

МИРОВЫЕ ДОСТИЖЕНИЯ ГЕНОМНОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ В ОБЛАСТИ СВИНОВОДСТВА

(✉) Колосова М.А.¹, Романец Е.А.¹, Колосов А.Ю.¹, Гетманцева Л.В.²

¹Донской государственный аграрный университет

Ростовская область, Россия

²Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью
Федерального медико-биологического агентства

Москва, Россия

(✉) e-mail: m.leonovaa@mail.ru

Представлен обзор основных мировых достижений редактирования генома свиней с использованием системы CRISPR/Cas9, в частности модификации генов (MSTN, IGF2, ZBED6, UCP1, LGALS12, APOE, vWF), для повышения продуктивных характеристик и хозяйственно полезных свойств, а также генов устойчивости животных к заболеваниям (APN, CD163, SRCR5, RSAD2). Большой интерес представляет изучение опыта применения этого инновационного инструмента для получения свиней с заданными признаками. Развитие молекулярно-генетических исследований, открытие взаимосвязей ген – фенотип обеспечило платформу, необходимую для модификации конкретных генов, чтобы значительно сократить репродуктивные циклы и повысить эффективность разведения свиней. Появившаяся относительно недавно система CRISPR/Cas9 уже нашла применение во многих передовых областях исследований, однако в задачах развития свиноводства, в том числе за счет получения трансгенных пород свиней, применение этой технологии ограничено. Это связано с тем, что существуют этические вопросы и проблемы нормативно-правового урегулирования, связанные с генно-отредактированными продуктами и потенциальными нецелевыми эффектами CRISPR/Cas9, которые необходимо исследовать. Технология геномного редактирования активно развивается в мире. В России реализуется программа развития генетических технологий, рассчитанная на 2019–2027 гг. Основная цель программы состоит в комплексном решении задач ускоренного развития генетических технологий, в том числе технологий генетического редактирования. Получение результатов посредством геномного редактирования линий сельскохозяйственных животных с новыми улучшенными свойствами – один из целевых индикаторов программы. С использованием CRISPR/Cas9 могут быть улучшены такие продуктивные характеристики свиней, как устойчивость к болезням, терморегуляция, повышение выхода и качества мяса.

Ключевые слова: CRISPR/Cas9, редактирование генома, ген, мутация, свиньи

GLOBAL ADVANCES IN GENOMIC EDITING IN PIG BREEDING

(✉) Kolosova M.A.¹, Romanets E.A.¹, Kolosov A. Yu.¹, Getmantseva L.V.²

¹Don State Agrarian University

Rostov region, Russia

²Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks of the Federal Medical Biological Agency

Moscow, Russia

(✉) e-mail: m.leonovaa@mail.ru

An overview of the main world advances in editing the pig genome using the CRISPR/Cas9 system, in particular the modification of the genes (MSTN, IGF2, ZBED6, UCP1, LGALS12, APOE, vWF) to improve productivity and economic properties as well as the disease resistance genes (APN, CD163, SRCR5, RSAD2) in pigs is presented. It is of great interest to study the experience of using this innovative tool to produce pigs with specified traits. The development of molecular genetic research and the discovery of gene-phenotype relationships has provided the platform needed to modify specific genes to significantly shorten the reproductive cycles and improve the efficiency of pig breeding. The relatively recent CRISPR/Cas9 system has already found use in many advanced fields of research, but its application is limited in the challenges of pig breeding, including the production of transgenic pigs. It is due to the fact that there are ethical and regulatory issues associated with genetically-edited

products and the potential non-target effects of CRISPR/Cas9 that need to be investigated. Genomic editing technology is actively developing worldwide. Russia is implementing the 2019-2027 genetic technology development program. The main goal of the program is to comprehensively address the problems of accelerated development of genetic technologies, including genetic editing technologies. Obtaining results through genomic editing of farm animal lines with new, improved properties is one of the program's target indicators. CRISPR/Cas9 can be used to improve pig performance characteristics such as resistance to disease, thermoregulation, improved meat yield and quality.

Keywords: CRISPR/Cas9, genome editing, gene, mutation, pigs

Для цитирования: Колосова М.А., Романец Е.А., Колосов А.Ю., Гетманцева Л.В. Мировые достижения геномного редактирования в области свиноводства // Сибирский вестник сельскохозяйственной науки. 2023. Т. 53. № 6. С. 51–58. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-6-6>

For citation: Kolosova M.A., Romanets E.A., Kolosov A.Yu., Getmantseva L.V. Global advances in genomic editing in pig breeding. *Sibirskii vestnik sel'skokhozyaistvennoi nauki* = *Siberian Herald of Agricultural Science*, 2023, vol. 53, no. 6, pp. 51–58. <https://doi.org/10.26898/0370-8799-2023-6-6>

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

С помощью селекционного разведения люди выводят породы свиней, обладающие полезными характеристиками для сельского хозяйства, хотя традиционный отбор – длительный процесс. Однако теперь его можно ускорить за счет генетической модификации, включая случайный трансгенез, нокауты и нокины генов [1, 2]. Повышение признаков продуктивности и качества получаемой продукции способствует эффективному развитию свиноводства. Однако наряду с этим большие проблемы связаны с устойчивостью свиней к заболеваниям. Коммерческое свиноводство понесло огромные экономические потери из-за различных заболеваний, таких как африканская чума свиней, классическая чума свиней, репродуктивно-респираторный синдром свиней и др. Современные молекулярно-генетические технологии позволяют выявлять локальные причины, вносящие значительный вклад в развитие признаков здоровья и продуктивности сельскохозяйственных животных. Одним из подходов дальнейшего применения этих данных является локальное изменение на уровне ДНК – редактирование генома. Способность генерировать специфичные изменения в геноме позволяет исследователям задавать фундаментальные вопросы о функции генов, перемещать аллельные варианты между породами или видами или создавать новые фенотипы. В настоящее время достижения в этой

области демонстрируют хорошие результаты, связанные с повышением признаков продуктивности [3]. Помимо этого, считается, что редактирование генома – одно из действенных решений для сдерживания инфекционных заболеваний и уменьшения сильной зависимости от фармацевтических препаратов для лечения свиней [4, 5].

Цель статьи – провести обзор основных мировых достижений редактирования генома свиней с использованием системы CRISPR/Cas9.

CRISPR/Cas9 – компонент адаптивного иммунитета бактерий против фагов и других инвазивных нуклеиновых кислот. Система CRISPR/Cas, управляемая РНК, состоит из массива повтор-спейсер CRISPR и нуклеазы Cas, которая расщепляет чужеродную вирусную ДНК. Cas9 нуклеаза вместе с одной направляющей РНК (sgRNA) индуцирует целевые и эффективные двухцепочечные разрывы (DSBs) в ДНК. CRISPR/Cas9 относительно недорогая система и предоставляет средства для широкого применения в различных областях благодаря своей простоте и эффективности [6]. Клетки млекопитающих впервые подвергнуты редактированию генов с использованием CRISPR/Cas9 в 2013 г., в 2014 г. технология применена к свиньям. С тех пор CRISPR/Cas9 нашла применение в исследованиях в области животноводства, в том числе у свиней [7].

Модификация конкретных генов для повышения продуктивных характеристик и хозяйственно полезных свойств свиней. Спрос на высококачественную нежирную свинину растет во всем мире. Система CRISPR/Cas9 служит ценным инструментом для улучшения качества свинины с помощью генных манипуляций, направленных на увеличение мышечной массы и уменьшение жировой ткани у коммерческих свиней. Одним из достижений в молекулярной селекции стали свиньи с нокаутом по гену миостатину (MSTN). Ген MSTN – ингибитор развития скелетных мышц, что делает его подходящей мишенью для увеличения мышечной массы домашнего скота. Многочисленные исследования документально подтвердили увеличение мышечной массы при уменьшении жировой ткани у свиней с нокаутом гена MSTN, что позволило получить качественную нежирную свинину. Однако проблемой, проявляющейся у свиней европейских коммерческих пород с нокаутом по гену MSTN, стала низкая выживаемость поросят после рождения. Напротив, свиньи китайских пород, несущие гомозиготные мутации гена MSTN, демонстрировали хорошую выживаемость. Вторым препятствием на пути создания трансгенных свиней с дефицитом гена MSTN были биологические риски, связанные с генами селективируемых маркеров, такими как ген зеленого флуоресцентного белка (EGFP). Китайские ученые предположили, что модификация некодирующих областей гена MSTN полезна для стимулирования развития мышечной массы без значительного воздействия на экспрессию гена MSTN и связанных с ним биологических функций [8].

Ген инсулиноподобного фактора роста 2 (IGF2) успешно используется в качестве регулятора развития мышц у свиней китайских пород [9, 10]. Ген активирует каскад сигнальных путей, регулирующих клеточную пролиферацию, дифференцировку и апоптоз как при внутриутробном, так и постнатальном росте. Транскрипция и экспрессия гена IGF2 подавляется геном белка 6, содержащего домен BED с цинковыми пальцами (ZBED6). ZBED6 представляет собой фактор транскрипции у млекопитающих, который может комбинироваться с геном IGF2, повышая уровень его экспрессии,

тем самым уменьшая отложение подкожного жира [11]. Показано, что этот фактор транскрипции тесно связан с ростом и развитием мышц и может ингибировать образование мышечных трубок в процессе дифференцировки клеток на клеточном уровне. Xiang G. et al. [9] впервые продемонстрировали улучшение экономических характеристик домашнего скота за счет генетической модификации некодирующих областей в геноме. Мутации в интроне гена IGF2 значительно улучшили мясную продуктивность свиней породы бама [10].

Свиньи подвержены различным заболеваниям в холодное время года. В процессе эволюции эти животные практически утратили ключевой элемент неподвижного термогенеза – белок термогенин (UCP1). Исследования на грызунах показали, что у мышей есть белок UCP1, и они используют бурый жир для поддержания внутренней температуры тела посредством неподвижного термогенеза [12]. Группа китайских ученых во главе с Q. Zheng показала возможность создания нокаута по гену UCP1 свиней посредством CRISPR/Cas9-опосредованной вставки UCP1 мыши в эндогенный локус свиньи [13]. Скрещивание полученного таким образом самца с самками дикого типа подтвердило правило менделевской сегрегации трансгенов среди потомства F_1 , а также показало отсутствие влияния элементов системы CRISPR/Cas9 на фертильность. У полученных свиней отмечали улучшенную терморегуляцию и снижение объемов отложения белой жировой ткани, что в некоторых государствах является приоритетным направлением свиноводческих программ. Также сообщается, что в общей сложности 2553 клонированных эмбриона перенесены в яйцеводы 13 суррогатных реципиентов. Установлены три беременности, которые достигли срока. Двенадцать поросят-самцов родились естественным путем из трех пометов [14].

Жировая ткань выполняет различные физиологические функции, в том числе запасает избыточную энергию в виде жира, защищает внутренние органы от физического воздействия, сохраняет тепло и секретирует адипокины. Благодаря высокоразвитой жировой ткани свиньи считаются идеальной моделью для изучения адипогенеза. Группой ученых пред-

ставлены новые сведения об отложении жира и промоторного элемента, специфичного для жировой ткани генетически модифицированных свиней. Ген галектин 12 (LGALS12) показал самую высокую специфичность в отношении жировой ткани свиньи. Однако в литературе почти не встречается сведений о свином гене LGALS12. Согласно биоинформационному анализу, клонированы пять укороченных фрагментов промотора LGALS12. Фрагмент размером 4 т.п.н. (L-4 т.п.н.) проявлял промоторную активность, специфичную для жировой ткани. В этих исследованиях показано, что L-4 т.п.н. может управлять экспрессией гена аполипопротеина E (APOE), чтобы выполнять свою функцию в адипоцитах. Эти данные подтверждают идею о том, что LGALS12 является геном-кандидатом для генетического улучшения признаков, связанных с ожирением у свиней [15].

Китайские ученые применили технологию CRISPR/Cas9 для создания нокаутированных свиней по гену фактора Виллебранда (vWF), мутация которого у человека вызывает болезнь Виллебранда, сопровождающуюся спонтанными кровотечениями. Для придания свиньям хозяйственно полезного свойства, заключающегося в активном обескровливании животного после убоя, авторы внедрили генетические конструкции методом цитоплазматической инъекции мРНК CAS9 и shРНК (малая шпилечная РНК) в зиготы с последующей трансплантацией суррогатным свиноматкам, что привело к возникновению целевой делеции на участке гена vWF у 62% родившихся поросят. С точки зрения создания модели крупного животного для исследования генетических заболеваний человека, данное исследование полезно и может иметь перспективы. Однако с точки зрения продовольственной безопасности, возникает проблема: из 76 инъектированных пяти суррогатным свиноматкам эмбрионов лишь у трех супоросность прошла успешно. Родились всего 16 поросят (2 из них погибли после рождения), лишь у 10 подтверждена хозяйственно ценная делеция в гене [15]. При этом стоит учесть, что полученные животные, по всей видимости, требовали особого ухода, что повлечет увеличение затрат на их содержание, поставив под сомнение рентабельность полученного полезного качества.

Модификация конкретных генов для повышения устойчивости свиней к инфекционным заболеваниям. Подверженность инфекционным заболеваниям животных – одна из самых серьезных проблем в животноводстве. Многие вирусные инфекции связаны со вторичными бактериальными инфекциями, что в значительной степени способствует использованию противомикробных препаратов в сельском хозяйстве. Использование CRISPR/Cas9 имеет огромное значение для получения свиней, устойчивых к коронавирусам. Коронавирусы – вирусы с одноцепочечной РНК, распространены во всем мире. К ним относятся такие вирусы, как трансмиссивный гастроэнтерит (TGEV), вирус эпидемической диареи свиней (PEDV) и коронавирус дельты свиней (PDCoV) [16]. Эти коронавирусы вызывают огромные потери в свиноводстве, поскольку они связаны со смертностью поросят-сосунков из-за мальабсорбтивной диареи и обезвоживания. Исследования с использованием CRISPR/Cas9 подтвердили, что аминопептидаза белок N (APN), который присутствует на поверхности ворсинок кишечника, является основным рецептором для установления инфекции трансмиссивного гастроэнтерита у свиней. Новорожденные поросята с дефицитом белка APN устойчивы к инфекции TGEV. Однако дефицит APN не обеспечивает защиты от инфекции PEDV [17]. Следовательно, существует острая потребность в идентификации распознающего рецептора для PEDV.

Один из важнейших рецепторов для инфицирования свиней вирусом репродуктивного и респираторного синдрома (PPCC) – кластер дифференцировки антигена 163 (CD163). Белок CD163 выполняет ряд важных биологических функций, включая рециркуляцию гемоглобина/гаптоглобина. CD163 представляет девять внеклеточных доменов на поверхности моноцитов и макрофагов, при этом вирус специфически взаимодействует с доменом номер пять. Путем удаления экзона 7, который кодирует весь пятый домен, оказалось возможным получить отредактированных свиней, экспрессирующих модифицированный белок CD163, сохраняющий эти функции. Свиньи с нокаутом гена CD163 оказались устойчивыми к вирусу PPCC [18]. Однако вирус PPCC имеет

две формы: PPCC-1 (европейский) и PPCC-2 (азиатский). Вирусы PPCC-1 и PPCC-2 CD163 используют разные сайты CD163, поэтому необходимо проведение дополнительных исследований.

Исследователи стремятся вывести свиней, обладающих множественной устойчивостью к вирусным патогенам. Oh J. et al. [19] разработали стратегию множественной резистентности для ящура и PPCC с использованием CRISPR/Cas9-опосредованной делеции гена CD163 и интеграции малой шпилечной shP-НК в фибробласты свиней. Интегрированная shPНК нацелена на гены вируса ящура и вируса PPCC. Однако свиней с двойной устойчивостью к вирусу ящура и вирусу PPCC еще предстоит тестировать, поскольку необходимы дальнейшие исследования *in vivo*.

Guo C. et al. [20] произвели точечное удаление фрагмента из 41 аминокислоты, содержащей липополисахаридсвязывающий белок (LBP) в фагоцитарном рецепторе участка, насыщенного цистеином 5 (SRCR5) CD163, у двух пород свиней (малая пятнистая лян-гуанская и крупная белая свиньи). Затем свиней крупной белой породы с измененными генами в поколении F_0 использовали для заражения вирусом. Эти свиньи с отредактированным геномом были устойчивы к вирусу репродуктивно-респираторного синдрома свиней 2 (PRRSV 2).

Классическая чума свиней (КЧС) – вирусная болезнь свиней, характеризующаяся лихорадкой, поражением кровеносных сосудов и кроветворных органов, крупозно-дифтеритическим воспалением слизистой оболочки толстых кишок. Она наносит громадный экономический ущерб хозяйствам: летальность составляет 80–100%. Вирус КЧС индуцирует иммуносупрессию, предрасполагая домашних и диких кабанов к вторичным оппортунистическим инфекциям желудочно-кишечной и дыхательной системы. Использование CRISPR/Cas9 в сочетании с РНК-интерференцией привели к получению трансгенных свиней, устойчивых к вирусу КЧС. Через CRISPR/Cas9 стратегией нокина, малой шпилечной противовирусной shPНК был вставлен в локус Rosa26 свиньи для деградации РНК вируса классической чумы свиней. Результаты заражения у

этих свиней показали значительное снижение репликации КЧС, клинических симптомов, смертности и передачи резистентности к КЧС поросятам первого поколения [21]. Радикал S-аденозилметиониновый домен, содержащий белок 2 (RSAD2), представляет собой клеточный белок, проявляющий широкую противовирусную активность в отношении ДНК- и РНК-вирусов. Из-за широкой противовирусной активности, проявляемой геном RSAD2, он считался потенциальным кандидатом на нокин CRISPR/Cas9 для разработки устойчивых к вирусу трансгенных свиней. Специфическое введение гена RSAD2 в свином локусе ROSA26 позволило получить трансгенных свиней, у которых отмечено снижение вируса КЧС и вируса псевдобешенства (PRV) при заражении [21]. Следовательно, использование нескольких критических генов может способствовать появлению мультирезистентных свиней. Однако ограниченное знание взаимодействия этих генов с рецепторами при многих вирусных заболеваниях может частично препятствовать широкому распространению данной стратегии.

Рассмотрение нецелевых эффектов. Нецелевой эффект, который представляет собой непреднамеренные изменения ДНК в нецелевые сайты генов, вызывает основную проблему для CRISPR/Cas9 – опосредованное образование генро-модифицированных объектов (ГМО). Нежелательные изменения могут повлиять не только на фенотип родительского животного, но и на фенотип последующих поколений. Нецелевые эффекты можно оценить путем секвенирования генома.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

CRISPR/Cas9 вызывает значительный общественный интерес у мирового сообщества, но есть и противоположные мнения, которые, вероятно, будут существенно различаться в зависимости от социальных точек зрения, включая достаток, возраст, религию людей. От этого зависит развитие и скорость внедрения данных разработок в сельское хозяйство отдельных государств. В настоящее время лидером в разработке геномного редактирования в области свиноводства является Китай. В России реализуется программа развития генетических

технологий, рассчитанная на 2019–2027 гг. Основная цель программы состоит в комплексном решении задач ускоренного развития генетических технологий, в том числе технологий генетического редактирования. В ближайшем будущем стоит ожидать появления перспективных российских разработок по геномному редактированию разных видов сельскохозяйственных животных, в том числе и свиней. Следует признать, что редактирование генов может вызвать и неожиданные побочные эффекты. В связи с этим исследователи должны четко планировать свои эксперименты. Однако в целом система CRISPR/Cas9 совершенствуется, становится более доступной для использования, открывает неограниченные возможности и перспективы для более широкого применения в будущем.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ларкина Т.А., Крутикова А.А., Козицова Л.В. Редактирование генома сельскохозяйственных животных с помощью технологии CRISPR/Cas9 // Молочнохозяйственный вестник. 2018. № 3 (31). С. 24–35. DOI: 10.24411/2225-4269-2018-00018.
2. Яковлев А.Ф. Редактирование генома сельскохозяйственных животных // Генетика и разведение животных. 2018. № 2. С. 4–12.
3. Zhang J., Khazalwa E.M., Abkhallo H.M., Zhou Y., Nie X., Ruan J., Zhao C., Wang J., Xu J., Li X., Zhao S., Zuo E., Steinaa L., Xie S. The advancements, challenges, and future implications of the CRISPR/Cas9 system in swine research // Journal of Genetics and Genomics. 2021. Vol. 48 (5). P. 347–360. DOI: 10.1016/j.jgg.2021.03.015.
4. Sharma V., Kaushik S., Kumar R., Yadav J.P., Kaushik S. Emerging trends of Nipah virus: A review // Reviews in medical virology. 2019. Vol. 29 (1). P. e2010. DOI: 10.1002/rmv.2010.
5. Choe Y.J., Jee Y., Takashima Y., Lee J.K. Japanese encephalitis in the Western Pacific region: implication from the Republic of Korea // Vaccine. 2020. Vol. 38 (13). P. 2760–2763. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.02.061.
6. Chen S.J. Minimizing off-target effects in CRISPR-Cas9 genome editing // Cell biology and toxicology. 2019. Vol. 35 (5). P. 399–401. DOI: 10.1007/s10565-019-09486-4.
7. Knott G.J., Doudna J.A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering // Science. 2018. Vol. 361 (6405). P. 866–869. DOI: 10.1126/science.aat5011.
8. Liu J., Pan M., Huang D., Guo Y., Yang M., Zhang W., Mai K. Myostatin-1 inhibits cell proliferation by inhibiting the mTOR signal pathway and MRFs, and activating the ubiquitin-proteasomal system in skeletal muscle cells of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus* // Cells. 2020. Vol. 9 (11). P. 2376. DOI: 10.3390/cells9112376.
9. Xiang G., Ren J., Hai T., Fu R., Yu D., Wang J., Li W., Wang H., Zhou Q. Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs // Cellular and Molecular Life Sciences. 2018. Vol. 75. P. 4619–4628. DOI: 10.1007/s00018-018-2917-6.
10. Liu X., Liu H., Wang M., Li R., Zeng J., Mo D., Cong P., Liu X., Chen Y., He Z. Disruption of the ZBED6 binding site in intron 3 of IGF2 by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs // Transgenic research. 2019. Vol. 28. P. 141–150. DOI: 10.1007/s11248-018-0107-9.
11. Younis S., Schonke M., Massart J., Hjortebjerg R., Sundstrom E., Gustafson U., Bjornholm M., Krook A., Frystyk J., Zierath J.R. The ZBED6-IGF2 axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2018. Vol. 115 (9). P. E2048–E2057. DOI: 10.1073/pnas.1719278115.
12. Wang D., Pan D., Xie B., Wang S., Xing X., Liu X., Ma Y., Andersson L., Wu J., Jiang L. Porcine ZBED6 regulates growth of skeletal muscle and internal organs via multiple targets // PLoS Genetics. 2021. Vol. 17 (10). P. e1009862. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009862.
13. Roesler A., Kazak L. UCP1-independent thermogenesis // Biochemical Journal. 2020. Vol. 477 (3). P. 709–725. DOI: 10.1042/BCJ20190463.
14. Pan J., Tao C., Cao C., Zheng Q., Lam S.M., Shui G., Liu X., Li K., Zhao J., Wang Y. Adipose lipidomics and RNA-Seq analysis revealed the enhanced mitochondrial function in UCP1 knock-in pigs // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids. 2019. Vol. 1864 (10). P. 1375–1383. DOI: 10.1016/j.bbalip.2019.06.017.
15. Zhang D., Shen L., Wu W., Liu K., Zhang J. Cloning and functional verification of a porcine adipose tissue-specific promoter // BMC genomics. 2022. Vol. 23 (1). P. 1–9. DOI: 10.1186/s12864-022-08627-0.
16. Stoian A., Rowland R.R., Petrovan V., Shea-

- han M., Samuel M.S., Whitworth M.K., Wells D.K., Zhang J., Beaton B., Cigan M., Prather S.R. The use of cells from ANPEP knockout pigs to evaluate the role of aminopeptidase N (APN) as a receptor for porcine deltacoronavirus (PDCoV) // *Virology*. 2020. Vol. 541. P. 136–140. DOI: 10.1016/j.virol.2019.12.007.
17. Luo L., Wang S., Zhu L., Fan B., Liu T., Wang L., Zhao P., Dang Y., Sun P., Chen J., Zhang Y., Chang X., Yu Z., Wang H., Guo R., Li B., Zhang K. Aminopeptidase N-null neonatal piglets are protected from transmissible gastroenteritis virus but not porcine epidemic diarrhea virus // *Scientific reports*. 2019. Vol. 9 (1). P. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-49838-y.
18. Wang H., Shen L., Chen J., Liu X., Tan T., Hu Y., Bai X., Li Y., Tian K., Li N., Hu X. Deletion of CD163 exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs // *International Journal of Biological Sciences*. 2019. Vol. 15 (9). P. 1993. DOI: 10.7150/ijbs.34269.
19. Oh J., Choi K., Lee C. Multi-resistance strategy for viral diseases and in vitro short hairpin RNA verification method in pigs // *Asian-Australasian journal of animal sciences*. 2018. Vol. 31 (4). P. 489. DOI: 10.5713/ajas.17.0749.
20. Guo C., Wang M., Zhu Z., He S., Liu H., Liu X., Shi X., Tang T., Yu P., Zeng J., Yang L., Cao Y., Chen Y., Liu X., He Z. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection // *Frontiers in immunology*. 2019. Vol. 10. P. 1846. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01846.
21. Xie Z., Jiao H., Xiao H., Jiang Y., Liu Z., Qi C., Zhao D., Jiao S., Yu T., Tang X., Pang D., Ouyang H. Generation of pRSAD2 gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology // *Antiviral Research*. 2020. Vol. 174. P. 104696. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104696.
- Genetics and breeding of animals*, 2018, no. 2, pp. 4–12. (In Russian).
3. Zhang J., Khazalwa E.M., Abkhallo H.M., Zhou Y., Nie X., Ruan J., Zhao C., Wang J., Xu J., Li X., Zhao S., Zuo E., Steinaa L., Xie S. The advancements, challenges, and future implications of the CRISPR/Cas9 system in swine research. *Journal of Genetics and Genomics*, 2021, vol. 48 (5), pp. 347–360. DOI: 10.1016/j.jgg.2021.03.015.
4. Sharma V., Kaushik S., Kumar R., Yadav J.P., Kaushik S. Emerging trends of Nipah virus: A review. *Reviews in medical virology*, 2019, vol. 29 (1), p. e2010. DOI: 10.1002/rmv.2010.
5. Choe Y.J., Jee Y., Takashima Y., Lee J.K. Japanese encephalitis in the Western Pacific region: implication from the Republic of Korea. *Vaccine*, 2020, vol. 38 (13), pp. 2760–2763. DOI: 10.1016/j.vaccine.2020.02.061.
6. Chen S.J. Minimizing off-target effects in CRISPR-Cas9 genome editing. *Cell biology and toxicology*, 2019, vol. 35 (5), pp. 399–401. DOI: 10.1007/s10565-019-09486-4.
7. Knott G.J., Doudna J.A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*, 2018, vol. 361 (6405), pp. 866–869. DOI: 10.1126/science.aat5011.
8. Liu J., Pan M., Huang D., Guo Y., Yang M., Zhang W., Mai K. Myostatin-1 inhibits cell proliferation by inhibiting the mTOR signal pathway and MRFs, and activating the ubiquitin-proteasomal system in skeletal muscle cells of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*. *Cells*, 2020, vol. 9 (11), p. 2376. DOI: 10.3390/cells9112376.
9. Xiang G., Ren J., Hai T., Fu R., Yu D., Wang J., Li W., Wang H., Zhou Q. Editing porcine IGF2 regulatory element improved meat production in Chinese Bama pigs. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2018, vol. 75, pp. 4619–4628. DOI: 10.1007/s00018-018-2917-6.
10. Liu X., Liu H., Wang M., Li R., Zeng J., Mo D., Cong P., Liu X., Chen Y., He Z. Disruption of the ZBED6 binding site in intron 3 of IGF2 by CRISPR/Cas9 leads to enhanced muscle development in Liang Guang Small Spotted pigs. *Transgenic research*, 2019, vol. 28, pp. 141–150. DOI: 10.1007/s11248-018-0107-9.
11. Younis S., Schonke M., Massart J., Hjortebjerg R., Sundstrom E., Gustafson U., Bjornholm M., Krook A., Frystyk J., Zierath J.R. The ZBED6-IGF2 axis has a major effect on growth of skeletal muscle and internal organs in placental mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, vol. 115 (9), pp. E2048–E2057.

REFERENCES

1. Larkina T.A., Krutikova A.A., Kozikova L.V. Editing the genome of farm animals using CRISPR/Cas9 technology. *Molochnokhozyaistvennyi vestnik = Dairy Bulletin*, 2018, no. 3 (31), pp. 24–35. (In Russian). DOI: 10.24411/2225-4269-2018-00018.
2. Yakovlev A.F. The genome editing of agricultural animals. *Genetika i razvedenie zhivotnykh =*

- DOI: 10.1073/pnas.1719278115.
12. Wang D., Pan D., Xie B., Wang S., Xing X., Liu X., Ma Y., Andersson L., Wu J., Jiang L. Porcine ZBED6 regulates growth of skeletal muscle and internal organs via multiple targets. *PLoS Genetics*, 2021, vol. 17 (10), p. e1009862. DOI: 10.1371/journal.pgen.1009862.
 13. Roesler A., Kazak L. UCP1-independent thermogenesis. *Biochemical Journal*, 2020, vol. 477 (3), pp. 709–725. DOI.org/10.1042/BCJ20190463.
 14. Pan J., Tao C., Cao C., Zheng Q., Lam S.M., Shui G., Liu X., Li K., Zhao J., Wang Y. Adipose lipidomics and RNA-Seq analysis revealed the enhanced mitochondrial function in UCP1 knock-in pigs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2019, vol. 1864 (10), pp. 1375–1383. DOI: 10.1016/j.bbalip.2019.06.017.
 15. Zhang D., Shen L., Wu W., Liu K., Zhang J. Cloning and functional verification of a porcine adipose tissue-specific promoter. *BMC genomics*, 2022, vol. 23 (1), pp. 1–9. DOI: 10.1186/s12864-022-08627-0.
 16. Stoian A., Rowland R.R., Petrovan V., Sheahan M., Samuel M.S., Whitworth M.K., Wells D.K., Zhang J., Beaton B., Cigan M., Prather S.R. The use of cells from ANPEP knock-out pigs to evaluate the role of aminopeptidase N (APN) as a receptor for porcine deltacoronavirus (PDCoV). *Virology*, 2020, vol. 541, pp. 136–140. DOI: 10.1016/j.virol.2019.12.007.
 17. Luo L., Wang S., Zhu L., Fan B., Liu T., Wang L., Zhao P., Dang Y., Sun P., Chen J., Zhang Y., Chang X., Yu Z., Wang H., Guo R., Li B., Zhang K. Aminopeptidase N-null neonatal piglets are protected from transmissible gastroenteritis virus but not porcine epidemic diarrhea virus. *Scientific reports*, 2019, vol. 9 (1), pp. 1–10. DOI: 10.1038/s41598-019-49838-y.
 18. Wang H., Shen L., Chen J., Liu X., Tan T., Hu Y., Bai X., Li Y., Tian K., Li N., Hu X. Deletion of CD163 exon 7 confers resistance to highly pathogenic porcine reproductive and respiratory viruses on pigs. *International Journal of Biological Sciences*, 2019, vol. 15 (9), p. 1993. DOI: 10.7150/ijbs.34269.
 19. Oh J., Choi K., Lee C. Multi-resistance strategy for viral diseases and in vitro short hairpin RNA verification method in pigs. *Asian-Australasian journal of animal science*, 2018, vol. 31 (4), p. 489. DOI: 10.5713/ajas.17.0749.
 20. Guo C., Wang M., Zhu Z., He S., Liu H., Liu X., Shi X., Tang T., Yu P., Zeng J., Yang L., Cao Y., Chen Y., Liu X., He Z. Highly efficient generation of pigs harboring a partial deletion of the CD163 SRCR5 domain, which are fully resistant to porcine reproductive and respiratory syndrome virus 2 infection. *Frontiers in immunology*, 2019, vol. 10, p. 1846. DOI: 10.3389/fimmu.2019.01846.
 21. Xie Z., Jiao H., Xiao H., Jiang Y., Liu Z., Qi C., Zhao D., Jiao S., Yu T., Tang X., Pang D., Ouyang H. Generation of pRSAD2 gene knock-in pig via CRISPR/Cas9 technology. *Antiviral Research*, 2020, vol. 174, p. 104696. DOI: 10.1016/j.antiviral.2019.104696.

ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ

✉ **Колосова М.А.**, кандидат сельскохозяйственных наук, ведущий научный сотрудник; **адрес для переписки:** Россия, 346493, Ростовская область, Октябрьский район, п. Персиановский, ул. Кривошлыкова, 24; e-mail: m.leonovaa@mail.ru

Романец Е.А., аспирант, лаборант-исследователь

Колосов А.Ю., кандидат сельскохозяйственных наук, младший научный сотрудник

Гетманцева Л.В., доктор биологических наук, ведущий аналитик

AUTHOR INFORMATION

✉ **Maria A. Kolossova**, Candidate of Science in Agriculture, Lead Researcher; **address:** 24, Krivoshlykova St., Persianskiy Village, Rostov Region, 346493, Russia; e-mail: m.leonovaa@mail.ru

Elena A. Romanets, Post-graduate Student, Research Assistant

Anatoly Yu. Kolosov, Candidate of Science in Agriculture, Junior Researcher

Lubov V. Getmantseva, Doctor of Science in Biology, Lead Analyst

Дата поступления статьи / Received by the editors 12.10.2022
Дата принятия к публикации / Accepted for publication 20.01.2023
Дата публикации / Published 20.07.2023