междинни гостоприемници, но да не покажат никаква клиника или симптоматика или да имат слаби клинични признаци. Това би направило ранното откриване и бързия контрол на огнищата на болестите по-трудно и дългосрочно.

Вирусът на класическата чума по свинете (*CSFV*) също е високопатогенен за животните и води до тежко заболяване, нанасящо огромни икономически загуби. Стратегиите за контрол на *CSFV* се състоят главно от систематична политика за профилактична ваксинация и политика за премахване на неваксинацията. През 2016 г. 22 държави официално съобщават за задължителни кампании за ваксинация (*OIE WAHIS*). Задължителната ваксинация е настоящата политика и в Китай и обхватът на ваксинацията трябва да бъде над 90% по всяко време на годината в популацията на свинете.

CSFV принадлежи към род *Pestivirus* от семейство *Flaviviridae*. *CSFV* е обвит вирус, който притежава едноверижен положителен 12,3 kb РНК геном, който съдържа

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



дълга отворена рамка за четене, която кодира полипротеин от 3898 аминокиселини. Кои пост-транслационната обработка на полипротеина от клетъчни и вирусни протеази води до разцепване на полипротеина до отделни протеини, включително четири структурни протеина (С, Erns, E1 и E2) и осем неструктурни протеина (Npro, р7, NS2, NS3, NS4А, NS4В, NS5А и NS5В). Класическата чума по свинете (CSF) има огромно въздействие върху здравето на животните и свинепроизводството. CSFV може да се предава както хоризонтално, така и вертикално, и домашните прасета и дивите свине са силно податливи на заразяване с CSFV. CSFV може да причини тежка левкопения и имunosупресия, което често води до вторични чревни или респираторни инфекции. Вродената инфекция с CSFV може да доведе до трайно заразени животни, които не развиват специфични антитела срещу вируса. Това вероятно се дължи на имунотолерантност, развита по време на феталната диференциация на лимфоцитите. Заразените животни непрекъснато отделят вирус и са потенциален източник на нови огнища на CSF, както и създават проблеми при диагностицирането.

Инфекциите с високо вирулентни щамове на CSFV показват по-малко зависимости от възрастта клинични картини и могат да доведат до 100% смъртност във всички възрастови групи на животните и тежки неврологични признаци в рамките на 7 до 10 дни. Икономическите загуби, причинени от огнища в Холандия например, през 1997 г., възлизат на 2,3 милиарда щатски долара и над 11 милиона прасета са убити.

Когато прасетата са заразени с щамове CSFV, които са разпространени в Европа, те се разболяват тежко и до 90% умират в рамките на 4 седмици след заразяването. Освен това заразено свинско месо е опасен източник на разпространение на CSF. Въпреки усилията на много държави да ерадикират болестта сред популациите домашни свине, болестта остава широко разпространена в някои региони, което подчертава необходимостта и неотложността от разработването на по-ефективни подходи за изкореняване на CSFV. Алтернативна стратегия е да се развият трансгенни (TG) прасета, които са генетично устойчиви на CSFV инфекция. Бързото развитие на технологиите за редактиране на генома улеснява проучванията, които изследват специфични генни функции и създаването на устойчиви животински модели. Наскоро създаването на генетично модифицирани животни с вирусна резистентност посредством универсалната CRISPR/Cas9 система е проследено от няколко изследователски колектива. RNAi е естествен механизъм за заглушаване на гени след транскрипция и от откриването си RNAi се разглежда от вирусолозите като обещаващ метод за потискане на вирусната инфекция. Към днешна дата броят на докладваните RNAi-базирани проучвания за потискане на CSFV *in vitro* е голям и тези проучвания предполагат, че може да се развият свине shRNA-TG, които са устойчиви на вирусното предизвикателство. В проучване на тема „*Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus*“ на изследователски екип: *Zicong Xie, Daxin Pang, Hongming Yuan, Huping Jiao, Chao Lu, Kankan Wang* и екип, целта е да се комбинират технологията CRISPR-Cas9 и RNAi, за да се генерират TG прасета с включване на определена антивирусна shRNA и след това да да бъде оценена трансгенната резистентност на тези прасета към CSFV инфекция.

Първо са подбрани малки интерферентни РНК (siRNAs), които биха могли ефективно да инхибират CSFV. Десет siRNAs са проектирани и индивидуално инокулирани в PK-15 клетки чрез електропорация. На 72-рия час след инфекцията ефективността на вирусната инхибиторна активност на тези siRNAs се оценява чрез qPCR и индиректна имунофлуоресценция (IFA). От тези siRNAs, siRNA-C3 и siRNA-C6 показват по-висока антивирусна способност. След това се определя дали CSFV може да се инхибира в клетки, стабилно експресиращи siRNA-C3 и siRNA-C6. За тази цел тези две siRNAs са клонирани поотделно в *miR30 backbone* и образуват две единично експресиращи се shRNA таргени вектори. Участъка *knock-in* е локализиран в първия

интрон, а ендегенният *pROSA26* промотор се използва за експресия на антивирусния shRNA ген. След това тези два shRNA насочени таргетни вектори са подложени отделно на електропорация във свински фетални фибробласти (PFFs) с CRISPR/Cas9 вектор, shRNA *knock-in* PFF са избрани с подходящ метод и събитията *knock-in* са потвърдени чрез PCR със специфични праймери и последващо геномно секвениране по *Sanger*. След това PFF са инокуирани с *CSFV* и 72 часа след инфекцията антивирусните способности на тези PFF линии са изследвани чрез qPCR.

Подобно на експериментите, включващи преходно трансфектирана siRNA, резултатите от вирусното натоварване показват, че тези *knock-in* PFF линии могат ефективно да инхибират *CSFV* в сравнение с контролните PFF. И накрая, експресията на антивирусни siRNAs е открита чрез RT-PCR и допълнително потвърдена чрез секвениране. Освен това, е подбрана shRNA PK-15 клетъчна линия, която е по-податлива на *CSFV* инфекция. Както се очаква, анализът на вирусното натоварване на тези PK-15 клонинги показва сравнима антивирусна способност с тази на PFF клонингите. Тези резултати потвърждават очевидната роля на shRNA в инхибирането на репликацията на *CSFV* в тези клонирани клетъчни клонове на shRNA.

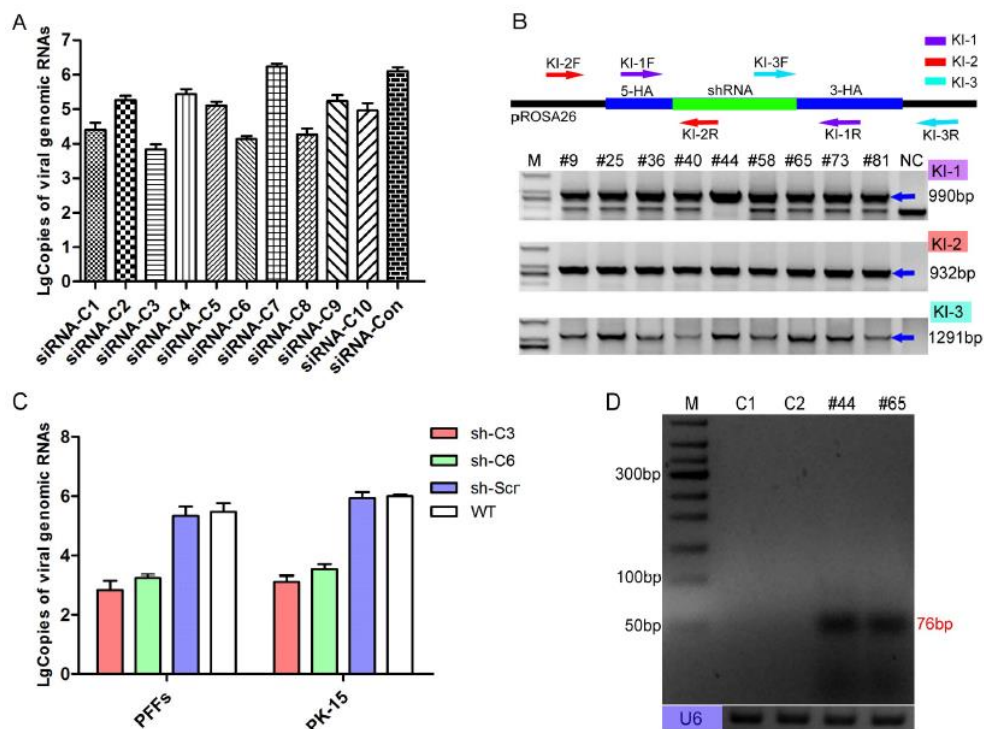
За да се оцени потенциалната токсичност, причинена от shRNA и по-нататъшната осъществимост на генерирането на TG прасета чрез SCNT, тези две shRNA *knock-in* PFF линии са използвани като донорски клетки за SCNT. Резултатите показват, че скоростта на развитие на бластоцитите е сходна между групата на TG и групата от див тип (WT), което предполага, че тези PFF могат да бъдат използвани допълнително за генериране на анти-*CSFV* TG прасета чрез SCNT.

Name of siRNA	Sense(5'-3')	Antisense(5'-3')
siRNA-C1	ACAGGUUACAGAAUAGUAGAUtt	AUCUACUAUUCUGUAACCUGUtt
siRNA-C2	CUCUCUGGUUGUUCUGUCUGAtt	UCAGACAGAACAACCAGAGAGtt
siRNA-C3	ACACUGUGACAGACUAUGUAAtt	UUACAUAGUCUGUCACAGUGUtt
siRNA-C4	CAGAGUCAGUAUACCAGUAUAtt	UAUACUGGUAUACUGACUCUGtt
siRNA-C5	CCGACUGAUUGAAUUGGUACAtt	UGUACCAAUUCAAUACAGUCGGtt
siRNA-C6	GAACCCUGAAGUGGAAUAGCCtt	GGCUAAUCCACUUCAGGGUUCtt
siRNA-C7	AGUGGCAACCAUCUAGGCCCGGtt	CCGGGCCUAGATGGUUGCCACUtt
siRNA-C8	CCUGUACAUAUCAACUACGCAAtt	UUGCGUAGUUGAAUGUACAGGtt
siRNA-C9	ACCCGAGUUAGAGUCCUCCUAtt	UAGGAGGACUCU AACUCGGGUtt
siRNA-C10	GCCUACCAAUUUGAUGAU AUUtt	AAUAUCAUCAAUUGGUAGGCtt
siRNA-Con	CCAUGUGAUUUUGUUGUAAUtt	AUUAACAACAAAAUCACAUGGtt

Таблица 1: siRNA секвенции

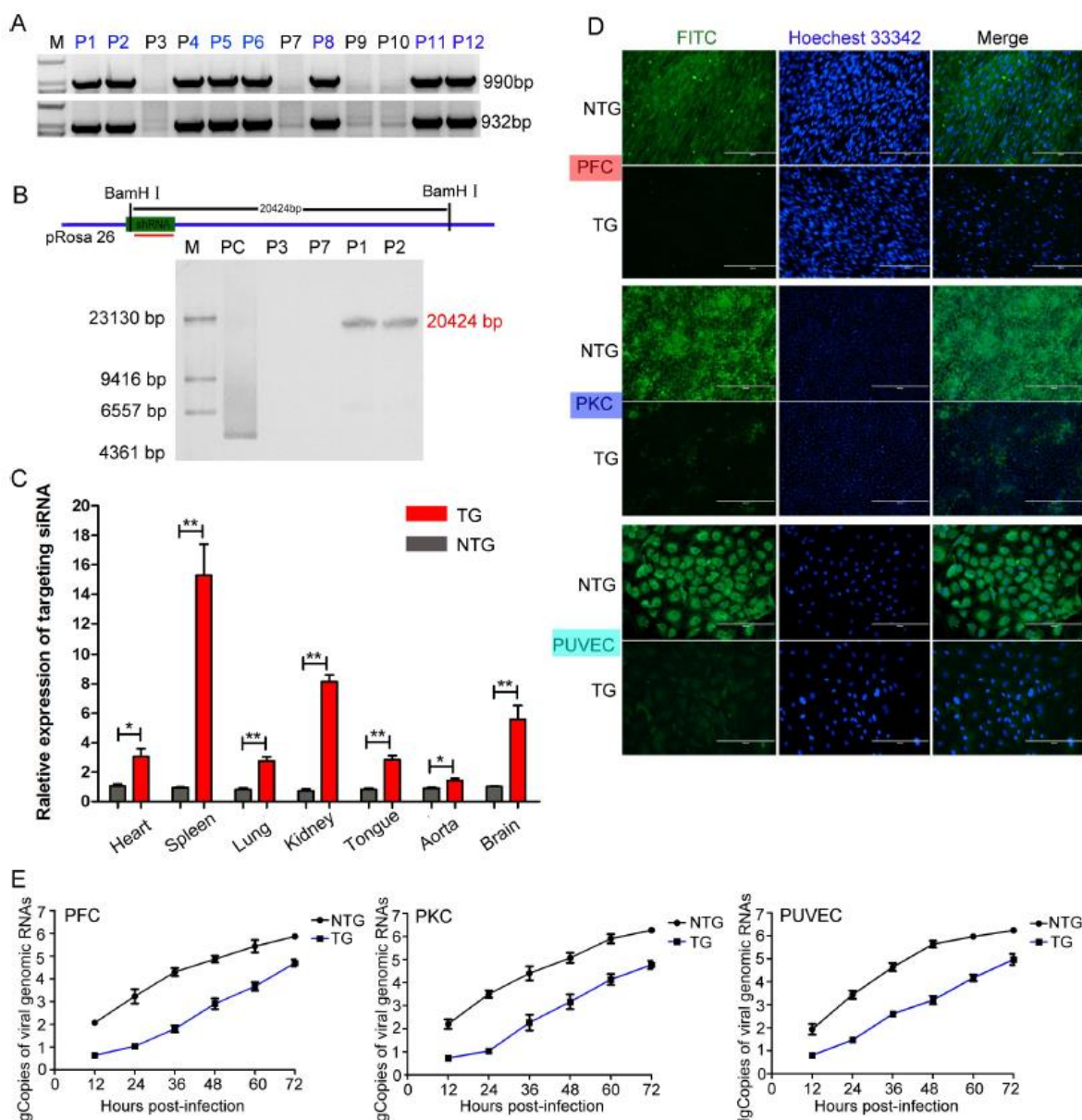
След това геномно редактирани ембриони са прехвърлени в сурогатни свине-майки и 8 женски TG прасета и са успешно получени от същия PFF клетъчен клон (shRNA-C3) 12 новородени. *Southern blotting* и *qPCR* са настроени да изследват дали shRNA генът е бил вмъкнат в предварително определения локус в генома и броя на копията на трансгена. Резултатите потвърждават специфичната за мястото интеграция на антивирусна shRNA в TG прасетата. В съответствие с модела на експресия на промотора *pROSA26*, допълнително е потвърдено относителното ниво на експресия на целевата siRNA в различните тъкани и изолирани клетки от TG прасетата. След това, за да се изследва дали изолираните TG клетки от TG прасетата могат да бъдат достатъчно ефективни за инхибиране на *CSFV* инфекция, три различни вида първични клетки са отделно изолирани от TG прасета и NTG прасета. След това тези TG клетки са инокуирани с *CSFV* и 72 часа след инфекцията, резултатите показват, че тези изолирани TG клетки могат значително да намалят *CSFV* в сравнение с NTG

клетки. Освен това характеристиките на репликация на *CSFV* в клетките TG и NTG са оценени в многостепенна крива на растеж.



Фиг. 12: Lg от броя копия на вирусната РНК при различните модификации. Избор на антивирусни клетъчни клонове. (А) Намалването на репликацията на вирусен геном в siRNA-трансфектирани клетки е допълнително оценено чрез PCR в реално време на 72 h постинфекция.

Когато родителските линии TG са полово зрели, при кръстосване на TG със свине WT в поколение F1 са получени 11 жизнеспособни прасенца. От тези прасенца 6 са TG потомци и 5 са NTG. TG прасетата притежават стабилен брой копия на гена на shRNA, нормален диплоиден хромозомен набор ($2n = 38$) и нормално тегло при раждане. Важното в проучването е, че е направено сравнение на нивото на експресия на целевата siRNA между първичните родителски TG и техните TG поколения и резултатите показват, че няма значителна разлика в нивото на експресия на shRNA между TG от поколение F0 и F1. Освен това, резултатите от изследванията за вирусно натоварване показват, че антивирусната способност на родителските TG клетки е подобна на тази на техните TG клетки на поколение F1. Заедно тези констатации сочат, че TG прасетата могат да проявят по-силно инхибиране на *CSFV* инфекция от свинете NTG и че антивирусната способност, базирана на RNAi, може да бъде стабилно предавана на поколенията.

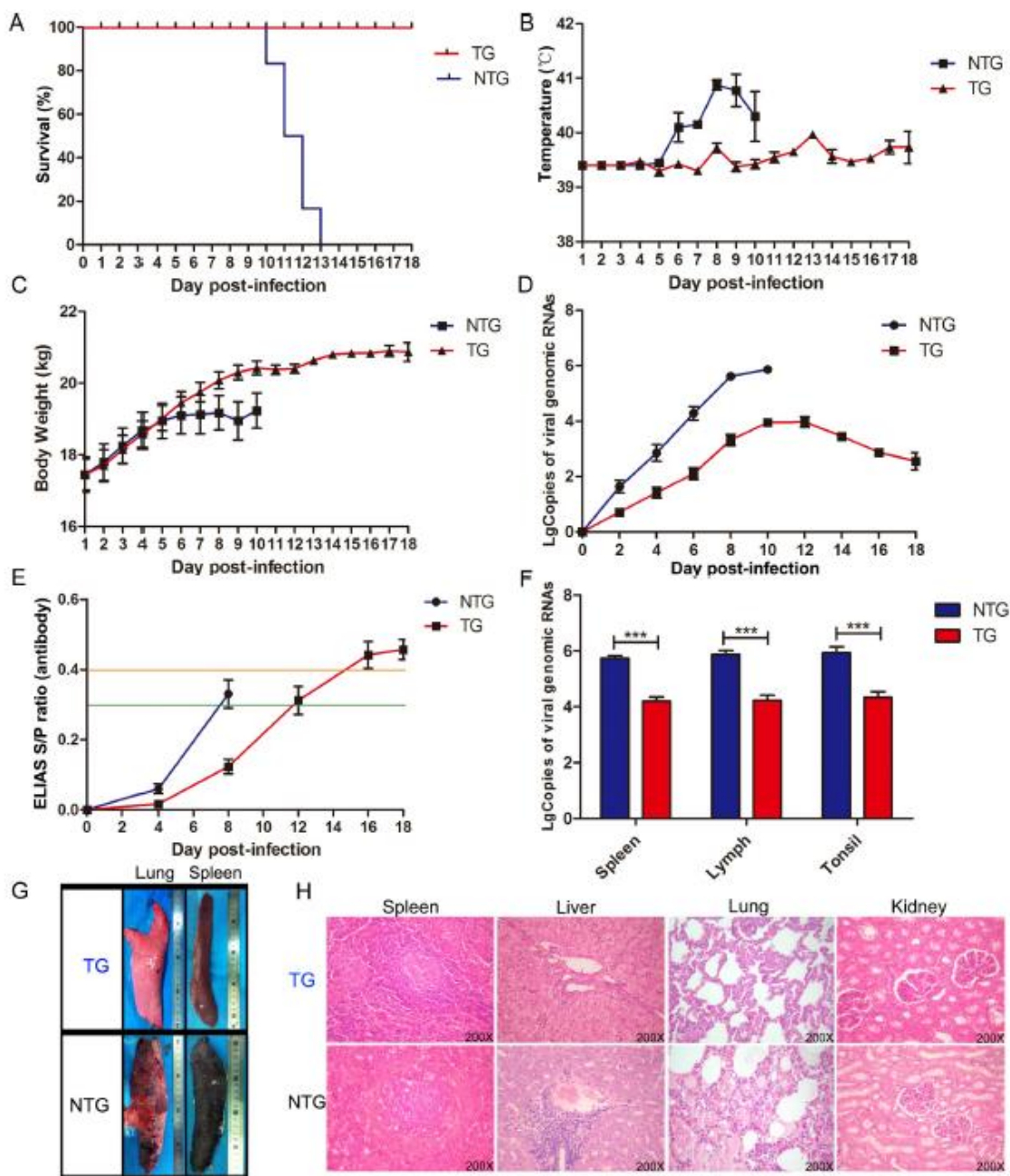


Фиг. 13: Генериране на F0-поколение TG прасета, експресиращи насочената siRNA. (A) Геномен PCR анализ на F0-поколенията за идентифициране на TG прасета. P1, P2, P4, P5, P6, P8, P11 и P12 означават TG прасета, а P3, P7, P9 и P10 означават NTG прасета. M: D2000. (B) Схема за южно попиване. Сигналите за хибридизация показват, че генът shRNA е успешно интегриран в локуса pRosa26 в TG прасетата. M: Създавател на ДНК. PC: плазмид с положителен контрол. P3 и P7 означават NTG свине, а P1 и P2 означават TG свине. (C) Относителните нива на експресия на таргетната siRNA в различни тъкани и органи от TG прасета бяха определени чрез qPCR.

Резултатите показват, че всички прасета с NTG са развили типични признаци на CSFV инфекция, смъртността е 100%. Въпреки че CSFV-свързани клинични симптоми се наблюдават и при TG прасета, те не са сериозни и нивата на вируса в кръвта са пониски при TG прасетата, отколкото при NTG свинете. Още 1 ден след инфекцията (dpi), всички инжектирани прасета с NTG-In са развили неадекватност, летаргия и тежки симптоми на диария и треска. Двете инжектирани прасета с NTG-In умират директно от инфекцията при 7 dpi, а всички прасета с NTG умират между 10 и 13 dpi. За разлика от

това, всички прасета TG са останали живи до евтаназия. Освен това са изследвани телесните температури и дневното телесно тегло на тези заразени тестови прасета. В сравнение с TG прасетата, тези NTG прасета показват по-тежки симптоми на треска и по-бавно наддаване на тегло. Освен това, кръвни проби са събирани на всеки 2 дни, за да се анализират динамичните характеристики на вируса при тези заразени прасета. Забележително е, че нивата на вирусна РНК са били по-високи при свинете NTG, отколкото при свинете TG, което предполага, че свинете TG могат ефективно да променят динамичните характеристики на вирусната инфекция. Отговорът на антителата при заразените прасета е измерван допълнително на всеки 4 дни до 16-ия ден, резултатите показват, че отговорът на антителата при NTG прасетата е по-висок от TG групата. По-важното е, че в сравнение с NTG прасетата, отговорът на антителата при TG прасетата се забавя с 4 ~ 5 дни. Междувременно, в сравнение с NTG прасетата, учените откриват, че вирусната РНК поддържа по-ниски нива на експресия в чувствителни към CSF тъкани от прасетата TG. Освен това е установено, че средните времена до първоначалната клинична проява, свързана с CSFV, за NTG и TG са съответно 4 и 8,5 дни. В допълнение е направен и патохистологичен анализ на евтаназираните прасета. Хистопатологичните промени в тези тъкани са потвърдени чрез оцветяване с хематоксилин/еозин (HE). Заедно тези резултати от проучването показват, че има значителни разлики в типичните признаци на CSFV протичаща инфекция и смъртността между TG прасета и NTG свине по време на вирусно натоваване, което предполага, че антивирусната стратегия може да ограничи растежа на CSFV при TG свине.

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



Фиг. 13: Поколение на прасета TG от поколение F1. (A) Снимките показват едно от прасенцата TG от поколение F1. (B) Случайните събития при новородени прасенца TG са потвърдени чрез PCR. Прасета 0042, 0047, 0049, 0050, 0058 и 0059 са прасета TG, а прасета 0041, 0044, 0045, 0060 и 0061 са NTG. (C) Относителни нива на експресия на насочената siRNA във F0- и F1-трансгенни клетки се сравняват чрез qPCR. (D) Резултатите от qPCR показват относителната експресия на вирусна РНК в NTG клетки, F0-поколение TG клетки и F1-поколение TG клетки.

CSF е една от икономически най-важните инфекциозни болести, засягащи свинете в световен мащаб. Поради своята икономическа значимост, интензивни стратегии за контрол на CSFV се прилагат в продължение на няколко десетилетия, но болестта все още е в списъка на OIE (OIE 2017). Има няколко възможни причини за неуспеха да се премахне болестта: (а) вирулентността на CSFV е сложен и

многофакторен въпрос, който не е напълно дефиниран; (б) трябва да се вземат предвид въздействията на географските фактори, климата, националната политика и информираността на хората за елиминиране на тези заболявания; в) ограниченията на настоящите търговски ваксини; г) контролът върху резервоарите от диви свине е значително предизвикателство. Освен това едностранчивостта на стратегиите за контрол, базирана на ваксинацията, също може да бъде допринасящ фактор. Следователно има още дълъг път към напълно елиминиране на вируса. Като алтернатива отглеждането на прасета резистентни към *CSFV* чрез стратегия за редактиране на генома може да бъде по-директен и ефективен подход. Това би улеснило постоянното въвеждане на нови черти на устойчивост на болести в масовата популация на домашни свине чрез конвенционални техники за разплод.

Сравнително скоро разработените програмируеми технологии за редактиране на генома (PGE), като TALEN и CRISPR/Cas9, са широко използвани за производството на TG животни. Много стратегии за редактиране на гени могат да бъдат използвани в промишленото свиневодство, които да осигурят устойчивост на животните на вирусни заболявания. В сравнение с други антивирусни стратегии, RNAi технологията има някои явни предимства. Например, независимо от други ефекти (например модификацията на вирусните рецептори може да повлияе на нормалните физиологични и биохимични функции и тези модифицирани рецептори могат да бъдат уязвими на инвазия от други заболявания), RNAi технологията има гъвкавостта да бъде насочвана към един или повече локуси, които са напълно запазени и които са от съществено значение за репликацията и разпространението на вируса или неговите серотипове. Въпреки успеха на всички тези мащабни проучвания, експерименталните изследвания на RNAi-медираните анти-*CSFV* са главно *in vitro* и дали проникването на shRNA при прасета може да осигури трайна резистентност срещу *CSFV* инфекция, остава все още неясно.

В доста от проучванията успешно са създадени прасета, устойчиви на *CSFV* чрез CRISPR/Cas9-базирана технология за редакция. Резултатите от *in vitro* и *in vivo* вирусните натоварвания показват, че тези TG прасета показват по-висока устойчивост на *CSFV* инфекция, отколкото нетрансгенните (NTG) свине и придобитата RNAi-базирана антивирусна способност при тези родителски TG може да бъде стабилно предавана на техните поколения от F1. Въпреки че степента и тежестта на клиничните признаци и вiremия са по-ниски при прасетата TG, отколкото при свинете NTG, някои клинични признаци и вiremия все пак се появяват при прасетата TG. Това води до хипотезата, че създаването на TG прасета, комбинирано с други антивирусни стратегии (систематична профилактична ваксинация, кръстосване с други видове анти-*CSFV* прасета, въвеждане на нови анти-*CSFV* характеристики и др.) могат допълнително да подобрят антивирусната способност на животните.

Антивирусният shRNA ген при TG свине се задвижва от ендогенния промотор *pRosa26*, който е подходящ за стимулиране на екзогенна експресия на гени по последователен и стабилен начин чрез избягване на ДНК метилиране. Тази стратегия ще подпомогне и стандартния подход на ваксинацията. Имунизацията на прасета осигурява ефективна защита срещу *CSFV*, а индуцирането на пълна имунна защита отнема най-малко 7 дни. В проучванията е документирано, че свързаните с *CSFV* клинични симптоми започват да се проявяват при TG прасетата на 4 ~ 5 ден и времето е значително забавено в сравнение с това при свинете NTG. Тези открития предполагат, че тези трансгенни прасета може да имат повече време да развият защитен имунитет и да се борят с вируса.

Освен това геномът на *CSFV* е едноверижна РНК с положителен заряд и функционира както като транспортна РНК (mRNA), така и като шаблон за репликация

или информационна РНК. Тези TG прасета и трансгенната стратегия може да осигури някои атрактивни ресурси за учените и ще им помогне да разберат и изучат по-добре RNAi. В обобщение, комбинираното приложение на CRISPR/Cas9 и RNAi при генерирането на TG свине е обещаващ метод за справяне с вирусните инфекции. Все повече доказателства има в научната литература, че TG прасета могат да ограничат репликацията и разпространението на CSFV *in vivo* и *in vitro* и че признаците на устойчивост на болести при родителските TG могат да бъдат стабилно предадени на техните поколения F1. Използването на тези TG свине може да подобри благосъстоянието на добитъка и значително да намали свързаните с CSFV икономически загуби.

Заключение:

Както е описано по-горе, трансгенните прасета могат да бъдат създадени чрез различни технологии с по-ниски разходи и по-кратки срокове, което много обещава да ускори генетичните подобрения при свинете. Особено количествените признаци, които се определят от мутилокуси, също могат да бъдат модифицирани чрез редактиране на генома. Предизвикателствата тук обаче са до каква степен генното инженерство ще бъде приложено в свиневъдството и как то се съчетава с конвенционалното развъждане. Съобщава се, че комбинирането на програми за конвенционално развъждане със стратегия за генно инженерство би подобрила селекцията (*Jenko et al. 2015*). Вероятно **генното инженерство ще допълни, вместо да замени** или наруши напълно конвенционалната развъдна програма. Друго предизвикателство, пред което са изправени учените е, че са идентифицирани малко полезни за селското стопанство гени, а откриването на нови маркери и гени, които оказват значително въздействие върху важни селскостопански признаци, е много по-трудно преодолимо препятствие. Въпреки това, с нарастващата способност за секвениране, четене и интерпретиране на генома, (*Groenen et al. 2012*), се очаква, че ще бъдат разкрити повече геномни маркери, контролиращи генетичните вариации в икономически важни фенотипни характеристики при свине.

Генното инженерство е алтернативна линия на разследване, която обещава постигането на резултати далеч по-бързо от традиционните селективни подходи за животновъдство.

Макар заразяването на експериментални прасета с умерено вирулентен щам на вируса на ASF да не е дало категорични резултати в полза на генното редактиране и генната редакция да не предпазва прасетата от развитие на смъртоносна ASF, то подходът за модифициране на вирусните рецептори е използван за отглеждане на жизнеспособни трансгенни прасета, които са напълно устойчиви на генотипове на свински репродуктивен и респираторен синдром (PPRS), като е използвана системата CRISPR/Cas. Тези успехи дават тласък на опитите за генно инженерство на устойчиви на ASF свине. В защита на новите техники за редактиране на генома, все повече доказателства има, че TG прасета могат да ограничат репликацията и разпространението на CSFV *in vivo* и *in vitro* и че признаците на устойчивост на болести при родителските TG могат да бъдат стабилно предадени на техните поколения F1. Използването на тези TG свине може да подобри благосъстоянието на добитъка и значително да намали свързаните с CSFV икономически загуби.

Въпреки че не всички усилия и проучвания за редактиране на генома при свине се оказват успешни подходи за ограничаване на въздействието на вирусите, те могат да бъдат ценен път, който да се следва успоредно с усилията за разработване на ваксини.

Колкото и обнадеждаващи обаче да са тези резултати, **по-дългосрочни и широко обхватни проучвания са необходими за да бъдат наблюдавани абсолютно всички фактори, които биха повлияли върху вирусната репликация, развитието на вируса, благосъстоянието и здравето на животните и ефектите от тези генни редакции върху самите животни или върху човека**, посредством консумация на храна от такъв тип трансгенни животни. Трябва да се **оценят всички рискове, свързани с употребата на тези нови технологии като генното редактиране и как те влияят и върху биоразнообразието в природата**, за да може след време да бъдат внедрени тези технологии в промишлеността.

Използвана литература:

- Development of a highly effective African swine fever virus vaccine by deletion of the I177L gene results in sterile immunity against the current epidemic Eurasia strain. - Manuel V. Borca, Elizabeth Ramirez Medina, Ediane Silva, Elizabeth Vuono, Ayushi Rai, Sarah Pruitt, Lauren G. Holinka, Lauro Velazquez Salinas, James Zhu, and Douglas P. Gladue
- African Swine Fever Virus: An Emerging DNA Arbovirus - Natasha N. Gaudreault, Daniel W. Madden, William C. Wilson, Jessie D. Trujillo and Juergen A. Richt
- Recoding structural glycoprotein E2 in classical swine fever virus (CSFV) produces complete virus attenuation in swine and protects infected animals against disease - Lauro Velazquez-Salinas, Guillermo R. Risatti, Lauren G. Holinka, Vivian O'Donnell, Jolene Carlson, Marialexia Alfano, Luis L. Rodriguez, Consuelo Carrillo, Douglas P. Gladue, Manuel V. Borca
- Attempts at the development of a recombinant African swine fever virus strain with abrogated EP402R, 9GL, and A238L gene structure using the CRISPR/Cas9 system - Grzegorz Woźniakowski, Natalia Mazur-Panasiuk, Marek Walczak, Małgorzata Juskiewicz, Maciej Frant, Krzysztof Niemczuk
- Complete Genome Sequence of a Lineage IV Peste des Petits Ruminants Virus from Turkey, 2018 - Sabri Hacıođlu, Simon King, Sirin Gülsün Çizmeci, a Öznur Yesil, John Flannery, Michael D. Baron, Carrie Batten, Paulina Z. Rajko-Nenow
- Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus - Zicong Xie, Daxin Pang, Hongming Yuan, Huping Jiao, Chao Lu, Kankan Wang, Qiangbing Yang, Mengjing Li, Xue Chen, Tingting Yu, Xinrong Chen, Zhen Dai, Yani Peng, Xiaochun Tang, Zhanjun Li, Tiedong Wang, Huancheng Guo, Li Li, Changchun Tu, Liangxue Lai, Hongsheng Ouyang
- Efficient inhibition of African swine fever virus replication by CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L) - Alexandra Hübner, Bjoern Petersen, Günther M. Keil, Heiner Niemann, Thomas C. Mettenleiter & Walter Fuchs
- Gene engineering in swine for agriculture - WANG Yan-fang, HUANG Jiao-jiao, ZHAO Jian-guo
- https://www.genewiz.com/en-GB/Public/Services/Gene-Synthesis/Single-Stranded-DNA-Synthesis?utm_campaign=adwords&utm_source=ppc&utm_medium=Adwords&utm_term=ssDNA&sc_campaign=9A622C811DD842E9AB5F9CA41A06FCBC&ads_adid=76924784295&ads_cmpid=1775223006&ads_creative=374676910498&ads_matchtype=b&ads_network=g&ads_targetid=aud-369771190554:kwd-

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



[303560436187&ttv=2&utm_campaign=adwords&utm_medium=ppc&utm_source=adwords&utm_term=the%20crispr&gclid=Cj0KCQiAyJOBbDCARIsAJG2h5dMdn5bzBJGZk8IM7knNSnHWm3orF2Z51CgrhF0oDrHQaFHdKfcE8QaAmAKEALw_wcB](https://www.researchgate.net/publication/303560436187&ttv=2&utm_campaign=adwords&utm_medium=ppc&utm_source=adwords&utm_term=the%20crispr&gclid=Cj0KCQiAyJOBbDCARIsAJG2h5dMdn5bzBJGZk8IM7knNSnHWm3orF2Z51CgrhF0oDrHQaFHdKfcE8QaAmAKEALw_wcB)

- Livestock 2.0 – genome editing for fitter, healthier, and more productive farmed Animals - Christine Tait-Burkard, Andrea Doeschl-Wilson, Mike J. McGrew, Alan L. Archibald, Helen M. Sang, Ross D. Houston, C. Bruce Whitelaw and Mick Watson
- Genome and Molecular Characterization of a CSFV Strain Isolated from a CSF Outbreak in South China - Hai-Yan Shen a, b Jia-Ying Wang a Xiao-Ying Dong a Ming-Qiu Zhao a Yanmei Kang a Yin-Guang Li a Jing-Jing Pei a Ming Liao a Chun-Mei Ju a Lin Yi a Yongming Hu a Jin-Ding Chen
- https://www.pig333.com/latest_swine_news/advance-in-the-fight-against-asf_11079/
- <https://www.gov.uk/government/news/gene-editing-creates-potential-to-protect-the-nations-environment-pollinators-and-wildlife>
- <https://www.gov.uk/government/publications/agriculture-multi-financial-assistance-plan-2021-to-2027>
- The Genetics of Life and Death: Virus-Host Interactions Underpinning Resistance to African Swine Fever, a Viral Hemorrhagic Disease - Christopher L. Netherton, Samuel Connell, Camilla T. O. Benfield and Linda K. Dixon
- <https://www.feedstrategy.com/pig-health-disease/gene-editing-could-alleviate-asfs-impact-on-industry/>
- <https://innovature.com/article/gene-editing-could-protect-pigs-diseases>
- <https://www.nzherald.co.nz/the-country/news/gene-editing-protects-pigs-from-swine-flu/SXEFMWNQ37TOJVBKX5S5H5BCPQ/>
- Gene-edited pigs are resistant to billion dollar virus, study finds - <https://www.ed.ac.uk/roslin/news-events/latest-news/archive/2018/gene-edited-pigs-resistant-billion-dollar-virus>
- Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1 - Luca Popescua, Natasha N. Gaudreaulta,*, Kristen M. Whitworthb, Maria V. Murgiaa, Jerome C. Nietfelda, Alan Milehamc, Melissa Samuelb, Kevin D. Wellsb, Randall S. Pratherb, Raymond R.R. Rowland
- The E2 Glycoprotein of Classical Swine Fever Virus Is a Virulence Determinant in Swine - G. R. Risatti, M. V. Borca, G. F. Kutish, Z. Lu, L. G. Holinka, R. A. French, E. R. Tulman, and D. L. Rock
- Attempts at the development of a recombinant African swine fever virus strain with abrogated EP402R, 9GL, and A238L gene structure using the CRISPR/Cas9 system - Grzegorz Woźniakowski, Natalia Mazur-Panasiuk, Marek Walczak, Małgorzata Juskiewicz, Maciej Frant, Krzysztof Niemczuk
- Substitution of warthog NF-κB motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus - Stephen McCleary, Rebecca Strong, Ronan R. McCarthy, Jane C. Edwards, Emma L. Howes, Lisa M. Stevens, Pedro J. Sánchez-Cordón, Alejandro Núñez, Samantha Watson, Alan J. Mileham, Simon G. Lillico, Christine Tait-Burkard, Chris Proudfoot, Maeve Ballantyne, C. Bruce A. Whitelaw, Falko Steinbach & Helen R. Crooke
- With or without a Vaccine—A Review of Complementary and Alternative Approaches to Managing African Swine Fever in Resource-Constrained Smallholder Settings - Mary-Louise Penrith, Armanda Bastos and Erika Chenais

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056



- Genome editing for disease resistance in pigs and chickens - Chris Proudfoot, Simon Lillico, and Christine Tait-Burkard
- Gene-edited pigs are protected from porcine reproductive and respiratory syndrome virus - Kristin M Whitworth, Raymond R R Rowland, Catherine L Ewen, Benjamin R Tribble, Maureen A Kerrigan, Ada G Cino-Ozuna, Melissa S Samuel, Jonathan E Lightner, David G McLaren, Alan J Mileham, Kevin D Wells & Randall S Prather
- Transgenic shRNA pigs reduce susceptibility to foot and mouth disease virus infection - Shengwei Hu, Jun Qiao, Qiang Fu, Chuangfu Chen, Wei Ni, Sai Wujiafu, Shiwei Ma, Hui Zhang, Jingliang Sheng, Pengyan Wang, Dawei Wang, Jiong Huang, Lijuan Cao, Hongsheng Ouyang

Изготвил:

Красимира Захариева

Главен експерт в Дирекция ОРХВ към ЦОРХВ

гр. София, 1618, бул. "Цар Борис III" № 136
<http://corhv.government.bg>, corhv@mzh.government.bg
тел. 02/4273056

Ф-НК-7.6-5/0

