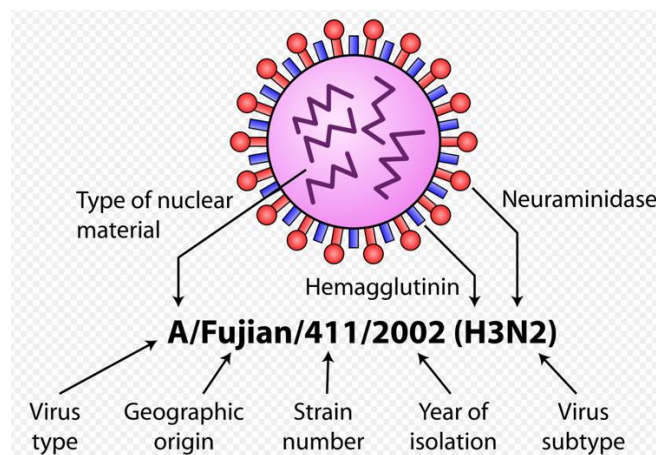


## Генното редактиране при птици като алтернатива за справяне с птичия грип (*highly pathogenic avian influenza*)

### Научна информация

Вирусът на грип А причинява заболяване при птици и някои бозайници и е единственият вид от рода *Alphainfluenzavirus*, семейство *Orthomyxoviridae*. Щамове от всички подтипове на грипния вирус А са изолирани от диви птици, въпреки че заболяването е необичайно. Някои изолати на грипния вирус А причиняват тежко заболяване както при домашните птици, така и рядко при хората. Понякога вирусите се предават от диви водоплаващи птици на домашни птици и това може да причини огнище или да доведе до пандемии на човешкия грип.

Грипните вируси А са отрицателни, едноверижни, сегментирани РНК-ови вируси. Няколко подтипа са определени според Н (типа хемаглютинин) и N (типа неураминидаза). Има 18 различни известни Н антигени (Н1 до Н18) и 11 различни известни N антигени (N1 до N11). Н17N10 е изолиран например от плодови прилепи през 2012 г., а Н18N11 е открит в перуански прилепи през 2013 г.



Фиг. 1: структура на вируса на инфлуенца А по птиците и номенклатура на вирусите от това семейство

Всеки подтип на вируса е мутирал в различни щамове с различни патогенни профили; някои са патогенни за един вид, но не и за други, други са патогенни за множество видове.

Разработена е пречистена противогрипна ваксина за човешка употреба и много страни я използват за бърза терапия на населението в случай на пандемия от инфлуенца.

Заразяването на домашни птици с вируси на Инфлуенца А причинява две основни форми на тази болест, които се различават по своята вирулентност и патогенност. Нископатогенната (LPAI) форма обикновено причинява само леки симптоми, а

високопатогенната (HPAI) форма води до много високи нива на смъртност при повечето видове домашни и промишлено отглеждани птици. Болестта може да има сериозни последици за рентабилността на птицевъдството. Епидемиологията на Инфлуенцата А по птиците е сложна. Инфлуенца вирусите постоянно еволюират чрез мутации и реасортации, което води до появата на нови подтипове и оказва значително въздействие върху здравето на животните. Някои подтипове на вируса на инфлуенцата са със зоонозен потенциал и следователно могат да представляват заплаха за човешкото здраве. През последните години (от 2015 г. насам) няколко епидемични вълни от високопатогенна инфлуенца по птиците (HPAI) предизвикаха безпокойство по отношение на здравето на домашните птици в редица ДЧ на Европейския съюз (ЕС). През 2015 г. и в началото на 2016 г. се появиха огнища на HPAI при домашните птици в Германия, Унгария, България, Обединеното кралство, Франция и Италия. От октомври 2016 г., най-скорошната епидемия на HPAI засегна домашните и дивите птици и птиците, отглеждани в затворени помещения, в най-малко 21 държави членки. Основният щам на HPAI, свързан с тази епидемия, от подтип H5N8 е внесен от мигриращи диви птици.

### **Геном на грип А вируса:**

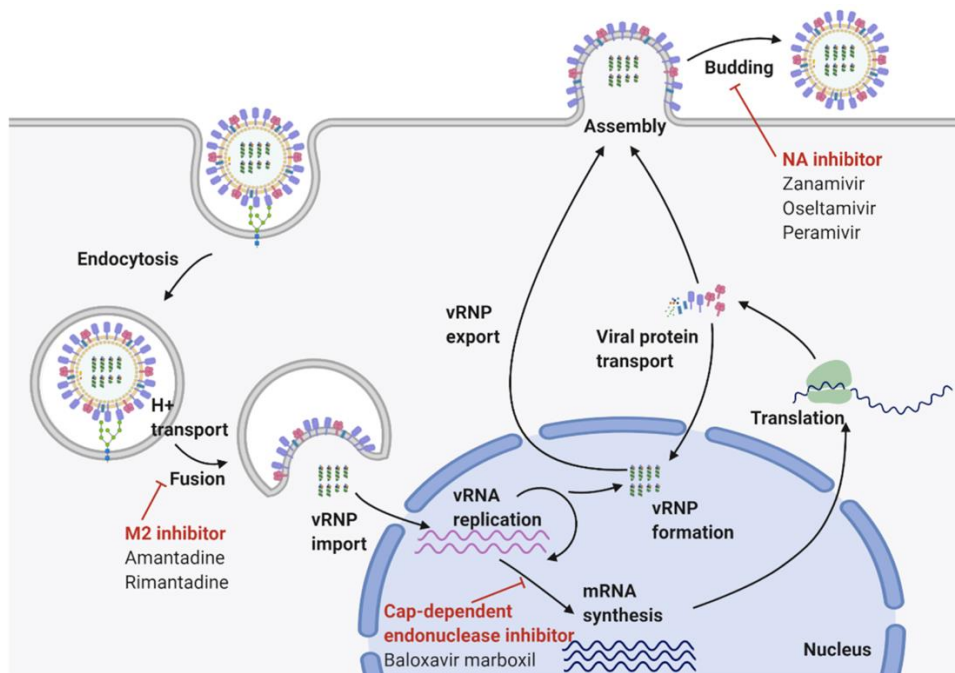
Целият геном на вируса на грип А е с дължина 13 588 бази и се съдържа в осем сегмента от РНК, които кодират 10 до 14 протеина, в зависимост от щама. Уместността или присъствието на алтернативни генни продукти може да варира:

- Сегмент 1 кодира РНК полимеразна субединица (PB2).
- Сегмент 2 кодира РНК полимеразна субединица (PB1) и PB1-F2 протеин, който индуцира клетъчна смърт, чрез използване на различни рамки за четене от един и същ РНК сегмент.
- Сегмент 3 кодира РНК полимеразна субединица (PA) и PA-X протеин, който има роля в спирането на транскрипцията на гостоприемника.
- Сегмент 4 кодира за HA (хемаглутинин). За производството на един вирион са необходими около 500 молекули хемаглутинин. HA определя степента и тежестта на вирусната инфекция в организма гостоприемника.
- Сегмент 5 кодира NP, който е нуклеопротеин.
- Сегмент 6 кодира NA (неураминидаза). За производството на един вирион са необходими около 100 молекули неураминидаза.
- Сегмент 7 кодира два матрични протеина (M1 и M2) чрез използване на различни рамки за четене от един и същ РНК сегмент. За да се получи един вирион са необходими около 3000 молекули матрични протеини.
- Сегмент 8 кодира два различни неструктурни протеина (NS1 и NEP) чрез използване на различни рамки за четене от един и същ РНК сегмент.

### **Цикъл на репликация на вируса на грип А:**

РНК сегментите на вирусния геном имат комплементарни базови последователности в терминалните краища, което им позволява да се свързват помежду си с водородни връзки. Транскрипцията на вирусния (-) геном (vRNA) може да продължи само след като PB2 протеинът се свърже с гостоприемниковата РНК, позволявайки на PA субединицата да разцепи няколко нуклеотида след шапката. Тази получена от гостоприемника шапка и нуклеотидите служат като праймер за инициране на вирусна транскрипция. Транскрипцията продължава по vRNA, докато се достигне участък от няколко урацилови бази, иницирайки полиаденилиране на зараждащата се вирусна mRNA, произвеждайки зрял транскрипт.

Синтезът на РНК се осъществява в клетъчното ядро, докато синтезът на протеини се извършва в цитоплазмата. След като вирусните протеини се съберат във вириони, събраните вириони напускат ядрото и мигрират към клетъчната мембрана. Клетъчната мембрана на гостоприемника има вирусни трансмембранны протеини (НА, NA и М2) и прилежащ слой от протеина М1, които подпомагат събраните вириони да проникват през мембраната, освобождавайки готови обвити вирусни частици в извънклетъчното пространство.



Фиг. 2: схематично представен процеса по сформирание на вирионите и напускането на клетката-гостоприемник

### Синтетична биология, селекция, геномика и гена редакция:

В продължение на хиляди години учените манипулират геномите на животните и растенията, за да получат потомство, което носи желаните черти, въпреки че познанията по генетика и откритията в това направление не са били много напред. Изкуственото селективно размножаване вероятно е най-ранният метод за геномна манипулация, където естествените фенотипни белези са кръстосвани и подбирани, за да участват в следващите поколения растения и животни, с цел да се предадат белези и функции, които да придадат по-висока устойчивост на заболявания или по-устойчиви на

климатични промени видове или по-устойчиви на вредители и паразити видове в бъдещите поколения. Изкуственото селективно размножаване е документирано от древен Рим. Възможно е също така естествени хибриди да са били използвани и при отглеждането на животни и растения в ранната история. Въпреки че изкуствената селективна практика за размножаване е започнала в древни времена, когато законът за наследствеността е открит от Мендел, геномната манипулация вече е ръководена от генетиката. Става ясно, че геномът диктува фенотипната изява на растителни, животински или други видове.

Ранният изкуствен подбор разчита на естествена селекция, реасортация и спонтанни мутации в генома. Въпреки това, има ограничения в съществуващите селективни подходи и спонтанни мутации. Тъй като мутациите могат да бъдат индуцирани изкуствено, индукцията на мутацията е използвана за увеличаване на наличния генен пуул за подбор. В ранните години на генетиката и селекцията, изследователите са използвали радиация, за да предизвикат мутации в генома, представляващи интерес (*Abplanalp et al., 1964; Lundqvist, 2014*). Към днешна дата голям брой земеделски култури са произведени чрез радиационна индукция. Радиационното размножаване обаче често е придружено от високи хромозомни аберации и вредни ефекти върху облъчения организъм. Изследователите също са използвали химически мутагени за индукция. Широко използваните химически мутагени включват алкилиращи агенти като етилметаносулфонат, които причиняват основна замяна в ДНК. Мутагенезата в предварително определени места в голям участък от генома е от голям интерес, тъй като тя може да помогне за решаването на функцията на гените, които представляват интерес. За тази цел е изобретена място специфичната мутагенеза (*Flavell et al., 1975; Rawlins and Muzyczka, 1980*). В ранния си стадий, място специфичната мутагенеза е била приложима само за *in vitro* проучвания (*Shortle et al., 1982*) или към вирусни геноми (*Pugatschu Stacey, 1982; Bryant and Parsons, 1982*). В комбинация с метода за заместване на определени гени, място специфичната мутагенеза, скоро се прилага и при прокариотите (*Ohman et al., 1985*). По-късно, манипулацията на големи геноми с помощта на мутагенеза, последвана от хомоложна рекомбинация, наречена генно насочване в литературата, дава възможност за манипулиране на големи геномни последователности или цели геноми на мишки (*Capecchi, 1989*). Тази технология най-често се използва при генерирането на „*knock-out*“ животни, при които функцията на целевия ген е атенюирана, модифицирана или по друг начин нарушена.

Трансгенезата, поколението от трансгенни животни, е тясно свързана с мутагенезата, с фината разлика, че трансгенезата включва екзогенна ДНК. Трансгенезата започва с интегриране на чужда ДНК секвенция в оплодени яйца (*Gordon et al., 1980; Brinster et al., 1981*). Докато чуждите гени могат да бъдат въведени в животинския геном по този метод, екзогенната ДНК се интегрира в гостоприемниковия геном по неконтролиран начин, често на произволни места. Експресията на чуждите гени може да доведе до драматични промени на фенотипа (*Palmiter et al., 1982*). Въпреки че екзогенните гени могат лесно да бъдат въведени в животинските клетки днес, те могат да не се възпроизвеждат и предават по време на клетъчното делене, тъй като в изкуствено конструирания геном често липсват необходимите ДНК елементи за репликация и правилна сегрегация по време на клетъчното

делене. След въвеждането на екзогенни гени в клетките на гостоприемниците се изисква селекция, за да се получат клетки с трансгенна интеграция в хромозомите. В противен случай екзогенната ДНК трябва да носи необходимите компоненти за стабилно предаване чрез митоза и мейоза. За съжаление, няма удобни векторни системи, които да съдържат необходимите елементи за самовъзпроизвеждане и предаване в животински клетки към днешна дата.

Съвременното земеделие и животновъдство разчитат в голяма степен на генетична и екологична манипулация. Съвременната манипулация на генома използва широк набор от подходи. Въпреки че изкуственият подбор все още е основна техника, много нови инструменти са добавени към „кутията с инструменти“ на изследователите и животновъдите. Няколко инструмента са проектирани да променят голям участък от генома в предварително определен „сайт“/локус с по-малко непреднамерени модификации. Тези технологии включват нуклеази тип цинкови пръсти (ZFNs), транскрипционно-подобни ефектори (TALENs) и групирани междупространствени къси палиндромни повторения (CRISPR) и Cas9 системи (CRISPR/Cas9), колективно наричани технологии за редактиране на генома, които позволяват по-точна промяна на целевата секвенция. Тези технологии могат да включват изтривания, вмъквания и основни замествания на генетичен материал и се обединяват в новата наука синтетична биология.

Синтетичната биология (*SynBio*) е плод на генното инженерство и биологията, която има за цел да развие нови биологични системи и да придаде нови функции на жизнеспособните клетки. Синтетичната биология позволява радикални промени в генома на всички видове живи организми. През последните години са разработени нови методи на генно инженерство, които по същество се основават на следните технически приложения:

- Изкуствен ДНК синтез – със или без естествен шаблон
- Способността да се вмъква ДНК на точни места почти навсякъде в генома, използвайки нуклеази или ДНК ножици (генно редактиране) – *CRISPR-Cas9*
- Клетъчни култури, взети от животни-донори, които след това се отглеждат, генетично манипулирани и използвани за развитие на ембриони в лабораторна среда
- Манипулиране на генното регулиране (епигенетика).

Новите методи на „синтетична генна технология „или „геномно редактиране“ са много различни от всичко, което е било преди в генното инженерство. Структурата на ДНК вече не зависи от съществуващите естествени ДНК последователности. Геномът може да бъде компютърно проектиран и след това да се синтезира в лабораторни условия определена част или целият геном или да се комбинират определени генни локуси в различни варианти.

В днешно време с напредъка на синтетичната биология и генетиката понякога няма нужда да се прехвърлят ДНК секвенции, тъй като генома може да бъде модифициран директно в клетката. Не винаги е необходимо да се променя структурата на ДНК, за да се променят биологичните черти на организмите – това може да стане чрез



манипулиране на генната регулация. Новите геномни техники позволяват радикално да се промени генома, например чрез промяна на ДНК на няколко целеви локуса или вмъкване на генетичен материал, за който няма естествен шаблон.

Разликата между конвенционалното развъждане и генното инженерство се изразява основно в това, че конвенционалното развъждане работи с цялата клетка и пълния геном на растенията, животните и микроорганизмите. Генното инженерство, от друга страна, работи с изолирани части от ДНК, които се използват като гравивни елементи за изграждане на организми с нови характеристики. Биологичната активност на нововъведената ДНК се прилага чрез технически средства, като по този начин заобикаля собственото генно регулиране на клетката и естествените механизми на наследственост. Генното инженерство е различно от методите, използвани в конвенционалното размножаване, защото има за цел да приложи нови функционални характеристики. Традиционното размножаване използва естествения потенциал на растенията, животните и микроорганизмите, произхождащи от естествени еволюционни пътища. Дори мутациите се основават на механизмите на еволюцията (например излагане на UV-светлина – мутагенен фактор). Има постоянни промени в геномите на живите организми, но това е естествено клетъчно регулиране, което ще определи кои мутации най-накрая ще надделеят и ще останат като естествени характеристики на организмите. Поради тези причини организмите, получени от процеса на генното инженерство, могат да се считат за значително различни в сравнение с тези, получени от конвенционалното размножаване или тези, които са плод на естествена еволюция.

Разбирането на разликата между конвенционалното размножаване и генното инженерство е важно, когато става въпрос за оценка на риска за човешкото здраве, оценката на генния поток в екосистемите и генния пуул на местните популации или други организми. Промените в генната функция и метаболизма, наложени от генното инженерство, често влияят върху активността на други гени в организмите. Такива неволни странични ефекти могат да засегнат генома, клетката или дори целия организъм. Генното инженерство например може да принуди растенията да произвеждат нови протеини (като протеини, проявяващи инсектицидни свойства) въз основа на метаболитни пътища, които няма да се появят чрез мутагенеза. Растенията не са в състояние да се адаптират по естествен начин към тези пътища чрез еволюционни процеси и следователно може да има други нежелани ефекти, като променен състав или по-висок потенциал за разпространение и инвазиране в околната среда. Това от своя страна означава, че може да има значителни рискове за хората и околната среда, които трябва да бъдат взети под внимание.

Разликите между конвенционалното размножаване и генното инженерство могат да имат много други последици. По-сложни генетични черти, като например генната функция, допринасяща за по-висок добив или устойчивост на стресори на околната среда (като изменението на климата) – може да бъде трудно или дори невъзможно да се постигне. В този контекст конвенционалните методи за размножаване често са по-успешни. Има основателни причини за това: В много случаи предпочитаните черти не се основават на единични ДНК последователности, а на сложни генетични взаимодействия. Те често могат да бъдат постигнати много по-ефективно чрез използване на организмите като биологична система в конвенционалното размножаване,

а не чрез вмъкване на последователности от изолирана ДНК като единични градивни елементи.

### Употреба на инструментите на синтетичната биология като алтернативно решение в борбата с инфлуенца А по птиците:

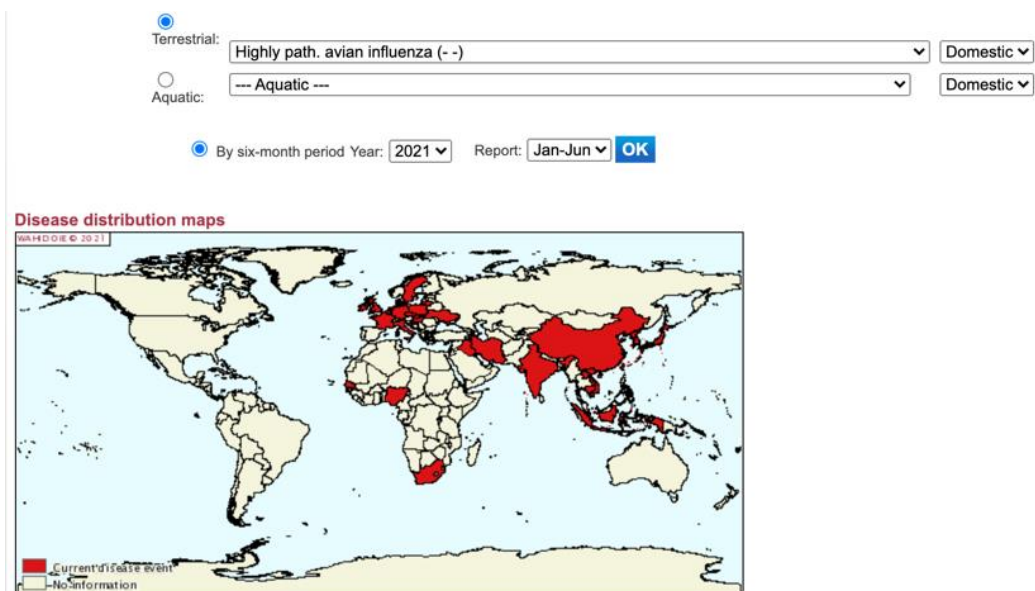
Учените са използвали техники за редактиране на гени, за да спрат разпространението на вируса на птичия грип в птичите клетки, отглеждани в лабораторна среда. Констатациите повишават възможността да се произведат пилета, генно редактирани, които са устойчиви на болестта. Изследователите предотвратиха задържането на вируса, като изтриха част от птичата ДНК в лабораторно отгледани клетки. Следващата стъпка ще бъде да отглеждат и развъждат пилета с генетичната промяна. Все още тези проучвания са на ранен етап и не са произведени генно-редактирани птици.

| Year of publication | 1987  | 1994   | 2004  | 2006  | 2013   | 2013   | 2015  | 2016   | 2017                                  | 2017  |
|---------------------|---|--|---|---|--|--|---|--|---------------------------------------|---|
| Contribution        | Generation of the first genetically modified chicken using retroviral vectors | Generation of the first genetically modified chicken by DNA microinjection | Transgenic chickens using lentivirus carrying a transgene | Isolation and long term culture of PGCs followed by transfection and generation of eGFP transgenic chickens | Targeted gene editing in PGCs and generation of the first gene knockout chickens | <i>In vivo</i> transfection of PGCs using Lipofectamine 2000 complexed with Tol2 transposon and transposase plasmids | Development of feeder and serum-free PGC cultures | CRISPR-mediated homology directed repair targeting the immunoglobulin heavy chain locus in PGCs. | TALEN-mediated gene targeting of PGCs | Restoration of male fertility by transplantation of genetically modified PGCs |
| References          | Salter et al., 1987   | Love et al., 1994  | McGrew et al., 2004                                       | Van De Lavoir et al., 2006  | Schusser et al., 2013a   | Tyack et al., 2013   | Whyte et al., 2015                                | Dimitrov et al., 2016  | Taylor et al., 2017                   | Treffl et al., 2017   |

Фиг. 3: По-важни генни редакции и модификации при птици във времето

### Карта на настоящата ситуация и разпространение на инфлуенцата по птиците:





Технологиите, медирани от CRISPR/Cas9 системите, се използват за редактиране на генома при различни домашни птици. Редактирането на генома при домашните птици, особено при кокошеви, се извършва с помощта на **култивирани първични зародишни клетки (PGC)**. Наскоро медирано от аденовирус редактиране на генома е извършено при пъдпъдъци, вид, при който *PGC* не могат да бъдат култивирани *in vitro*. В допълнение, директното инжектиране на **плазмид**, който кодира **Cas9 и sgRNA в ембрионални кръвоносни съдове**, постигна успешно редактиране на зародишните клетъчни линии и даде функционално геном-редактирано потомство.

### **PGC-медирано редактиране на генома при птици:**

При птици PGC, поради уникалния им миграционен път, могат да бъдат изолирани в различни ембрионални етапи и могат да бъдат култивирани, без да се губи потентността на зародишната линия. Когато тези култивирани PGC се инжектират в кръвоносните съдове на реципиента, те се установяват в половите жлези, което води до производството на хибридна зародишна линия. Хибридната зародишна линия, произведена чрез инжектиране на генетично редактирани PGC, може да създаде геномно редактирано потомство. Наскоро, използвайки култивирани PGC и системата CRISPR/Cas9, редактирането на генома на пилетата е успешно извършено за няколко цели.

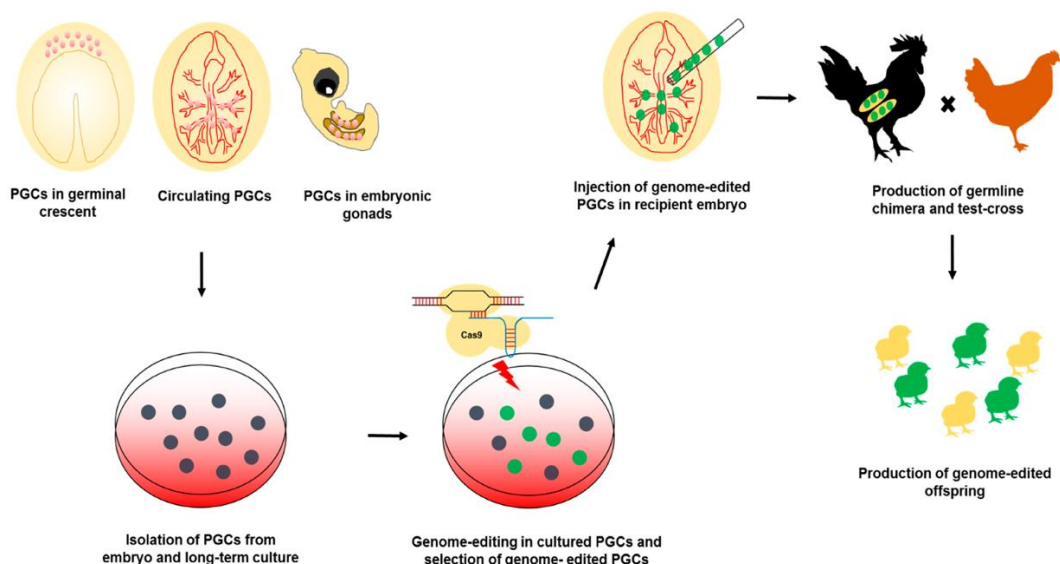
Първата научна информация за генно редактирано пиле, произведено посредством системата CRISPR/Cas9, датира от 2016 г. В това проучване, овомикоидът (OVM), основен алерген в яйчния белтък, е изключен при хибридните пилета с помощта на CRISPR/Cas9. Това проучване демонстрира, че целенасочената мутагенеза, медирана от системата CRISPR/Cas9, може да бъде успешно проведена в PGC на пилета, което води до жизнеспособно потомство пилета с редактиран геном. Впоследствие изключването на гените, кодиращи миостатин (MSTN) и превключващ ген 2 на G0/G1 (G0S2) при пилета се извършва с помощта на системата CRISPR / Cas9.



Въвеждането на екзогенни генни касети чрез HDR е успешно проведено при пилета, използвайки системата CRISPR/Cas9. През 2016 г. е въведен loxP сайт в променливия регион (V регион) на имуноглобулиновата тежка верига (IgH), използвайки CRISPR/Cas9-медиран HDR, и резултатът е жизнеспособни пилета с генна редакция на генома. Това проучване беше първото, което показва, че HDR-медираното насочване на гени може успешно да се извърши в пилешки PGC, използвайки CRISPR/Cas9. Впоследствие, през 2018 г., човешкият интерферон  $\beta$  (hIFN- $\beta$ ) е насочен към овалбуминовия локус чрез медиран от CRISPR/Cas9 HDR и тези пилета показаха високи нива на hIFN- $\beta$  в яйчен белтък (1,86 - 4,42 mg/ml). В допълнение, въвеждането на точкова мутация, която прецизно изтрива триптофановия остатък 38 (W38) от пилешки Na +/H + обменник тип 1 (*Na+/H+ exchanger type - 1chNHE1*), е успешно постигнато чрез HDR.

Недостатъците на HDR са неговата ниска честота спрямо NHEJ и изискването донорният вектор да има дълги хомоложни рамена. При домашните птици за първи път се съобщава за NHEJ-намеса и редакция през 2018 г. В това проучване експресионна касета със зелен флуоресцентен протеин (GFP) е насочена към локус между хомолог на DNAJ член 1 (DNAJA1) и регулатор на репликация на ДНК и сплайсозомен фактор (SMU1) на Z хромозомата, което води до жизнеспособни GFP-пилета, които могат да бъдат използвани като модел за определяне на пола при птиците.

Преди всичко, тези проучвания показват, че CRISPR/Cas9-медираното редактиране на генома, включително целенасочена мутагенеза и HDR/NHEJ-медирано генно насочване, имат потенциал и могат да се прилагат успешно в култивирани PGC, за да се получат генетично редактирани домашни птици. Въпреки огромния потенциал на тези генни технологии и инженерството все още, поради непредвидимия си характер, е желателно да бъде ограничена до лабораторни изпитвания преди да навлезе масово в производствения процес (фиг. 4):

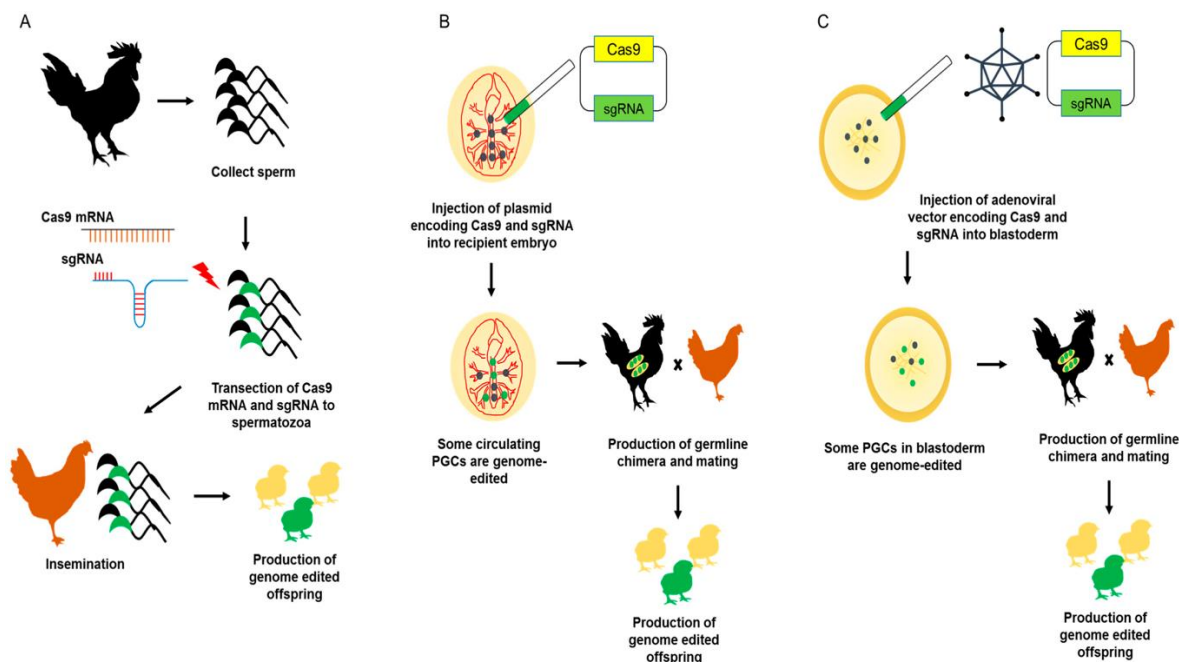


## Редактиране на генома при домашни птици, използвайки други методи

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

Въпреки че култивираните PGC са мощни инструменти за извършване на редактиране на генома при домашни птици, има някои недостатъци на този подход. Сред видовете птици само PGC на кокошеви са били култивирани успешно в дългосрочен план *in vitro*. При други видове домашни птици, като пъдпъдъци, PGC не могат да бъдат култивирани за много пасажи; следователно е трудно да се избират и усилват редактирани от генома PGC. В допълнение, PGC-медираните методи отнемат много време, изисквайки подбор на геном-редактирани PGC, микроинжектиране и отглеждане на G0 зародишни хибриди до полова зрялост, за да се получи геном-редактирано потомство. Следователно е необходимо да се разработят нови методи и да се изпитат, за да навлезе тази технология в производството на домашни птици.

Един от методите за получаване на геномно редактирани птици е **асистирана генна редакция посредством сперматозоидно трансфериране** (*Sperm Transfection-Assisted Gene Editing - STAGE*), което включва директен трансфер на сперматозоиди с Cas9 mRNA и sgRNA (Фиг. 5). Използвайки трансферираните сперматозоиди за инсеминация, геномно редактираното потомство може да бъде създадено директно, голямо предимство на STAGE спрямо PGC-медираното геномно редактиране. Използвайки STAGE, редактирането на генома е извършено успешно в пилешки ембриони, но ефективността на производството на геномно редактирано потомство е доста ниска и все още се изисква допълнително подобрене и изпитване на тази методология.



Друг метод за генна редакция при домашни пилета включва **директно инжектиране на плаزمиди в ембрионални кръвоносни съдове** (Фиг. 5Б). Инжектирането на Tol2 транспозон и транспозаза плазмиди в реципиентни ембриони с

липофектамин може да трансформира циркулиращите PGC и да доведе до създаването на жизнеспособни трансгенни пилета. Неотдавнашно проучване съобщава, че съвместното инжектиране на Tol2 транспозонен плазмид, съдържащ Cas9 и sgRNA експресионни касети и транспозазен плазмид с липофектамин може да произведе G1 потомство, което стабилно експресира Cas9 и sgRNA. Използвайки този метод, в G2 се получават както трансгенни, така и нетрансгенни геномно редактирани потомства.

Наскоро бяха разработени **медиирани от аденовирус методи за редактиране на генома** (Фиг. 5С). Оптимизираният аденовирусен вектор CRISPR/Cas9, който експресира Cas9 и sgRNA, насочена към гена за меланофилин (MLPH), се инжектира в бластодермата на пълпъдъчния ембрион. След излюпването, 45% от хибридните пълпъдъци (G0) дават геномно редактирано потомство и ефективността на предаване на зародишната линия е до 10%. В допълнение, пълпъдъците MSTN, които имат по-високо телесно тегло и мускулна маса, са успешно създадени с помощта на аденовирусна CRISPR/Cas9 векторна система. Тези резултати са важни, тъй като ефективността на хибридната зародишна линия е по-висока от тази на другите методи, различни от PGC, и методът има потенциал да бъде широко прилаган при всички видове домашни птици. Освен това аденовирусната векторна система може да се прилага за постнатално редактиране на гени при домашни птици. В проучване на *Xu et al.* аденовирусен вектор, експресиращ MSTN насочен ген sgRNA и SpCas9 се инжектира в мускула на пилешкото краче, което води до успешен „*knock-out*“ на MSTN.

В бъдеще човешката популация в световен мащаб ще продължи да расте и търсенето на животински хранителни продукти ще се увеличи съответно. ФАО изчислява, че до 2050 г. населението на света ще бъде 9,7 милиарда, а търсенето на животински хранителни продукти ще се увеличи със 70%. В подготовка за това повишено търсене трябва да се подобрят икономичните черти като производителност, устойчивост на болести и толерантност към променящите се климатични условия. Въз основа на технологията за секвениране на генома, изследователите могат да намерят генетични варианти, които допринасят за подобряване на икономическите черти и да използват тази генетична информация за селективно размножаване. Редактирането на генома може да бъде хармонизирано със селективното размножаване, тъй като може прецизно да редактира целеви сайтове/локуси, които са идентифицирани чрез данни за секвениране на генома, и да въведе нови алелни състояния/нови характеристики, свързани с икономически важни черти, без задържане на трансгени. Няколко проучвания използват технология за редактиране на генома в животновъдството, за да придадат желани черти като устойчивост на болести и толерантност към променящите се климатични условия, с цел подобряване на производителността; в бъдеще този тип изследвания ще бъдат значително ускорени.

При домашните птици е извършено **редактиране на генома, за да се увеличи мускулната маса, по-доброто усвояване на хранителните вещества от фуражите и устойчивостта към болести.** MSTN кодира отрицателен регулатор на мускулното развитие и „*knock-out*“ на MSTN значително увеличава мускулната маса при няколко животински вида (едри преживни животни и прасета). В случая на домашните птици е

извършен успешен „*knock-out*“ на MSTN и резултатът е жизнеспособно G0S2. Мускулната маса значително се увеличава при „*knock-out*“ на MSTN при пилетата и пѣдпѣдците, а съставът на мазнините е намален при тези пилета във G0S2. В наши дни технологиите за пълно геномно секвениране са разработени и внедрени и вече приложими за отглеждане на домашни птици, за да се намерят генетични маркери, които влияят на производителността. Тези генетични маркери могат да бъдат в бъдеще редактирани едновременно с помощта на системата CRISPR/Cas9. Комбинацията от тези нови *omics* технологии допълнително би спомогнало за увеличаване на производителността и поголовието при отглеждането на домашни птици в промишлени птицеферми.

Все пак не трябва да се пренебрегват и негативите на тези методики като недостатъчната информация и познания в областта на *omics* технологиите, нарушаване на био разнообразието, генния пуул в природата, възможни грешки в експресията на гените или пък грешно редактирани секвенции от генома и други.

**Вирусните заболявания при домашните птици** причиняват огромни икономически загуби и имат потенциал да намалят значително производителността при птиците. Редактирането на генома може да осигури резистентност към дадена вирусна инфекция чрез **модифициране на факторите на възприемчивост на гостоприемника**, които са от решаващо значение за навлизането или репликацията на вируса. Вирусите се свързват с молекулите на гостоприемниковите клетъчни рецептори, за да получат достъп до целевите клетки. Тъй като взаимодействието вирус-рецептор е силно специфично, заличаването на рецептора може целенасочено да предотврати вирусна инфекция. По този начин, CRISPR/Cas9-медираното редактиране на генома може да се използва за разработване на устойчиви на болести птичи модели чрез насочване към рецепторите на гостоприемника. В предварителни проучвания на пилешки фибробласти DF1, прецизното генно редактиране на гените *tva*, *tvb* и *tvс* на вируса, причиняващ левкозата при птици (ALV), използвайки CRISPR-Cas9, дава устойчивост или невъзприемчивост на инфекция от ALV подтип J (ALV-J), A (ALV-A), B (ALV-B) и C (ALV-C), съответно. Въз основа на тези предварителни проучвания са създадени пилета с редактиран геном, които имат прецизна делеция в триптофановия остатък 38 (W38) в *chNHE1* и са устойчиви на инфекция с ALV-J. Повече за това проучване би могло да бъде достъпно на следният линк: <https://www.pnas.org/content/117/4/2108>

В случая на грипен вирус А (IAV), гостоприемниковия фактор ANP32A играе критична роля в подпомагането на vPо1 активността на IAV. В птичия ANP32A има допълнителни 33 аминокиселини между богатите на левцин повторения и С-крайната киселинна област и когато тези 33 аминокиселини се изтрият, IAV репликацията в птичи клетки е значително нарушена. Тези резултати предполагат, че когато факторите на гостоприемника са идентифицирани като критични за попадане или репликация на вируса, може успешно да бъдат в бъдеще създадени устойчиви на болести линии чрез редактиране на генома. Освен това, когато тези гостоприемникови фактори се редактират едновременно, ще бъде възможно да се създадат птици, които са устойчиви на множество заболявания, не само на инфлуенца.

Изследователи от *Imperial College London* установиха, че по време на инфекция грипните вируси „отвличат“ тази специфична последователност в генома на птиците, наречена ANP32A, за да се реплицират. Работейки с експерти от Университета на Единбург, Институт Рослин, изследователите използваха техники за редактиране на гени, за да премахнат участъка от ДНК, отговорен за производството на ANP32A. Те откриха, че вирусът вече не е в състояние да се реплицира вътре в клетките с генетичната промяна.

Преди това изследователи от Института Рослин са работили с експерти от университета в Кембридж, за да произведат пилета, които не са предавали птичи грип на други пилета след инфекция, използвайки техники за генетична модификация. Новият подход е различен, тъй като не включва въвеждането на нов генетичен материал в ДНК на птицата. Изследването е финансирано от Съвета за изследователска дейност по биотехнологии и биологични науки, който също осигурява стратегическо финансиране на Института Рослин. Изследването е публикувано в списанието *eLife* и може да бъде достъпно на следният линк: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31159925/>

Д-р Майк Макгрю, от Института в Рослин към Университета в Единбург със своите проучвания доказва, че "Това е важен напредък, който предполага, че можем да използваме техники за редактиране на гени за производство на пилета, които са устойчиви на птичи грип. Все още не сме произвели птици и трябва да проверим дали промяната на ДНК има някакви други ефекти върху клетките на птиците, преди да можем да предприемем следващата стъпка."

*"This is an important advance that suggests we may be able to use gene-editing techniques to produce chickens that are resistant to bird flu. We haven't produced any birds yet and we need to check if the DNA change has any other effects on the bird cells before we can take this next step."*

Професор Уенди Баркли, председател на катедрата по вирусология в *Imperial College London*, каза: "Отдавна знаем, че пилетата са резервоар за грипни вируси, които могат да предизвикат следващата пандемия. В това изследване ние идентифицирахме възможно най-малката генетична промяна, която можем да направим на пилетата, които могат да помогнат за възпрепятстване на задържането на вируса. Това има потенциал да спре следващата грипна пандемия при източника си."

*"We have long known that chickens are a reservoir for flu viruses that might spark the next pandemic. In this research, we have identified the smallest possible genetic change we can make to chickens that can help to stop the virus taking hold. This has the potential to stop the next flu pandemic at its source."*

Рейчъл Хоукън, старши директор по геномика и количествена генетика в *Cobb-Vantress*, заяви: "Устойчивостта на птичи грип при производството на бройлери е от световно значение и това изследване е важна стъпка към тази цел."

*"Avian influenza resistance in broiler production is of global significance and this research is an important step toward that goal."*

**Пилета ANP32B не поддържат активността на вирусната (IAV) полимераза:**



В това проучване бе показано, че както човешките ANP32A, така и В протеините поддържат активността на адаптирана IAV полимеразата в човешки клетки (*Long et al., 2016; Sugiyama et al., 2015; Watanabe et al., 2014*). Използвайки CRISPR/Cas9, са генерирани човешки eHAP1 клетки, на които липсва експресия както на човешки ANP32A, така и на ANP32B протеин (*Staller et al.*). В клетките на WT eHAP1 активната IAV полимеразата (PB2 627K), получена от вирус H5N1 A/turkey/England/50-92/1991 (50-92), бе активна, за разлика от WT птичата полимеразата (PB2 627E), която не е. Екзогенната експресия на С-терминално маркиран с FLAG chANP32A може да спаси активността на птичата IAV полимеразата, докато експресията на chANP32B-FLAG, в която естествено липсва вмъкването на 33 аминокиселини, не. В двойни “knock out” клетки нито адаптираната в човека, нито полимеразата от птичи произход са активни. Експресията е запазена от chANP32A-FLAG активността и на двете полимеразата, но експресията на пилешки ANP32B-FLAG не запазва нито една, въпреки потвърждението на силната експресия посредством *Western blot*. Това предполага, че пилешкият ANP32B не е функционален за IAV полимеразата и че активността на IAV полимеразата разчита на ANP32A в птичите клетки. За да бъде потвърдена тази хипотеза при пилешките клетки, учените са използвали CRISPR/Cas9 генна редакция, за да генерират пилешки DF-1 клетки, на които липсва chANP32B, но се запазва експресията на chANP32A. DF-1 клетките от див тип имат иРНК за chANP32A, В и Е и поддържана активност на птичи IAV полимеразата, носещи PB2 627E или 627K. Свърхекспресията на chANP32B-FLAG не повлиява активността. DF-1 bKO клетките също поддържат активността на двете полимеразата и отново екзогенната експресия на chANP32B няма ефект. Тъй като птичите клетки, които нямат експресия на chANP32B, не демонстрират никаква загуба на активността на IAV полимеразата в сравнение с WT, това предполага, че chANP32B не е функционална за IAV полимеразата и че IAV полимеразата използва само ANP32 член на семейството А в птичите клетки. Птичите клетки, в които липсва непокътнат ANP32A, не поддържат активност на птичия IAV полимеразата.

За да бъде изследвана функцията на ANP32A в птичите клетки, е използван клетъчен тип, който е по-податлив на редактиране на генома и клонов растеж. Първичните зародишни клетки (PGC) са стволови клетки с ограничена линия, които образуват гаметите при възрастните индивиди. PGC от пилешкия ембрион могат лесно да бъдат изолирани и култивирани за неопределено време в определени условия на среда (*van de Lavoie et al., 2006; Whyte et al., 2015*). Пилешките PGC могат да се редактират, като се използват специфични за изкуствената последователност нуклеази и впоследствие да се използват за генериране на геном редактирано потомство (*Park et al., 2014; Oishi et al., 2016*). При подходящи *in vitro* условия PGC могат да придобият плурипотентност и впоследствие да бъдат диференцирани в множество клетъчни типове (*Matsui et al., 1992; Shim et al., 1997; Shambloott et al., 1998; Park and Han, 2000*). Птичите PGC клетки са редактирани с помощта на CRISPR/Cas9 и единичен РНК-водач, които генерират chANP32A „knock out“ клетки (aKO), съдържащи биалелна делеция на 8 нуклеотида в екзон1. PGCs без 33 аминокиселини вмъквания в chANP32A са генерирани с помощта на двойка насочващи РНК за отстраняване на екзон 5, водещ до птичи клетки с ANP32A (D33). Точните делеции са потвърдени чрез пълен геномен секвентен анализ на Санджер на субклонирани PCR продукти от геномна ДНК и за двете

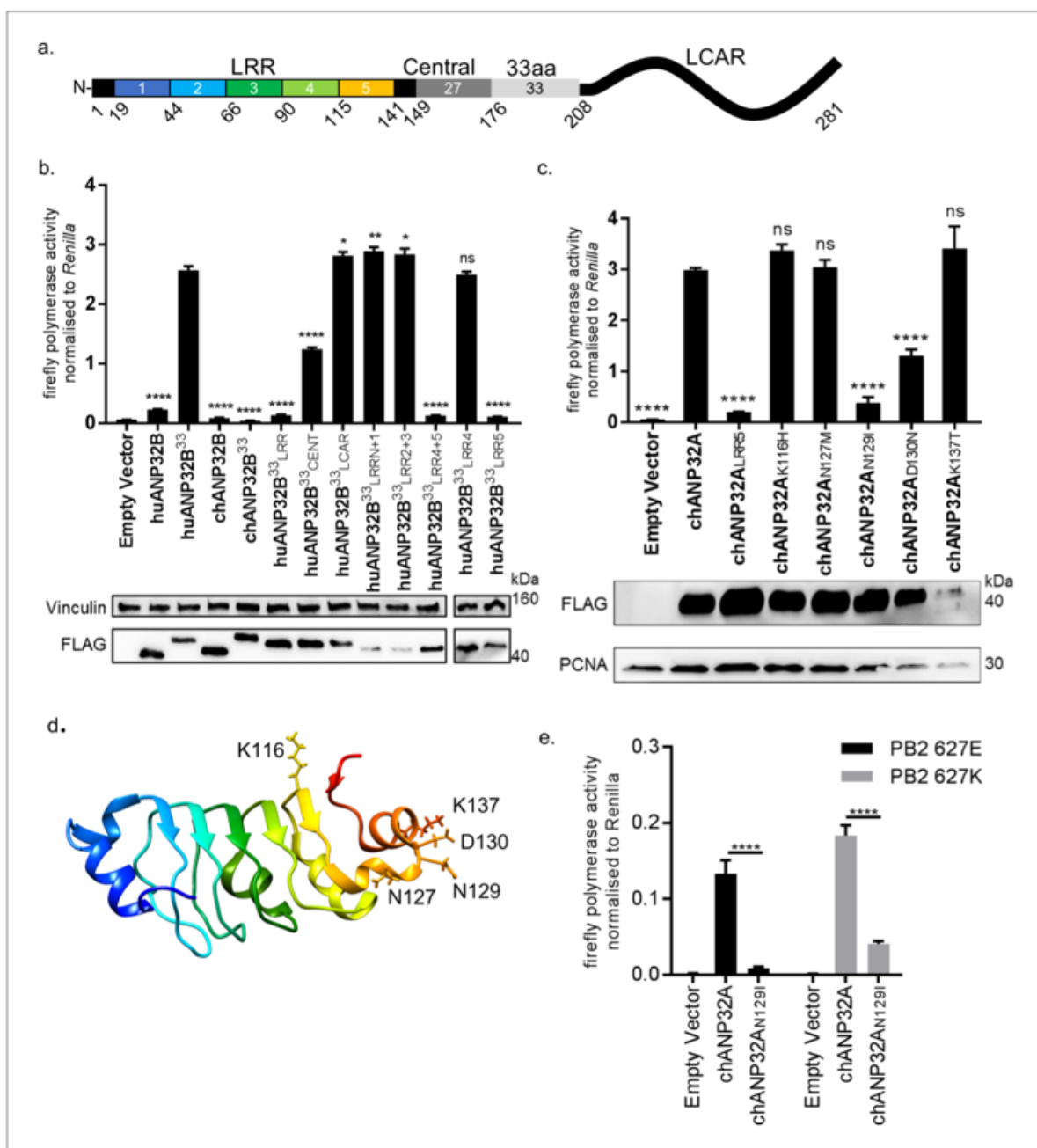
е установено, че са хомозиготни и при двата алела. В Проучването е описано, че редактираните PGC на птичи фибробластоподобни клетки са разграничени, използвайки серумна индукция с цел генериране на клетъчни линии за тестване на активността на птичата IAV полимераза. Прогнозираните промени на ANP32A протеина в тези клетки са потвърдени чрез анализ *Western blot* на получените от PGC фибробластни клетки. WT, D33 и получените от aKO и PGC клетъчни линии са тествани за функционалните ефекти на промяна или загуба на експресия на chANP32A върху активността на IAV полимеразата. Както птичата (PB2 627E), така и адаптираната при човека полимеразата (PB2 627K) са активни в WT фибробластните клетки. Отстраняването на 33-те аминокиселини от ANP32A води до ограничаване на 627E полимеразата, но не и на 627K полимеразата, отразявайки фенотипа на птичата IAV полимераза, наблюдаван в клетките на бозайници (*Long et al., 2016*). И двете полимерази са ограничени в клетки, в които липсва chANP32A (aKO). Експресията на екзогенен chANP32A в D33 и aKO клетки запазва активността на птичата IAV полимераза, демонстрирайки специфичността на генетичните промени. Липсата на активност на полимеразата в клетъчната линия на aKO PGC подкрепя хипотезата, че при липса на chANP32A останалите членове на семейството на ANP, включително chANP32B или chANP32E, не могат да поддържат активността на IAV полимеразата в птичите клетки, въпреки че ANP32B и E иРНК са лесно открити както в DF-1, така и в PGC клетки. Функционалните разлики между птичи ANP32A и ANP32B се свързват с LRR доменната последователност.

ANP32 протеините споделят обща доменна организация, в която N терминален домен, състоящ се от 5 последователни богати на левцин повторения (LRR 1-5), е последван от терминална шапка и централен домен и C терминален киселинен регион (LCAR). В птичи протеини ANP32A дублирането на последователност, получено отчасти от нуклеотиди, които кодират 27 аминокиселини (149-175), е довело до допълнителен екзон и вмъкване на до 33 аминокиселини между централния домен и LCAR. По-рано в проучването е показано, че вмъкването на 33-те аминокиселини от централния домен на chANP32A в еквивалентната област на човешките ANP32A или huANP32B протеини дава способността да се запазва активността на ограничена птича IAV полимераза в човешки клетки. Еквивалентното вкарване на 33 аминокиселини в chANP32B (chANP32B33) не поддържа активност на птичата IAV полимераза. За да се установят домовете на chANP32B, които го правят не функционален за IAV полимеразна активност, са генерирани химерни/хибридни модификации между човешки и птичи ANP32B. За да се измери запазването на птичата IAV полимераза в човешки 293 Т клетки, всички химерни модификации имат 33 аминокиселинни последователности, получени от chANP32A, вмъкнати между LRR и LCAR домовете. *Western blot* анализът и имунофлуоресценцията потвърждават, че всички хибридни структури са експресирани и локализирани в клетъчното ядро за дивия тип ANP32 протеини. Смяната на домена LCAR на chANP32B в huANP32B33 не пречи на запазването на птича IAV полимераза (huANP32B33LCAR). Въвеждането на централния домен на chANP32B в huANP32B (huANP32B33CENT) значително намалява ефективността на запазването и размяната на LRR домена на chANP32B (huANP32B33LRR) и прави протеина нефункционален на птичата IAV полимераза. Чрез последователна размяна на всяко повторение на LRR, е

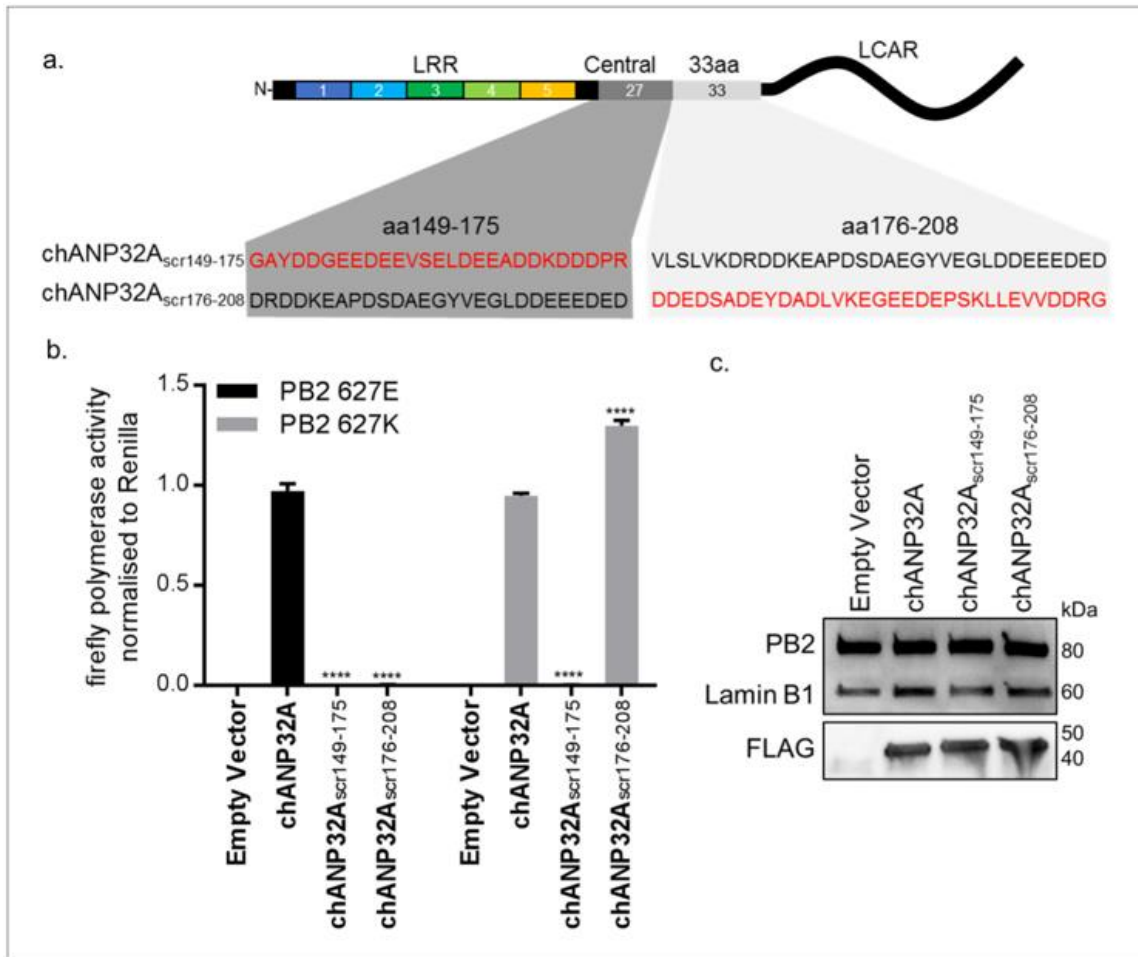
установено, че 5-ият LRR на chANP32B е доменът, който предотвратява запазването на активността на птичата IAV полимераза. Петият LRR съдържа пет аминокиселинни разлики между човешки и пилешки ANP32B, плюс допълнителна една разлика към chANP32A. Смяната на петия LRR на chANP32B в chANP32A също предотвратява запазването на активността на птичата IAV полимераза в човешки клетки (chANP32ALRR5). Въвеждането на единичните аминокиселинни промени, получени от chANP32B LRR5 последователността в chANP32A, разкрива, че мутациите N129I и D130N значително намаляват способността на chANP32A да запазва птичата IAV полимеразна активност в човешки клетки. Геномните анализи с коекспресиран chANP32A или chANP32AN129I в аКО пилешки фибробластни клетки потвърждават, че мутацията 129I значително намалява способността на chANP32A да поддържа IAV полимеразна активност с птичи произход (PB2 627E) или адаптирана от човека (PB2 627K).

Последователността на аминокиселините 149–175 от централния домен на chANP32A е необходима за подпомагане на активността както на птичи, така и на човешки IAV полимерази.

Резултатите по-горе показват, че вмъкването на 33 аминокиселини, петият LRR и централният домен са важни за способността на chANP32A да поддържа функцията на птичата IAV полимераза. След анализ на аКО клетки с полимерази, съдържащи PB2 627E и 627K, с ко-експресия на допълнителни chANP32 мутанти, включително: chANP32A, в който 27 аминокиселини в централния домен, предшестващи 33-те аминокиселинни вмъквания, са разбъркани (chANP32A<sub>scr149-175</sub>) или chANP32A с вмъкване на 33 аминокиселини (chANP32A<sub>scr176-208</sub>), се доказва, че и двата мутанта са експресирани и локализирани в ядрото. Първият мутант, chANP32A<sub>scr149-175</sub>, не поддържа нито PB2 627E, нито 627K полимеразна активност, което предполага, че последователността на централния домен е важна за функцията на IAV полимеразата. Вторият мутант, chANP32A<sub>scr176-208</sub>, поддържа само функцията PB2 627K, потвърждавайки, че последователността на вмъкването на 33 аминокиселини е необходима за птичата IAV полимераза (PB2 627E).



Фиг. 6: Схематично представена структурата на протеини ANP32A и ANP32B при човека и при птиците преди и след генната редакция. Липса на функционална поддръжка за IAV полимераза от пилешки ANP32B съответстваща на разликите в домена LRR5. (a) Схема на птичи ANP32A протеин, подчертаващ различните домени и LRR последователности (LRR 1-5). (b) Човешки 293 T клетки са трансфектирани с птичи H5N1 50–92 полимераза (PB2 627E) заедно с NP, рНОМ1, или празен вектор или FLAG-маркиран ANP32 експресионен плазмид (c) Анализ на генома в 293 T клетки (PB2 627E) с FLAG-маркирани WT или мутантни chANP32A експресионни плаزمиди (d) кристална структура huANP32A (e) геномен анализ на птича H5N1 50–92 полимераза с PB2 627E или 627K в получени от PGC фибробластни aKO клетки, заедно с ко-експресиран празен вектор, chANP32A или chANP32AN129I.



Фиг. 7: Последователността на аминокиселини 149–175 от централния домен на chANP32A са необходими за подпомагане на активността както на птичи, така и на човешки IAV полимерази. (а) Схема на chANP32A, показваща последователността на аминокиселините в централния домен (149–175 или 33 аминокиселинни вмъквания (176-208) и произволно разбърканата последователност в червено. (б) геномен анализ на птичи H5N1 50–92 полимерази или с PB2 627E, или с 627K в получени от PGC фибробластни aKO клетки с ко-експресиран празен плазмид или маркирани с FLAG WT chANP32A, chANP32A<sub>scr149-175</sub> или chANP32A<sub>scr176-208</sub> експресионни плаزمиди. (в) Western blot анализ на PB2 (627I)

### Единична аминокиселинна разлика между chANP32B и chANP32A отменя свързването на chANP32A с IAV полимераза:

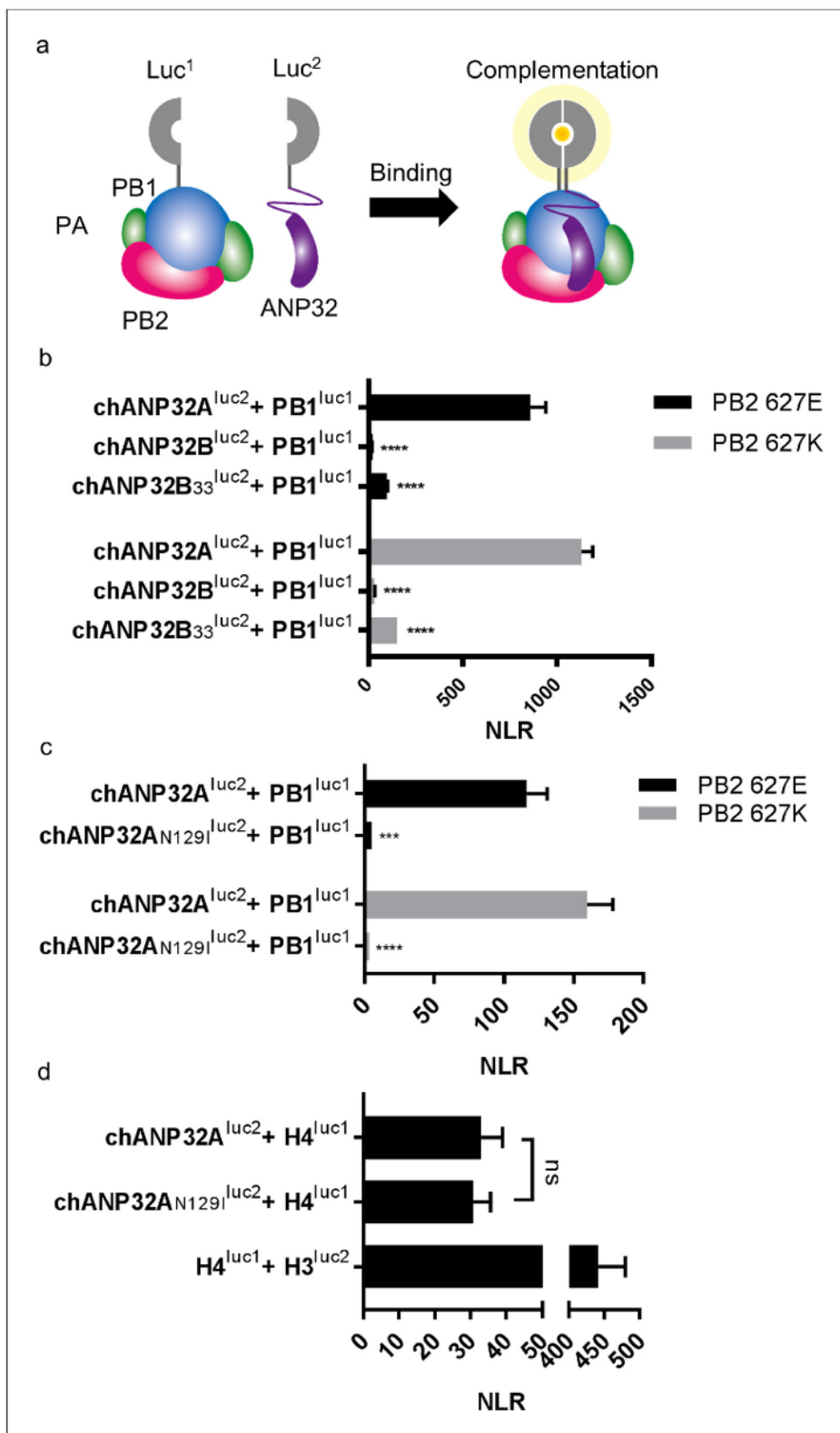
В проучването е демонстрирано взаимодействие между ANP32A и IAV полимераза, което зависи от наличието и на трите субединици на полимеразата (Mistry et al. и Baker et al., 2018; Domingues and Hale, 2017). За да бъде изследвано взаимодействието между IAV полимеразата и chANP32 протеини, в проучването са използвани анализ на комплементаризация на разцепена луцифераза като количествена мярка за свързване (Munier et al., 2013; Cassonnet et al., 2011). С-краят на PB1 субединицата от птичи произход IAV полимеразата се свързва от една страна с PB1<sub>luc1</sub> и С-краят на птичите ANP32A или В от друга (chANP32A<sub>luc2</sub> и chANP32B<sub>luc2</sub>). Възстановяването на PB1<sup>luc1</sup>, PB2 и PA заедно с chANP32A<sup>luc2</sup> в човешки 293 Т клетки дава нормализирано съотношение на луцифераза (NLR) с полимеразата, съдържащи или



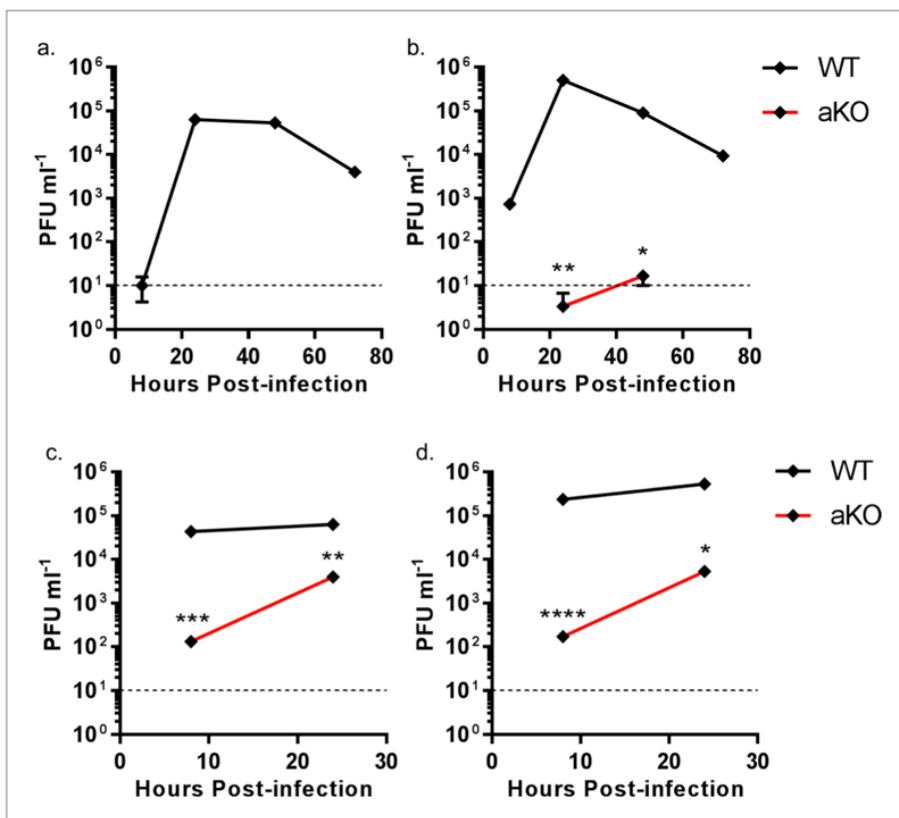
PB2 627E или 627K. Когато chANP32A носи единична мутация N129I (chANP32AN129I<sup>luc2</sup>), комплементаризацията на луцифераза е намалена 22 пъти за PB2 627E полимераза и 52 пъти за PB2 627K полимераза. Тези резултати предполагат, че загубата на функцията на полимераза от chANP32AN129I се дължи на нарушаване на свързването с IAV полимеразата.

### **Вирусната репликация се ограничава или възпрепятства напълно в птичи клетки без ANP32A:**

Данните по-горе показват, че chANP32B не може да замести chANP32A в подкрепа на IAV полимеразата в птичите клетки. Тъй като птичите клетки, които нямат експресия на chANP32A, не показват полимеразна активност при анализ, те може да са рефрактерни към инфекцията с IAV. Кинетиката на рекомбинантните грипни вируси А е проследена в WT и получени от РКО GKO фибробластни клетки. За симулиране на силна инфекция са генерирани рекомбинантни вируси, носещи H1N1 ваксинален щам PR8 хемаглутинин (HA), неураминидаза (NA) и М гени. Инфекциозните титри на рекомбинантния вирус с гени от птичи вирус H5N1 50–92 не са открити в птичите клетки, в които липсва ANP32A, заразени при нисък MOI. При по-високи MOI вирусните титри са значително намалени в сравнение с WT птичи клетки, почти 325 пъти по-малко на 8мия час след инфекцията и 16 пъти по-малко на 24ти час. По същия начин, при нисък MOI, рекомбинантния вирус с вмъкнати гени от вируса H7N9A/Anhui/1/2013, е имал ограничен растеж в клетките aKO, но се реплицира ефективно във фибробласти WT. При по-високи MOI, пиковите вирусни титри са 1365 пъти по-ниски, отколкото в WT клетките на 8мия час след инфекцията и 100 пъти по-малко на 24тия час. В заключение, получените от PGC фибробластни клетки, на които липсва chANP32A, са устойчиви на IAV репликация, особено при по-ниско разпространение на инфекцията.



Фиг. 8. Единична промяна на аминокиселината (N129I), получена от *chANP32B*, нарушава *chANP32A* подкрепата на активността на грипната полимераза чрез премахване на свързването с IAV полимераза. (a) Диаграма на разцепената луциферазна система на *Gaussia*, демонстрираща как ANP32, свързан с луциферазен фрагмент *luc2*, може да се свърже с полимераза, съдържаща PB1, свързан към луциферазен фрагмент *luc1*. (b) Човешки 293 T клетки са трансфектирани с PB1, свързани с *luc1* (PB1<sup>luc1</sup>), PB2 (627E или K), PA и *chANP32A*, *chANP32B* или *chANP32B33*, свързани с *luc2*.



Фиг.9: Вирусната репликация се възпрепятства в птичи PGC фибробластни клетки без ANP32A. WT (черни линии) или aKO (червени линии), получени от PGC фибробластни клетки са заразени с рекомбинантни вируси (съдържащи PR8 HA, NA и M гени и вмъкнати гени от H5N1 50–92 или H7N9 Anhui), при MOI от 0,0001 (a, b) или 1.0 (c, d), измерени чрез анализ на MDCK клетки.

Това мащабно проучване показва, че IAV полимеразите от птици произход „разчитат“ изключително на член на ANP32A при птиците за да се осъществи репликация. Открито е, че птиците ANP32B протеини образуват отделна филогенетична група с други ANP32B и че птичи хомолог ANP32B присъства при земноводните и някои бозайници. Открито е, че много малка част от гена ANP32 остава при хората. Човешкият ANP32C е ген, който е най-тясно свързан с ANP32A (Reilly et al., 2014) и не е свързан с птичия ANP32B.

Пилетата ANP32B не могат да поддържат грипна полимеразна функция поради аминокиселинната разлика в LRR5 при остатък 129, която влияе неблагоприятно на взаимодействието между chANP32B и грипната полимераза. Други птици ANP32B протеини, включително тези при патици и пуйки, носят изолевцин в остатък 129, което предполага, че откритията в това обстойно проучване биха могли да бъдат приложими и други птици гостоприемници. Заместването на открития полярен остатък, аспарагин (N129) с хидрофобния изолевцин (I), може да е довело до нарушаване на ключово взаимодействие между ANP32A и комплекса на вирусната полимераза. В допълнение към остатъка 129I, централният домен (аминокиселини 141–175) на chANP32B също допринася за лошата му ефективност при запазване на птичата IAV полимеразна функция в човешки клетки. Това, заедно с наблюдението, че кодирането на

аминокиселини 149–175 в chANP32A предотвратява както човешка, така и птича IAV полимеразна функция предполага, че LRR5 и централният домен на ANP32A са от решаващо значение за IAV полимеразната функция. Откритието, че chANP32B е нефункционален за IAV полимеразата, е наскоро потвърдено и от друга изследователска група (*Zhang et al., 2019*). Наблюдението, че кодирането на 33-аминокиселинната инсерция предотвратява запазването на птичата IAV полимераза е в съответствие с резултатите на *Domingues and Hale; Baker et al*, които показват, че мотивът SUMO за взаимодействие (SIM подобен), присъстващ в инсерцията на 33те аминокиселини (VLSLV) се изисква за силно свързване както с 627E, така и с 627K полимеразата и нейната делеция или мутация намалява способността му да поддържа активността на птичата IAV полимераза в човешки клетки (*Baker et al., 2018; Domingues and Hale, 2017*). Разбирането на домените, важни за свързването и функционирането, може да спомогне за разбирането механизма, чрез който ANP32A или B поддържат IAV полимеразата, която все още не е напълно изяснена (*Sugiyama et al., 2015*).

Птичите клетки, в които липсва ANP32A, не поддържат активността на птича или човешка IAV полимераза, въпреки това, при по-висок MOI, се наблюдава репликация на вируса в клетките aKO, макар че е значително по-ниска, отколкото в WT PGC клетките. Независимо от това, **значително намаленото ниво на репликация на вируса, наблюдавано в пилешките клетки, в които липсва chANP32A *in vitro*, предполага, че *in vivo* пилета, които не експресират ANP32A или експресират променен протеин, могат да бъдат устойчиви на инфекция от IAV.** Разминаването между липсата на полимеразна активност в геномния анализ при липса на ANP32A, но ограничена репликация, наблюдавана при използване на инфекциозен вирус в същите клетки, може в крайна сметка да разкрие интересни прозрения за това как ANP32A поддържа полимеразата. Използването на птичи клетки, получени от PGC, за изследване на фактор гостоприемник, от съществено значение за вируса, увеличава възможността за генериране на генетично редактирани птичи модели, устойчиви на инфекция. Пилешките PGC могат да бъдат ефективно геномно редактирани, за да генерират специфични хаплотипове (*Idoko-Akoh et al., 2018, Smith et al., 2015; Wang et al., 2014*).

В обобщение, тези данни могат да помогнат при проектирането на нови инхибитори на малки молекули, които нарушават взаимовръзката ANP32-полимераза и формират основата на потенциален път за генериране на устойчиви на грип животни.

### **Други разработки в направление опазване на животинското здраве, превенции от инфекции и хуманно отношение към животните:**

Израелска компания, известна с иновативното си решение за сексиране на яйца, и по-специално професор *Dani Offen* от университета в Тел Авив и *Yehuda Elram*, се занимават с CRISPR технологията, революционна и носител на Нобелова награда гена редакция, с цел да се сложи край на избиването на мъжки еднодневни пилета. Генетичният продукт seXYt действа чрез поставяне на генетичен биомаркер върху мъжката хромозома на пилетата. „Успехът на това решение се дължи на това, че женските пилета, които всъщност достигат до пазара, остават генетично недокоснати, с

ДНК, идентична с женските пилета в индустрията днес. Биомаркерът служи като „вратар на входа на люпилните.“

*“The beauty of this solution is that the female chicks, which actually reach the market, remain genetically untouched, with DNA identical to the female chicks in the industry today. The biomarker is detectable by our scanner, which serves as a gatekeeper at the entrance of hatcheries.”*

Наскоро компанията увеличи полето си на изява с проекти в областта на превенцията на болести по животните, лицензирайки технологичната платформа **GEiGS (Gene Editing induced Gene Silencing)** от *Tropic Biosciences* в проект за развитие на **устойчивост срещу птичи грип (AI) при пилета**. „В началото идентифицирахме профилактиката на болестите при домашните птици като проблем, който си заслужава да бъде решен. По-специално с инфлуенцата по птиците, когато се съобщава за огнище, обикновено всички птици в определен радиус трябва да бъдат унищожени по закон, независимо дали са заразени или не“, *Yehuda Elram*. Тази жестока реалност идва със солидна цена, избухването на епидемия от инфлуенца по птиците през 2015 г. в САЩ например доведе до смъртта на 50 милиона птици и икономически разходи от 3,3 милиарда щатски долара. Днес повечето страни се занимават с мониторинг, превенция и защита чрез ваксини и подобрени мерки за биосигурност срещу това инфекциозно заболяване, но това не е достатъчно, за да се предотвратят и овладеят всички огнища (*„Today, some countries address AI by vaccines and upgraded biosecurity measures, but this is simply not sufficient to prevent all outbreaks“*). Екипът от учени, ръководен от въпроса как може да се справим с това предизвикателство - инфлуенца по птиците, използва редактирането на гени, с цел създаване на пилетата на „генетичен имунитет“ срещу множество заболявания, в този случай - инфлуенца по птиците (*„By using gene editing, our team can give chickens genetic immunity against a host of diseases; in this first instance, that is avian influenza“*)

В това иновативно пилотно проучване екипът на *Yehuda Elram* използва редактирането на гени в птичия геном, които не кодират самите протеини, а по-скоро регулират експресията на други свързани с репликацията на вируса протеини. Тези гени ще бъдат препрограмирани и пренасочени към таргетния вирус, предотвратявайки репликацията му в клетката. Позитивните страни на разработките от тази платформа **GEiGS** са, че направените промени в генома са минимални. (*“The value of this platform is that the changes made to the genome are minimal; we hope this will accelerate regulatory approval processes and allow us to bring our product to the market, ”*).

Все повече тези технологии за генно редактиране навлизат и са необходими преразглеждане на ръководните документи, свързани с ГМО и генно редактираните организми, необходима е обмяна на опит и информация по темата, необходима е задълбочена изчерпателна и независима оценка на риска от тези редактирани организми и още повече научни проекти и проучвания върху безопасността от пускането на пазара и в околната среда на такъв тип генно редактирани животни. Във Великобритания от правителството вече е започната консултация и обществено обсъждане за отслабване



на ограниченията за генетично редактирани продукти, а в ЕС ръководните документи, регламентите и директивите както и законите и политиките за ГМО се преразглеждат и ще бъдат променени, за да обхващат генно редактирани организми, да бъдат отдиференцирани ясно двата типа организми – генно модифицирани и генно редактирани и да бъдат смекчени мерките и решенията, свързани с генетично редактираните продукти.

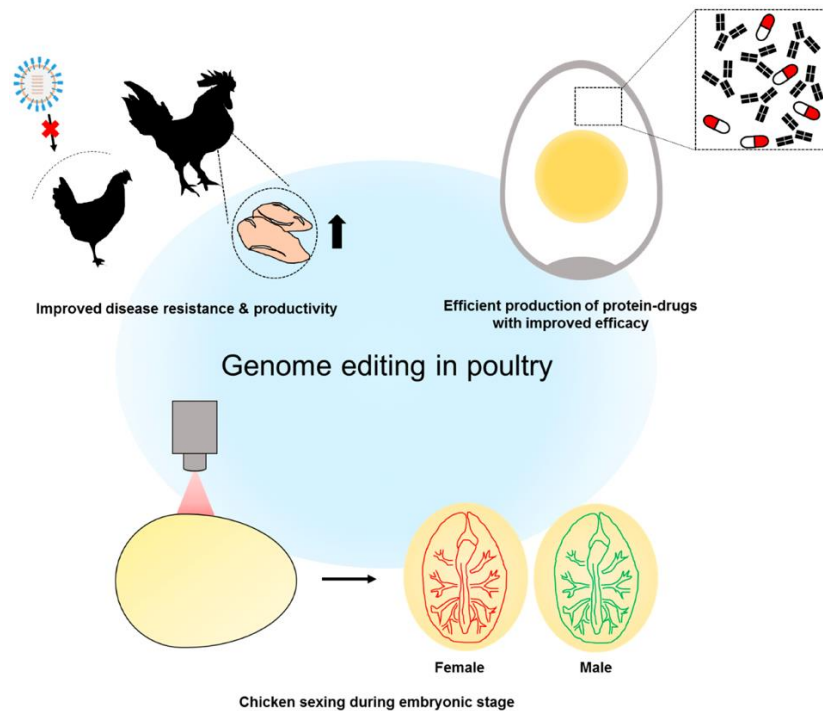
„Ние вярваме, че редактирането на гени е бъдещето на цялото развъждане. Той е по-бърз, по-точен, по-евтин и може да направи повече в сравнение с традиционното развъждане. Разбира се, ние подкрепяме внедряването му по безопасен и регулиран начин и вярваме, че трябва да се подхожда от регулаторните органи и обществеността с деликатност и предпазливост. Нашите решения насърчават хуманното отношение към животните, независимо дали чрез предотвратяване на жестоката практика за умъртвяване на мъжките пилета или чрез предотвратяване на разпространението на болести, и вярваме, че потребителите ще видят ясната полза от нашите решения и тяхното положително въздействие върху живота на животните.“, обяснява професор *Elram*.

*“From our outlook, we see that governments are embracing gene editing, and even the regions which have traditionally been the least favourable are adapting,” Elram explains, and this rings true: in the UK, the government launched a consultation to loosen restrictions on gene-edited products, and in the EU, past policies are being revised to be more lenient towards gene-edited products. We believe gene editing is the future of all breeding. It is faster, more precise, cheaper, and able to do more compared to traditional breeding. Of course, we support its deployment in a safe and regulated fashion and believe it should be approached by regulatory bodies and the public with delicacy and precaution. Our solutions promote animal welfare, whether by preventing the cruel practice of chick culling or by preventing the spread of disease, and we believe consumers will see the clear benefit of our solutions and their positive impact on the lives of animals.”.*

### **Заключение:**

Технологията за геномно или генно редактиране, медирана от CRISPR/Cas9, се развива бързо през последното десетилетие и се прилага за производството на различни животни с редактиран геном, включително птици. Птиците са основен източник на протеини и тази роля ще стане още по-важна в бъдеще. Редактирането на генома при домашните птици предоставя многобройни възможности за решаване на проблемите с недостига на храна в селското стопанство. Чрез комбиниране на усъвършенствана геномика на животните, базирана на технология за геномно секвениране, редактирането на генома и отглеждането на животни могат да се комбинират помежду си, за да се генерират нови линии домашни птици с желани черти като толерантност или устойчивост на болести. В допълнение, геномно редактираните домашни птици имат потенциал като алтернативна “биореакторна платформа” за производство на терапевтични протеини.

Колективно бързо развиващата се технология за редактиране на генома ще ускори напредъка и в областта на биотехнологиите, като отвори нови възможности за принос в различните индустрии.



Макар огромният потенциал на *omics* технологиите и генното инженерство да личи от хилядите проучвания върху животни и микроорганизми и върху редактирането на техния геном или на определени генни локуси, то не бива да се negliжира факта, че тези технологии са сравнително нови, недобре проучени и с недостатъчно убедителни резултати в практиката, а не в лабораторна контролирана среда. Част от негативните възможни последици от синтетичните или генно редактираните организми биха били следните:

- Непредвидимостта на взаимодействието на този тип хибриди с редактиран геном с тяхната биотична и абиотична среда и поведението им в околната среда. Непредвидимото поведение на синтетичните организми би могло да доведе до неконтролирана експозиция и до повишен риск за здравето на хора и животни. Би могъл да се наруши био баланса и биоразнообразието в околната среда.
- Въпреки че техниките за редактиране на гени често се описват като „прецизни“ в сравнение със стандартното генно инженерство, тези техники, също като стандартното генно инженерство, могат да причинят неволни промени в генетичния материал. Такива неволни промени или генетични грешки могат да доведат до неочаквани ефекти. Освен това, дори когато възникне предвидената промяна, е възможно да се появят и неочаквани ефекти, тъй като организмите, които са генно редактирани, могат да се държат в естествена среда по начин, различен от очакваното според лабораторните експерименти. За съжаление напълно липсват проучвания относно възможните последици за безопасността на храните и околната среда от неочакваните ефекти, произтичащи от процеса на редактиране на гени и/или от инженерно внесените черти. Един от основните

начини, по които редактирането на гени може предизвиква неточности и генетични грешки, е произвеждането на „нецелеви“ ефекти – промени в други гени, които не са умишлено предизвикани. Нецелевите ефекти могат непреднамерено да изменят важни гени, което води до промени в химическия им състав или в производството на протеини. Нецелевите ефекти възникват вследствие на процеса на генно редактиране и настъпват на едно или повече непредвидени места с подобни ДНК последователности като целевият локус. Нецелевите ефекти също така са причина за безпокойство при генно редактираните селскостопански животни като прасета и едър рогат добитък, а такива ефекти са открити също и при генно редактирани клетки на мишки и хора.

- Неочаквани ефекти „в целта“ В допълнение към нецелевите ефекти редактирането на гени може да даде различен от очаквания резултат, дори когато планираната промяна се извършва на желаното целево място. Едно дребно вмъкване или заличаване в ДНК на даден ген, дори попаднало в целта, може да предизвика нежелани промени в начина, по който генът се „чете“ и преработва до протеини. Заличаването и пренареждането на ДНК, причинени от CRISPR, могат да доведат до пропускане на важни части от гена (отговорни за кодирането при производството на протеини) при „прочитането“ на ДНК. Тази грешка в прочитането на ДНК има потенциала да произведе изменени протеини.
- Смутения в регулацията на гените: Освен че може да изменя ДНК на организма, редактирането на гени може да има нежелано въздействие върху способността на организма да изразява или потиска други гени. Гените в даден организъм се включват (експресират / *knock in*) и се изключват (*knock out*) в различни части на организма и в различно време, съобразно и факторите на околната среда. Освен това гените взаимодействат един с друг като потискат или подсилват изражението си. Организирането на работата на гените в организма е част от сложна регулаторна мрежа. Но точният начин, по който работи тази регулаторна мрежа, е сложен и все още слабо разбран, както се вижда от последните постижения в познанията за това как се регулира генната експресия. Поради липсващи познания относно начина на регулиране на геномите не е възможно да се предскажат естеството и последиците от всички взаимодействия между (умишлено или неволно) изменения генетичен материал и други (нередитирани) гени в организма. Това означава, че редактирането на гени в ДНК може неволно да повлияе на функционирането на регулаторната мрежа на организма. Възможно е вследствие на това собствените (нередитирани) гени на организма да не се експресират така, както би трябвало, например в неподходящо количество, с погрешен състав или в неправилното време. Както е видно от тези примери, разбирането на учените за генетиката и за това как се регулират гените е все още твърде условно. Дори генното редактиране да е „прецизно“, резултатите не винаги са точни. Точно както всички генетично модифицирани организми, генно редактираните организми могат да проявяват неочаквани и непредвидими ефекти в резултат на непредвидени взаимодействия между променения генетичен материал, собствените (нередитирани) гени на организма и неговата регулаторна мрежа. Всяко неочаквано и непредсказуемо въздействие може да

доведе до промени в биохимичните пътища или в състава на протеините, които на свой ред засягат безопасността на храните, околната среда и човешкото и животинското здраве.

- Планирано и непреднамерено вмъкване на ДНК: В процес на разработка са много разновидности на редактирането на гени. Но, неизбежно, не всички вмъкнати ДНК могат да бъдат премахнати. Въпреки това не съществуват процедури (за безопасност или други) за оценка на тази възможност. Независимо дали ДНК се добавя умишлено или не, множество копия и допълнителни фрагменти от ДНК касетата могат да бъдат въведени в генома на организма. Вмъкването на ДНК също така може да предизвика пренареждане на части от собствената ДНК на организма, както често се случва при стандартните генетично модифицирани култури.
- Потенциални ефекти на генетично редактираните организми върху биоразнообразието и околната среда: Има много публикации за доказване на ефекта от генното редактиране, но нито един от потенциалните продукти от редактирането на гени не е изследван от гледна точка на значението на техните модифицирани характеристики (или неочакваните им ефекти) за околната среда и биологичното разнообразие. В научното познание по тези въпроси има големи пропуски.

Трябва да се направят допълнителни проучвания за безопасността при използването на тези технологии в производствата и отглеждането и развъждането на продуктивни животни, трябва да бъдат натрупани още много знания и да се направят оценки на риска от контролираното пускане в околната среда и за масова консумация на такива хибридни генно редактирани видове.

### Използвана литература:

- Species specific differences in use of ANP32 proteins by influenza A virus - Jason S Long, Alewo Idoko-Akoh, Bhakti Mistry, Daniel Goldhill, Ecco Staller, Jocelyn Schreyer, Craig Ross, Steve Goodbourn, Holly Shelton, Michael A Skinner, Helen Sang, Michael J McGrew, Wendy Barclay
- Gene-edited chicken cells resist bird flu virus in the lab - University of Edinburgh - <https://www.sciencedaily.com/releases/2019/06/190604084855.htm>
- <https://www.poultryworld.net/Genetics/Articles/2021/1/Gene-editing-makes-chickens-resistant-against-avian-flu-703082E/> - Gene editing makes chickens resistant against avian flu
- [https://corhv.government.bg/?cat=71&news\\_id=1341](https://corhv.government.bg/?cat=71&news_id=1341) - ОЦЕНКА НА РИСКА ОТ ВИСОКО ПАТОГЕННА ИНФЛУЕНЦА А ПО ПТИЦИТЕ
- <https://www.tropicbioscience.com/copy-of-home-1> - eggXYt licenses the GEiGS™ Technology Platform from Tropic Biosciences in a groundbreaking project to develop resistance against Avian Influenza Virus in chickens
- <https://www.wattagnet.com/articles/41748-gene-editing-tool-could-protect-against-avian-influenza?v=preview>

- <https://www.feedstrategy.com/pig-health-disease/gene-editing-could-alleviate-asfs-impact-on-industry/>
- Precise Genome Editing in Poultry and Its Application to Industries - Jin Se Park, Kyung Youn Lee, Jae Yong Han - <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33053652/>
- Precise CRISPR/Cas9 editing of the NHE1 gene renders chickens resistant to the J subgroup of avian leukosis virus - Anna Koslová, Pavel Trefil, Jitka Mucksová, Markéta Reinišová, Jiří Plachý, Jiří Kalina, Dana Kučerová, Josef Geryk, Veronika Krchlíková, Barbora Lejčková, and Jiří Hejnar - <https://doi.org/10.1073/pnas.1913827117>
- РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР ИНФОРМАЦИОННО-АНАЛИТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР ЭПИЗООТИЧЕСКАЯ СИТУАЦИЯ В СТРАНАХ МИРА
- Transgenesis and genome editing in chickens - Xiaofei Wang, Laruen E. Shields , Rebecca L. Welch, Alexis Pigg and Karim Kaleh
- CRISPR/Cas9 gene editing in a chicken model: current approaches and applications - Luiza Chojnacka-Puchta & Dorota Sawicka
- Applications of Gene Editing in Chickens: A New Era Is on the Horizon - Hicham Sid and Benjamin Schusser
- Genome editing in poultry - opportunities and impacts - Tim Doran, Arjun Challagulla, Caitlin Cooper, Mark Tizard and Kristie Jenkins. Australian Animal Health Laboratory
- Germline Gene Editing in Chickens by Efficient CRISPR-Mediated Homologous Recombination in Primordial Germ Cells - Lazar Dimitrov, Darlene Pedersen, Kathryn H. Ching, Henry Yi, Ellen J. Collarini, Shelley Izquierdo, Marie-Cecile van de Lavoie, Philip A. Leighton

Изготвил:

Красимира Захариева,

Главен експерт в дирекция ОРХВ, ЦОРХВ