

Streszczenie

Rosnąca długość życia ludzi doprowadziła do wzrostu liczby pacjentów z chorobami przewlekłymi i niewydolnością narządów. Przeszczep organów jest skutecznym podejściem w leczeniu schyłkowej niewydolności narządów. Jednak brak równowagi między podażą narządów, a popytem na organy człowieka stanowi poważny problem we współczesnej transplantologii. W związku z powyższym poszukiwane są alternatywy, które umożliwiłyby zmniejszenie, bądź zlikwidowanie tego problemu. Jednym z rozwiązań jest zastosowanie ksenotransplantacji. Ksenotransplantacją nazywamy każdy zabieg, który polega na transplantacji, implantacji lub infuzji biorcy (w tym wypadku człowiekowi) – komórek, tkanek lub organów odzwierzęcych. Ponadto pod to pojęcie podlegają także terapie wykorzystujące płyny ustrojowe, tkanki, narządy lub komórki człowieka, które miały kontakt *ex vivo* z organami, tkankami lub komórkami zwierzęcymi. Świnia domowa jest obecnie uważana za najbardziej odpowiedni gatunek do pozyskiwania narządów dla człowieka. Powody wyboru świni jako zwierzęcia donorowego obejmują względnie liczny miot i krótki okres dojrzewania, rozmiar i podobieństwo fizjologiczne jej narządów do organów człowieka oraz niskie ryzyko przeniesienia ksenozoonoz. Istnieją jednak rozbieżności między świnią a człowiekiem, które prowadzą do powstania barier immunologicznych uniemożliwiających bezpośrednio wykonanie ksenoprzeszczepu. Różnice te prowadzą do odrzucenia ksenoprzeszczepu. Wprowadzenie odpowiednich modyfikacji do genomu świni celem przeciwdziałania odrzuceniu ksenoprzeszczepów jest kluczowe w badaniach dotyczących ksenotransplantacji. Zastosowanie systemu CRISPR/Cas9 należącego do metod wykorzystujących ukierunkowane nukleazy w inżynierii genetycznej do modyfikacji genomów stanowi ogromny postęp w dziedzinie transgenezy zwierząt.

Głównym celem badań wykonywanych w niniejszej pracy doktorskiej jest wprowadzenie precyzyjnych modyfikacji za pomocą systemu CRISPR/Cas9 w obrębie *locus Rosa26* świni oraz genów *GGTA1*, *CMAH*, *β 4GalNT2*, *vWF* i *ASGR1* świni. Przeprowadzono ocenę wydajności otrzymywania modyfikacji za pomocą konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9 trzech generacji zawierających gRNA wybrane po analizie bioinformatycznej w platformie Benchling. Wydajności otrzymywania modyfikacji wytypowane bioinformatycznie porównano z wynikami uzyskanymi za

pomocą transfekcji przeprowadzonej na pierwotnych fibroblastach nerkowych świni hodowanych *in vitro*. W kolejnym etapie wybrano najlepsze gRNA, które w połączeniu z Cas9 wydajnie wprowadzają modyfikacje w obrębie wybranych genów. Przeprowadzono także charakterystykę wybranych gRNA celem weryfikacji obecności miejsc hydrolizy DNA przez nukleazę Cas9 powstających poza *locus* docelowym dla krótkiego oligonukleotydu.

Wyniki niniejszych badań wykazały wpływ generacji systemu CRISPR/Cas9 na wydajność uzyskiwanych modyfikacji za ich pośrednictwem. We wszystkich badanych konstrukcjach dla każdego gRNA uzyskano wyższą wydajność otrzymywania modyfikacji za pośrednictwem systemu CRISPR/Cas9 drugiej generacji w porównaniu do pierwszej generacji. Przedstawione w niniejszej rozprawie badania pokazują znaczenie weryfikacji wytypowanych bioinformatycznie gRNA w kontekście wydajności otrzymywania modyfikacji za ich pośrednictwem. Przeprowadzono także analizę powstawania mutacji niepożądanych po zastosowaniu systemu CRISPR/Cas9. W kulturach komórkowych *in vitro* potwierdzono obecność jedenastu z dwudziestu jeden wytypowanych bioinformatycznie miejsc hydrolizy DNA poza celem, w których pośredniczą gRNA z wybranych jako najlepsze konstrukcji genetycznych systemu CRISPR/Cas9.

Wytypowane gRNA, które w połączeniu z nukleazą Cas9 umożliwiają wydajne wprowadzanie zmian w obrębie badanych genów mogą posłużyć do otrzymywania modyfikowanych genetycznie świń na cele ksenotransplantacyjne.

7.04.2020r.
Natalia Rycaek