

Możliwości wykorzystania techniki CRISPR/Cas9 w hodowli świń

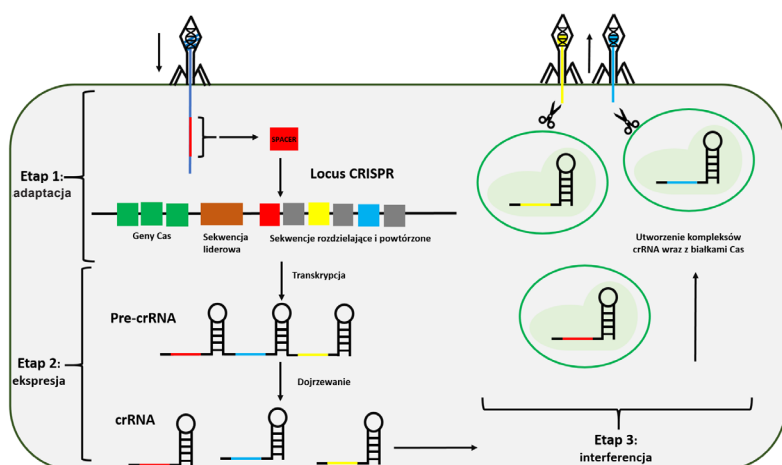
Jędrzej Rozynek, Mehmet O. Aksoy,
Izabela Szczerbal

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu,
Wydział Medycyny Weterynaryjnej i Nauk o Zwierzętach,
Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt

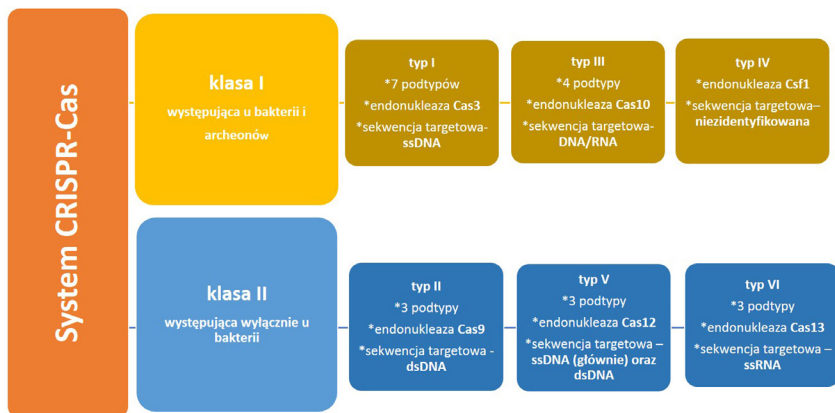
Metoda CRISPR/Cas (ang. *Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR associated protein*) to nowoczesne narzędzie inżynierii genetycznej, pozwalające na edytowanie genomu poprzez wprowadzenie w ściśle określonych miejscach DNA dwuniciowych pęknięć. Możliwość precyzyjnego cięcia nici DNA spowodowała, że metoda ta jest też popularnie określana jako „molekularne nożyczki”. CRISPR/Cas bazuje na bakteryjnym systemie obrony przed bakteriofagami. Pierwsze doniesienia o występowaniu w genomie *Escherichia coli* sekwencji w dosłownym tłumaczeniu opisywanych jako: zgrupowane, regularnie rozmieszczone, krótkie powtórzenia palindromiczne, oddzielone przez różnorodne sekwencje unikatowe, tzw. sekwencje rozdzielające (ang. *spacers*), pochodzą już z 1987 r. [11]. Podobne sekwencje, różniące się jednak długością, odkryto w kolejnych latach u innych gatunków bakterii i archeonów i wykazano, że są związane z obecnością w ich sąsiedztwie genów *Cas*, kodujących białka o różnych funkcjach np. nukleaz, polimeraz, helikaz czy wiążących DNA i RNA. Przez kolejne lata funkcja locus CRISPR była nieznana, dopóki nie wykazano, że sekwencje te są identyczne z plazmidowym czy wirusowym DNA, co sugerowało, że sekwencje CRISPR są śladami po infekcjach fagowych i inwazji obcych elementów genetycznych [17, 20]. CRISPR/Cas rozpoznano jako adaptacyjny system nabytej odporności mikroorganizmów, który opiera się na przechowywaniu w genomie fragmentów egzogenego DNA i stanowi on prymitywny odpowiednik ludzkiego mechanizmu odporności swojej. W działaniu systemu CRISPR/Cas wyróżnia się trzy etapy: adaptację, ekspresję i interferencję [2] (rys. 1). Podczas adaptacji, krótki fragment pochodzący z DNA wirusowego lub plazmidowego (określany jako protospacer) jest włączany do locus CRISPR. Długość włączanych sekwencji może istotnie różnić się między organizmami, ale najczęściej wynosi ok. 30 nukleotydów. Insercja zachodzi na jednym z końców locus, tzw. końcu liderowym (sekwencja li-

derowa). Integracji towarzyszy duplikacja końcowej sekwencji powtórzonej tak, aby zachowana została struktura obejmująca powtórzenie proste i sekwencję rozdzielającą. W proces ten zaangażowane są endonukleazy Cas1 i Cas2. Sekwencja włączona do locus CRISPR musi zawierać motyw PAM (ang. *protospacer adjacent motif*), który składa się z kilku (ok. 2-5) nukleotydów, na jednym z końców tej sekwencji. Na etapie ekspresji powstaje pierwotny transkrypt (pre-crRNA), obejmujący sekwencje powtórzone i sekwencje rozdzielające, który po obróbce przez endorybonukleazy (m.in. Cas6 lub Cas9) staje się dojrzałym CRISPR RNA (crRNA). Proces dojrzewania kontroluje mała cząsteczka RNA, częściowo komplementarna do pre-crRNA, nazwana tracrRNA (ang. *trans-activating crRNA*), kodowana przez locus CRISPR. Etap interferencji polega na utworzeniu kompleksu rybonukleoproteinowego zawierającego crRNA wraz z białkami Cas, który rozpoznaje komplementarne sekwencje kwasów nukleinowych i prowadzi do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych w obrębie obcego DNA. W wyniku działania nukleaz z rodziny Cas obie nici obcego DNA w obrębie sekwencji komplementarnej do crRNA ulegają przecięciu. Klasyfikacja systemów CRISPR/Cas w oparciu o białka efektorowe obejmuje 2 klasy (I i II), w których wyróżnia się odpowiednio typy I, III i IV oraz II, V, VI [4, 14] (rys. 2). Do edytowania genomu najczęściej używana jest klasa II pochodząca od bakterii *Streptococcus pyogenes*. W obrębie tej klasy najlepiej poznane jest białko efektorowe Cas9 o aktywności endonukleazy.

W 2012 roku wykazano, że system CRISPR/Cas9 można tak zaprogramować, aby modyfikował DNA innych organizmów, a odkrywczynie tej techniki – Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier w 2020 roku otrzymały Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii [8, 12]. Głównymi elementami składowymi systemu do modyfikacji genomu przy użyciu metody CRISPR/Cas9 są: sgRNA (ang. *single guide RNA*) odpowiedzialny za naprowadzenie Cas9 na odpowiedni fragment docelowego DNA



Rys. 1. CRISPR/Cas jako adaptacyjny system nabytej odporności mikroorganizmów



Rys. 2. Klasyfikacja systemów CRISPR/Cas

oraz białko Cas9, które zawiera dwie domeny, z których pierwsza (HNH) dokonuje cięcia nici komplementarnej względem sgRNA, a druga (RuvC) przecina sekwencję niekomplementarną (rys. 3). sgRNA składa się z dwóch składowych – crRNA o długości 17-20 nukleotydów komplementarnego do docelowego DNA oraz tracrRNA, który służy jako rusztowanie dla nukleazy Cas. Aby sgRNA mógł się związać z docelową sekwencją DNA, musi być w niej obecna sekwencja PAM. Nukleazy Cas wyizolowane z różnych gatunków bakterii rozpoznają różne sekwencje PAM i dokonują cięcia kilka nukleotydów przed sekwencją PAM. Nukleaza Cas9 przecina 3-4 nukleotydy powyżej sekwencji PAM 5'-NGG-3'. Efektem cięcia jest wytworzenie tępych końców w docelowym DNA, które są następnie naprawiane na drodze niehomologicznej naprawy rekombinacyjnej NHEJ (ang. *Non-Homologous End Joining*) lub rekombinacji homologicznej HDR (ang. *Homology-Direct Repair*). System naprawy NHEJ wykazuje aktywność we wszystkich komórkach, jest bardzo efektywny, ale też podatny na błędy np. wprowadzając małe insercje czy dele-

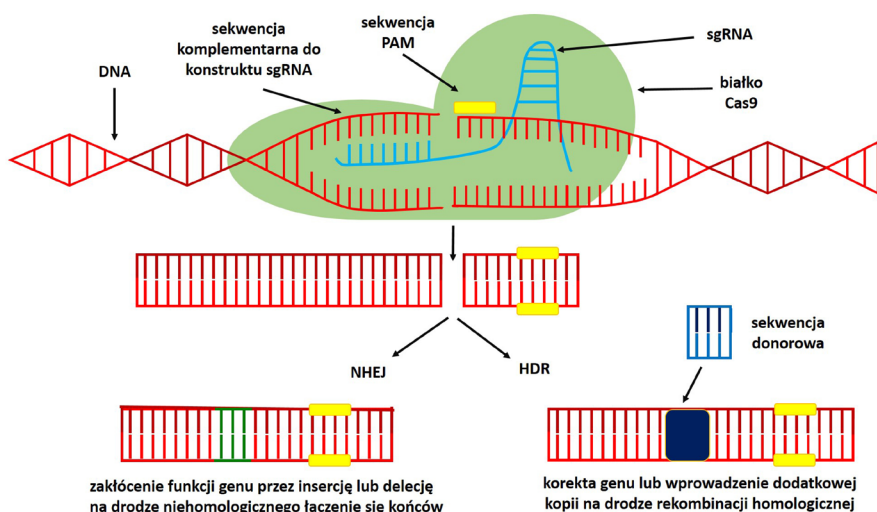
cje w obrębie modyfikowanego fragmentu DNA. To może prowadzić do przesunięcia ramki odczytu w sekwencji kodującej lub usunięcie miejsca startu translacji. Wykorzystywany jest najczęściej w doświadczeniach, których celem jest nokaut genu (knock-out). Stosując kilka miejsc cięcia docelowej sekwencji, można także doprowadzić do powstania dużych delecji czy inwersji. System naprawy HDR jest aktywny jedynie w komórkach podlegających podziałowi, cechuje go duża poprawność, ale niska efektywność. Wymaga wprowadzania matrycy DNA o zdefiniowanej sekwencji, może zatem być wykorzystany w eksperymentach dotyczących wprowadzenia dodatkowej lub zmienionej kopii genu (knock-in), zamianę eksonów czy wprowadzenia pojedynczych zmian nukleotydowych [7].

W celu edycji genomu sgRNA i Cas9 wprowadza się do komórki docelowej za pomocą pojedynczego wektora lub wektorów. Wektor może zawierać wiele sgRNA i umożliwiać modyfikację wielu genów jednocześnie. Wprowadzenie konstruktów do komórek odbywa się na drodze transdukcji wektorami wirusowymi lub przy pomocy elektroporacji, mikroiniekcji oraz z wykorzystaniem struktur liposomowych. Ponieważ system CRISPR/Cas9 może prowadzić do indukowania mutacji w niepożądanych loci (tzw. sekwencje off-target), stosowane są coraz lepsze metody projektowania sgRNA oraz ulepszone warianty białka Cas9 [35].

Metoda CRISPR/Cas9 ze względu na łatwość wykonania i wysoką wydajność zrewolucjonizowała badania z zakresu inżynierii genetycznej. Znalazła zastosowanie w naukach podstawowych z zakresu biologii i biotechnologii, a także badaniach aplikacyjnych w medycynie człowieka oraz hodowli roślin i zwierząt. Wykorzystano ją do tworzenia komórkowych i zwierzęcych modeli chorób i opracowania terapii chorób o podłożu genetycznym [22]. Coraz większym zainteresowaniem cieszy się możliwość wykorzystania edycji genomu do poprawy cech produkcyjnych zwierząt, takich jak tempo wzrostu, produkcja mięsa o walorach dietetycznych i prozdrowotnych oraz dobrostan zwierząt i odporność na choroby.

Pierwsze próby mające na celu poprawę mięsności świń za pomocą metody CRISPR/Cas9 wykonano już w 2015 r. Wang i wsp. [26] uzyskali genetycznie zmodyfikowane świny rasy landrace z mutacją w genie *MSTN*, o którym wiadomo, że jest negatywnym regulatorem wzrostu mięśni. Uzyskano prosięta z białaliczną muta-

cją w genie *MSTN*, o którym wiadomo, że jest negatywnym regulatorem wzrostu mięśni. Uzyskano prosięta z białaliczną muta-



Rys. 3. Składowe konstruktów CRISPR/Cas9 oraz systemy naprawy dwuniciowych pęknięć DNA

cją w genie *MSTN* (delecje i inwersje w eksonie 3 genu), która skutkowała obniżonym poziomem białka miostatyny. Masa urodzeniowa prosiąt z nokautem (KO) była o 15% większa niż zwierząt kontrolnych (WT). Część z nich posiadała charakterystyczne bruzdy międzymięśniowe i powiększone języki, które są typowe dla fenotypu podwójnego umięśnienia. Niestety zwierzęta przeżyły tylko tydzień. Ta sama grupa badawcza wprowadziła także mutację punktową (c.938G>A) w eksonie 3 *MSTN* świń rasy wielka biała [27]. Uzyskano jedno martwo urodzone prosię z modyfikacją. Mimo mutacji w układzie heterozygotycznym obserwowano znaczny spadek poziomu białka – prekursora miostatyny. Kolejne próby wytworzenia świń z nokautem w genie *MSTN* przeprowadzono na chińskiej rasie rodzimej – Erhualian, która okazała się mniej wrażliwa na problemy zdrowotne niż poprzednie rasy i w ramach eksperymentu uzyskano 23 żywe prosięta [28]. Zastosowano 2 gRNA do wprowadzenia delecji o długości 104pz i 1-nukleotydowej insercji w eksonie 3 *MSTN*. Prosięta posiadały częściowy fenotyp podwójnego umięśnienia, m.in. były szersze w porównaniu z prosiętami typu dzikiego (WT) oraz miały wydajne mięśnie, szczególnie widoczne na tylnych kończynach. W następnych latach podejmowano kolejne próby modyfikacji genu miostatyny u innych ras świń [38]. Wykazano, że komercyjne rasy świń są bardziej wrażliwe na nokauty endogennych genów, a wprowadzenie mutacji w układzie heterozygotycznym nie skutkuje oczekiwanymi zmianami fenotypu. Całkowity nokaut genu *MSTN* prowadzi do poważnych problemów zdrowotnych, co wskazuje na utratę innych funkcji regulatorowych *MSTN*. Badacze sugerują, że lepszych wyników w postaci przyrostu tkanki mięśniowej można się spodziewać, wprowadzając modyfikacje w regionie kodującym peptyd sygnałowy miostatyny (PVD20H i GP19del) [16]. Takie podejście spowodowało nieznaczne zmiany ekspresji dojrzalego peptydu *MSTN* i wzrost ekspresji czynników regulatorowych, takich jak *MyoD*, *myogeniny* i *Myf-5*.

Innym genem, którego modyfikacje mogą prowadzić do poprawy mięsności świń, jest podlegający piętnowaniu gametycznemu w oogenezie gen *IGF2*. Gen ten koduje ważny czynnik wzrostu, który wpływa na masę mięśni szkieletowych i odkładanie tkanki tłuszczowej. Xiang i wsp. [31] wprowadzili mutacje w intronie 3 genu *IGF2* 3 w pozycji 3072, co spowodowało zniesienie wiązanie represora *ZBED6* i utratę jego funkcji regulatorowej. Badania prowadzono na świnich miniaturowych Bama, które posiadają jak inne lokalne rasy chińskie allel G w tym locus, traktowany jako szczep dziki (WT), podczas gdy allel A jest obecny w komercyjnych rasach świń. Zastosowanie metody CRISPR/Cas9 pozwoliło na uzyskanie osobników z różnymi mutacjami typu indel w regionie wiązania czynnika *ZBED6*, które następnie wykorzystano w krzyżowaniu do otrzymania modyfikacji w pokoleniu F_1 . Obserwowano zwiększoną ekspresję genu *IGF2* u osobników z modyfikacją. Zarówno założyciele, jak i zwierzęta z pokolenia F_1 wykazywały znacznie szybszy wzrost. Analiza poubojowa wykazała zwiększenie masy ciała i masy tuszy oraz wyższą zawartość

chudego mięsa, przy czym inne parametry tuszy nie uległy zmianie. Była to pierwsza praca opisująca wprowadzenie edycji genomu w regionie niekodującym u zwierząt gospodarskich, która umożliwiła doskonalenie ważnych cech produkcyjnych.

Kolejnym genem, który może zostać wykorzystany do poprawy cech produkcyjnych, jest *FBXO40*. Gen ten jest mało poznany u świń, ale wiadomo, że ulega ekspresji w mięśniach, a jego nokaut u myszy prowadzi do hipertrofii mięśni [37]. Wytworzenie świń z nokautem w genie *FBXO40* (w eksonie 4) za pomocą metody CRISPR/Cas9 pozwoliło na określenie funkcji tego genu u świń. Brak jego ekspresji skutkowało zwiększeniem ekspresji genu *IRS1* i stymulacji szlaku IGF1/Akt. Zwierzęta z modyfikacją miały o około 4% więcej masy mięśniowej w porównaniu z kontrolą. Rozwijały się prawidłowo i nie stwierdzono zmian patologicznych w głównych narządach. Mając na uwadze rolę, jaką odgrywa gen *IGF-1* (insulinopodobny czynnik wzrostu typu 1) w rozwoju mięśni szkieletowych i wroście, wykonano także eksperymenty, w których dokonano wprowadzenia dodatkowej kopii tego genu wraz z genem *FAT-1*, kodującym desaturazę kwasów tłuszczowych do genomu świni [34]. Oba geny ulegały ekspresji w różnych tkankach świń pokolenia F_0 . Obserwowano podwyższony poziom ekspresji genu *IGF-1* w mięśniach oraz wyższy poziom wielonienasyconych kwasów tłuszczowych n-3 (PUFA), co prowadziło do znacznego obniżenia stosunku n-6 PUFA/n-3 PUFA u genetycznie zmodyfikowanych świń. Autorzy pracy wskazują, że opracowana metodyka wprowadzenia dwóch genów (tzw. podwójny knock-in), daje podwaliny do tworzenia nowych ras świń transgenicznych z udoskonalonymi fenotypami. Przykładem eksperymentu, w którym także dokonano wprowadzenia dodatkowej kopii genu, jest uzyskanie transgenicznych świń z nadekspresją genu *PPARG* w mięśniach szkieletowych [9]. *PPARG* jest głównym czynnikiem transkrypcyjnym adipogenezy oraz lipogenezy i może wpływać na zawartość tłuszczu śródmięśniowego (IMF). Wiadomo, że zawartość IMF jest ważną cechą jakości mięsa wieprzowego, wpływającą na jego kruchość, soczystość i smak. Używając tradycyjnych metod hodowlanych trudno zwiększyć zawartość tłuszczu śródmięśniowego w mięsie przy zachowaniu tego samego poziomu mięsności. Badania prowadzono na rasie wielkiej białej, która znana jest z szybkich przyrostów i wysokiej mięsności, ale jakość i smak mięsa należy w tej rasie do przeciętnych. Dlatego zdecydowano się zastosować metodę CRISPR/Cas9 do poprawy jakości mięsa wieprzowego. Wprowadzenie modyfikacji skutkowało zwiększoną zawartością tłuszczu śródmięśniowego, ale nie zmieniało mięsności tuszy. Zwierzęta z nadekspresją *PPARG* uzyskiwały wyższą ocenę punktową za marmurkowość mięsa niż zwierzęta kontrolne.

Prowadzono także badania nad poprawą walorów prozdrowotnych mięsa wieprzowego. Czerwone mięso na swojej powierzchni posiada duże ilości kwasu N-glikoliloneuraminowego (Neu5Gc), który po wchłonięciu do organizmu ludzkiego wywołuje przewlekłe stany za-

palne, prowadzące do zwiększonego ryzyka rozwoju raka jelita grubego i miażdżycy [1]. Przekształcenie Neu5Gc w Neu5Ac na drodze inżynierii genetycznej, poprzez wprowadzenie genu hydroksylazy kwasu CMP-N-glikoliloneuraminowego (CMAH), było podstawą projektów dotyczących ksenotransplantacji. W produkcji zwierzęcej takie samo podejście polegające na usunięciu cząsteczek znajdujących się na powierzchni komórek zwierzęcych pozwoliłoby na przekształcenie czerwonego mięsa w formę mniej alergenną. Podejmowano różne badania nad wytworzeniem świń pozbawionych antygenów α -Gal i Neu5Gc w celu stworzenia modeli zwierzęcych dla badania alergii i wykorzystania tkanek świni w ksenotransplantacji [6, 23, 33]. Można przewidywać, że badania te będą kontynuowane w zakresie wytworzenia mięsa wieprzowego bez antygenów powierzchniowych w komórkach mięśni świń. Warto zaznaczyć, że w 2020 roku Amerykańska Agencja Żywności i Leków (FDA) zaaprobowała możliwość produkcji linii świń z modyfikacją genetyczną polegającą na pozbawieniu z powierzchni ich komórek epitopu α 1,3Gal. Mięso świń GalSafe® może być przeznaczone do spożycia, a tkanki wykorzystywane w celach terapeutycznych np. do uzyskania produktów medycznych tj. heparyna pozbawiona cukru alfa gal [25].

Świnie nie posiadają funkcjonalnego genu *UCP1* kodującego białko termogeninę, odpowiadającego za bezdrżeniową termogenezę w brunatnej tkance tłuszczowej [3]. W trakcie ewolucji doszło do delecji eksonów 3-5 tego genu, co powoduje słabą termoregulację u tego gatunku i jednocześnie skłonność do odkładania białej tkanki tłuszczowej. Przysparza to hodowcom wielu problemów będących konsekwencją dużej wrażliwości prosiąt na zimno, np. wzrost śmiertelności prosiąt, w przypadku gdy są one niewystarczająco ogrzane czy wzrost kosztów utrzymania zwierząt ze względu na koszty energii. Zheng i wsp. [36] za pomocą techniki CRISPR/Cas9, wprowadzili do genomu świni funkcjonalną kopię genu *UCP1* w locus genu endogennego. Do tego celu wykorzystali konstrukt, który zawierał cDNA mysiego genu *UCP1*, znajdującego się pod kontrolą promotora adiponektyny odpowiedzialnego za ekspresję genu wyłącznie w komórkach białej tkanki tłuszczowej. Badanie przeprowadzono na lokalnej chińskiej rasie miniaturowych świń Bama. W wyniku modyfikacji genetycznej ich komórek oraz techniki transplantacji jąder komórkowych otrzymano 12 świń z potwierdzoną obecnością genu *UCP1* (*UCP1-KI*). Jeden z genetycznie modyfikowanych osobników płci męskiej został skojarzony z dwiema lochami typu dzikiego (*WT*) nieposiadającymi wyżej wymienionej modyfikacji. W wyniku krycia w pokoleniu F_1 urodziło się 15 prosiąt, a u 8 z nich stwierdzono obecność pojedynczej kopii genu *UCP1*. Dowodzi to, że procedura CRISPR/Cas9 nie wpływała na płodność osobników i modyfikacja genomu została przekazana następnym pokoleniom. Badacze wykazali, że świnię z insercją genu *UCP1* posiadały o 24-26% zredukowaną ilość tkanki tłuszczowej. Wprowadzona modyfikacja prowadziła do wzmożonej lipolizy adipocytów i wzrostu ekspresji enzymów lipolitycznych. W związku z tym u świń

UCP1-KI nastąpił wzrost ilości wolnych kwasów tłuszczowych oraz spadek ilości trójglicerydów. Ponadto komórki adipocytów świń *KI* były mniejsze niż te występujące u typu dzikiego. Naukowcy badali także ekspozycję świń na zimno. Obie grupy zwierząt *WT* i *KI* przetrzymywano w 4°C przez 4h. W przypadku typu dzikiego przez cały czas ekspozycji następował spadek temperatury ciała prosiąt. U świń *KI* pomiar temperatury ciała wykazał, że po 1h ekspozycji na zimno temperatura ciała spadła tylko o 1°C i przez kolejne 3h ekspozycji utrzymywała się na poziomie ok. 38°C. Pomiędzy zwierzętami zmodyfikowanymi genetycznie a niezmodyfikowanymi nie stwierdzono znaczących różnic w zakresie aktywności fizycznej oraz poziomu dziennego zapotrzebowania energetycznego. Badacze wykluczyli także ryzyko hipertermii zwierząt, ponieważ ekspresja genu *UCP1* zachodzi na niskim, bezpiecznym dla organizmu poziomie. Autorzy badań wskazują, że uzyskana modyfikacja ma wiele zalet i może zostać wykorzystana w praktyce dla poprawy dobrostanu zwierząt, polepszenia jakości mięsa i redukcji strat ekonomicznych w hodowli świń.

W zakresie dobrostanu podjęto także próby zastąpienia kastracji chirurgicznej u świń tzw. kastracją molekularną za pomocą metod edycji genomu. Mimo wprowadzenia w wybranych krajach Europy obowiązku kastracji ze znieczuleniem ciągle praktykowana jest kastracja bez znieczulania, co istotnie wpływa na dobrostan zwierząt. Kastracja ma na celu eliminację tzw. odoru samczego (zapach knurzy), który negatywnie wpływa na właściwości sensoryczne mięsa wieprzowego – jego aromat i smak. Kurtz i wsp. [15] dokonali inaktywacji genu *SRY* u samców świni. Gen *SRY* położony jest w chromosomie Y i koduje czynnik transkrypcyjny, który jest kluczowy dla determinacji płci męskiej i powstania jąder. Mutacje w tym genie prowadzą do zespołu odwrócenia płci, czyli u osobników z układem chromosomów XY rozwijają się żeńskie narządy płciowe. W eksperymencie na świnich rasy landrace badacze usunęli odcinek o długości 300 par zasad kodujący kluczową domenę genu *SRY-HMG*. Otrzymano 3 osobniki płci męskiej ze stwierdzoną delecją (*SRY-KO*). Wykazano, że 34-dniowe prosięta (*SRY-KO*) posiadały rozwinięte narządy płciowe żeńskie, które wielkością nie różniły się od żeńskich osobników kontrolnych. Różnice zaczęły występować wraz z wiekiem. W 9. miesiącu życia zaobserwowano znaczną różnicę w wielkości jajników oraz brak rozwiniętych pęcherzyków jajnikowych u osobników *SRY-KO*. Nie stwierdzono negatywnych skutków wprowadzonej modyfikacji na tempo wzrostu, jednakże potrzebne są dalsze badania na większej grupie zwierząt. Uzyskane zwierzęta mogą stanowić cenny model do badań nad zaburzeniami rozwoju płci człowieka i zwierząt. Autorzy badań wskazują na możliwość wykorzystania w przyszłości edycji genomu do wpływania na wybór płci, w celu otrzymania tylko potomstwa płci żeńskiej.

Badania nad wykorzystaniem metody CRISPR/Cas9 do poprawy wydajności reprodukcyjnej świń są mniej zaawansowane. Wykorzystano ją głównie do poznania funkcji genów kluczowych dla rozwoju zarodkowego poprzez tworzenie modeli knock-out wybranych ge-

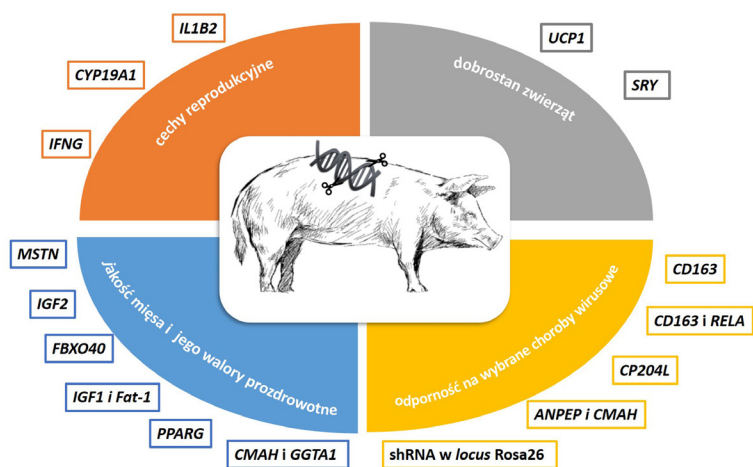
nów. Wyłączenie ekspresji genu *IL1B2*, kodującego interleukinę-1 β prowadziło do zaburzenia wydłużania zarodków podczas implantacji [30] a wyłączenie genu aromatazy – *CYP19A1* pozwoliło na poznanie roli estrogenów w procesie macicznego rozpoznania ciąży i procesie implantacji [19]. Utrata funkcji genu *IFNG*, kodującego interferon gamma pozwoliła na stwierdzenie, że jego produkcja jest niezbędna w modulowaniu prozapalnej odpowiedzi endometrium na przyłączenie się zarodków i ich przeżywalność [13].

W ciągu ostatnich lat najwięcej eksperymentów edycji genomu wykonano w zakresie odporności świń na choroby wirusowe. Najczęściej stosowane podejścia badawcze polegały na nokaucie genów kodujących receptory na komórkach docelowych dla wirusów. W przypadku zespołu rozrodczo-oddechowego świń (PRRSV) genem docelowym był *CD163* [5]. W walce z wirusem afrykańskiego pomoru świń (ASFV) edytowano zarówno gen *CD163* [21] i *RELA* [18], jednak nieskutecznie i jedynie obiecujące wyniki uzyskano dla genu *CP204L* [10]. Dla wirusa epidemicznej biegunki świń (PEDV) edytowano, także bezskutecznie, geny *ANPEP* i *CMAH* [23, 29]. Edycja genu *ANPEP* okazała się skuteczna w uzyskaniu odporności na wirusa zakaźnego zapalenia żołądka i jelit (TGEV) [29]. Inne podejście zastosowano w uzyskaniu odporności na wirusa klasycznego pomoru świń (CSFV) [32]. Zamiast inaktywować receptory, wprowadzono przeciwwirusowe małe RNA o strukturze spinki do włosów (shRNA) do locus *Rosa26*. Zaobserwowano, że u świń z modyfikacją, replikacja wirusa była skutecznie ograniczona, co wykazano poprzez zmniejszenie objawów klinicznych i śmiertelności związanych z CSFV. Dowiedziono także, że odporność na chorobę może być stabilnie przekazywana pokoleniu F₁. Można przewidywać, że strategie dotyczące wprowadzenia shRNA w celu zdegradowania wirusa zostaną także opracowane dla innych chorób wirusowych świń.

Przedstawione powyżej przykłady wskazują, jak ogromne możliwości wpływania na ważne cechy produkcyjne świń daje metoda CRISPR/Cas9 (rys. 4). W porównaniu

do tradycyjnych metod, opartych na selekcji i krzyżowaniu, edycja genomu pozwala na stosunkowo łatwe i bardzo szybkie modyfikowanie wybranych cech produkcyjnych (jakość mięsa i jego walory dietetyczne) i użytkowych (dobrostan, oporność na niektóre choroby). Należy jednak pamiętać, że wprowadzenie na rynek zwierząt czy produktów od zwierząt z modyfikacją genomu zależne jest od regulacji prawnych i akceptacji społecznej. Europejski Trybunał Sprawiedliwości w 2018 r. wydał dyrektywę stwierdzającą, że organizmy uzyskane za pomocą technik mutagenезы ukierunkowanej, czyli edycji genomu, uznawane są za organizmy genetycznie modyfikowane (GMO), ponieważ ich genom został zmieniony. Jednak w niektórych krajach (np. Argentyna, Brazylia, Kanada, Chile i Japonia) organizmy z modyfikacją genomu nie są klasyfikowane jako GMO, bo podczas ich tworzenia nie doszło do wprowadzenia obcego DNA [24]. Obecnie trwają prace nad złagodzeniem przepisów dotyczących stosowania nowych technik hodowlanych (NBT – ang. *new breeding techniques*), do których zaliczana jest technologia CRISPR/Cas.

Literatura: 1. Alisson-Silva F., Kawanishi, K., Varki A., 2016 – Human risk of diseases associated with red meat intake: Analysis of current theories and proposed role for metabolic incorporation of a non-human sialic acid. *Molecular Aspects of Medicine* 51, 16-30. 2. Czarnek M., Bereta J., 2016 – System CRISPR-Cas: od odporności bakterii do inżynierii genomowej. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej* 70, 901-916. 3. Berg F., Gustafson U., & Andersson L., 2006 – The uncoupling protein 1 gene (UCP1) is disrupted in the pig lineage: a genetic explanation for poor thermoregulation in piglets. *PLoS Genetics* 2(8): e129. 4. Bhardwaj P., Kant R., Behera S.P., Dwivedi G.R., Singh R., 2022 – Next-Generation Diagnostic with CRISPR/Cas: Beyond Nucleic Acid Detection. *International Journal of Molecular Sciences* 23(11): 6052. 5. Burkard C., Lillico S.G., Reid E., Jackson B., Mileham A.J., Ait-Ali T., Whitelaw C.B.A., Archibald A.L., 2017 – Precision engineering for PRRSV resistance in pigs: Macrophages from genome edited pigs lacking CD163 SRCR5 domain are fully resistant to both PRRSV genotypes while maintaining biological function. *PLoS Pathogens* 13(2): e1006206. 6. Chuang C.K., Chen C.H., Huang C.L., Su Y.H., Peng S.H., Lin T.Y., Tai H.C., Yang T.S., Tu C.F., 2017 – Generation of GGTA1 mutant pigs by direct pronuclear microinjection of CRISPR/Cas9 plasmid vectors. *Animal Biotechnology* 28(3): 174-181. 7. Cong L., Zhang F., 2015 – Genome engineering using CRISPR-Cas9 system. *Chromosomal Mutagenesis* 197-217. 8. Doudna J.A., Charpentier E., 2014 – The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346(6213): 1258096. 9. Gu H., Zhou Y., Yang J., Li J., Peng Y., Zhang X., Miao Y., Jiang W., Bu G., Hou L., Li T., Zhang L., Xia X., Ma Z., Xiong Y., Zuo B., 2021 – Targeted overexpression of PPAR γ in skeletal muscle by random insertion and CRISPR/Cas9 transgenic pig cloning enhances oxidative fiber formation and intramuscular fat deposition. *The FASEB Journal* 35(2): e21308. 10. Hübner A., Petersen B., Keil G.M., Niemann H., Mettenleiter T.C., Fuchs W., 2018 – Efficient inhibition of African swine fever virus replication by



Rys. 4. Przykłady genów, których edycja może wpływać na wybrane cechy produkcyjne i użytkowe w hodowli świń

CRISPR/Cas9 targeting of the viral p30 gene (CP204L). *Scientific Reports* 8(1): 1-7. **11. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A.**, 1987 – Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *Journal of bacteriology* 169(12): 5429-5433. **12. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E.**, 2012 – A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337(6096): 816-821. **13. Johns D.N., Lucas C.G., Pfeiffer C.A., Chen P.R., Meyer A.E., Perry S.D., Spate L.D., Cecil R.F., Fudge M.A., Samuel M.S., Spinka C.M., Liu H., Lucy M.C., Wells K.D., Prather R.S., Spencer T.E., Geisert R.D.**, 2021 – Conceptus interferon gamma is essential for establishment of pregnancy in the pig. *Biology of Reproduction* 105(6): 1577-1590. **14. Koonin E.V., Makarova K.S., Zhang F.**, 2017 – Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Current Opinion in Microbiology* 37, 67-78. **15. Kurtz S., Lucas-Hahn A., Schlegelberger B., Göhring G., Niemann H., Mettenleiter T.C., Petersen B.**, 2021 – Knockout of the HMG domain of the porcine SRY gene causes sex reversal in gene-edited pigs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(2): e2008743118. **16. Li R., Zeng W., Ma M., Wei Z., Liu H., Liu X., Wang M., Shi X., Zeng J., Yang L., Mo D., Liu X., Chen Y., He Z.**, 2020 – Precise editing of myostatin signal peptide by CRISPR/Cas9 increases the muscle mass of Liang Guang Small Spotted pigs. *Transgenic Research* 29, 149-163. **17. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin, E.V.**, 2006 – A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology Direct* 1(1): 1-26. **18. McCleary S., Strong R., McCarthy R. R., Edwards J.C., Howes E.L., Stevens L.M., Sánchez-Cordón P.J., Núñez A., Watson S., Mileham A.J., Lillico S.G., Tait-Burkard C., Proudfoot C., Ballantyne M., Whitelaw C.B.A., Steinbach F., Crooke H.R.**, 2020 – Substitution of warhog NF- κ B motifs into RELA of domestic pigs is not sufficient to confer resilience to African swine fever virus. *Scientific Reports* 10(1): 1-11. **19. Meyer A.E., Pfeiffer C.A., Brooks K.E., Spate L.D., Benne J.A., Cecil R., Samuel M.S., Murphy C.N., Behura S., McLean M.K., Ciernia L.A., Smith M.F., Whitworth K.M., Wells K.D., Spencer T.E., Prather R.S., Geisert R.D.**, 2019 – New perspective on conceptus estrogens in maternal recognition and pregnancy establishment in the pig. *Biology of Reproduction* 101(1): 148-161. **20. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C. García-Martínez J., Soria E.**, 2005 – Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *Journal of Molecular Evolution* 60, 174-182. **21. Popescu L., Gaudreault N.N., Whitworth K.M., Murgia M.V., Nietfeld J.C., Mileham A., Samuel M., Wells K.D., Prather R.S., Rowland R.R.R.**, 2017 – Genetically edited pigs lacking CD163 show no resistance following infection with the African swine fever virus isolate, Georgia 2007/1. *Virology* 501, 102-106. **22. Tavakoli K., Pour-Aboughadareh A., Kianersi F., Poczai P., Etmianan A., Shooshtari L.**, 2021 – Applications of CRISPR-Cas9 as an Advanced Genome Editing System in Life Sciences. *BioTech* 10(3): 14. **23. Tu C.F., Chuang C.K., Hsiao K.H., Chen C.H., Chen C.M., Peng S.H., Su Y.H., Chiou M.T., Yen C.H., Hung S.W., Yang T.S., Chen C.M.**, 2019 – Lessening of porcine epidemic diarrhoea virus susceptibility in piglets after editing of the CMP-N-glycolylneuraminic acid hydroxylase gene with CRISPR/Cas9 to nullify N-glycolylneuraminic acid expression. *Plos One* 14(5): e0217236. **24. Tu C.F., Chuang C.K., Yang T.S.**, 2022 – The application of new breeding technology based on gene editing in pig industry – A review. *Animal Bioscience* 35(6): 791-803. **25. U.S. Food**, 2020 – FDA Approves First-of-its-Kind Intentional Genomic Alteration in Line of Domestic Pigs for Both Human Food, Potential Therapeutic Uses. **26. Wang K., Ouyang H., Xie Z., Yao C., Guo N., Li M., Jiao H., Pang D.**, 2015 – Efficient generation of myostatin mutations in pigs using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific Reports* 5(1): 16623. **27. Wang K., Tang X., Liu Y., Xie Z., Zou X., Li M., Yuan H., Ouyang H., Jiao H., Pang D.**, 2016 – Efficient generation of orthologous point mutations in pigs via CRISPR-assisted ssODN-mediated homology-directed repair. *Molecular Therapy*. *Nucleic Acids* 5, e396. **28. Wang K., Tang X., Xie Z., Zou X., Li M., Yuan H., Guo N., Ouyang H., Jiao H., Pang D.**, 2017 – CRISPR/Cas9-mediated knockout of myostatin in Chinese indigenous Erhualian pigs. *Transgenic Research* 26, 799-805. **29. Whitworth K.M., Rowland R.R.R., Petrovan V., Sheahan M., Cino-Ozuna A.G., Fang Y., Hesse R., Mileham A., Samuel M.S., Wells K.D., Prather R.S.**, 2019 – Resistance to coronavirus infection in amino peptidase N-deficient pigs. *Transgenic Research* 28, 21-32. **30. Whyte J.J., Meyer A.E., Spate L.D., Benne J.A., Cecil R., Samuel M.S., Murphy C.N., Prather R.S., Geisert R.D.**, 2018 – Inactivation of porcine interleukin-1 β results in failure of rapid conceptus elongation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115(2): 307-312. **31. Xiang G., Ren J., Hai T., Fu R., Yu D., Wang J., Li W., Wang H., Zhou Q.**, 2018 – Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(24): 4619-4628. **32. Xie Z., Pang D., Yuan H., Jiao H., Lu C., Wang K., Yang Q., Li M., Chen X., Yu T., Chen X., Dai Z., Peng Y., Tang X., Li Z., Wang T., Guo H., Li L., Tu C., Lai L., Ouyang H.**, 2018 – Genetically modified pigs are protected from classical swine fever virus. *PLoS Pathogens* 14(12): e1007193. **33. Yen C.H., Tai H.C., Peng S.H., Yang T.S., Tu C.F.**, 2020 – Scaffold derived from GGTA1 and CMAH double knockout pigs elicits only slight inflammation in a gene-edited pig model. *Materialia* 14, 100836. **34. You W., Li M., Qi Y., Wang Y., Chen Y., Liu Y., Li L., Ouyang H., Pang D.**, 2021 – CRISPR/Cas9-mediated specific integration of Fat-1 and IGF-1 at the p Rosa26 locus. *Genes* 12(7): 1027. **35. Zhang F., Wen Y., Guo X.**, 2014 – CRISPR/Cas9 for genome editing: progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics* 23(R1): R40-R46. **36. Zheng Q., Lin J., Huang J., Zhang H., Zhang R., Zhang X., Cao C., Hambly C., Qin G., Yao J., Song R., Jia Q., Wang X., Li Y., Zhang N., Piao Z., Ye R., Speakman J.R., Wang H., Zhou Q., Wang Y., Jin W., Zhao J.**, 2017 – Reconstitution of *UCP1* using CRISPR/Cas9 in the white adipose tissue of pigs decreases fat deposition and improves thermogenic capacity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114(45): E9474-E9482. **37. Zou Y., Li Z., Zou Y., Hao H., Li N., Li Q.**, 2018 – An FBXO40 knockout generated by CRISPR/Cas9 causes muscle hypertrophy in pigs without detectable pathological effects. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498(4): 940-945. **38. Zou Y.L., Li Z.Y., Zou Y.J., Hao H.Y., Hu J. X., Ning L.I., & Li Q.Y.**, 2019 – Generation of pigs with a Belgian Blue mutation in *MSTN* using CRISPR/Cpf1-assisted ssODN-mediated homologous recombination. *Journal of Integrative Agriculture* 18(6): 1329-1336.

Praca powstała dzięki realizacji projektu NCN 2018/29/B/NZ2/00956