

Abstrakt

Genová editace pomocí CRISPR/Cas9 systému je jedna z možností, která udává nový směr v rozvoji genové terapie. Nejčastěji využívaným prostředkem pro přenos DNA do buněk jsou viry, které však nedokáží často pojmout CRISPR/Cas9 systém, velký až několik kb. Nanočástice (NPs) jako neviróvé přenašeče se jeví jako možný prostředek, jak tento systém do buňky přenést. Pro tuto práci byly vybrány magnetické Fe_3O_4 NPs (MNPs) kvůli jejich skvělým vlastnostem jako je multifunkčnost, biokompatibilita, snadná odbouratelnost a jednoduchá syntéza.

Cílem práce bylo vytvořit MNPs a komplex MNPs obalených PEI/CRISPR-Cas9 plazmidem a následně je charakterizovat pomocí fyzikálně chemických metod. Vytvořenému komplexu MNPs/PEI/CRISPR-Cas9 byly definovány přesné parametry, které byly určeny jako vhodné pro možné pohlcení buňkou. Byla ověřena také hypotéza stabilizace komplexu MNPs/CRISPR-Cas9 plazmidu po přidání polyethyleniminu (PEI), který dokáže také plazmidovou DNA ochránit i před restriktivními endonukleázami. Následně mohla být komplexem MNPs/PEI/CRISPR-Cas9 transfekována stabilní modifikovaná buněčná linie HEK293-TLR3, určená pro možné pozorování oprav dvouřetězcových zlomů (DSB) pomocí nehomologního připojení konců (NHEJ) nebo homologní rekombinace (HR). Výsledky ukazují efektivitu transfekce 13 % a pro NHEJ 5 % a HR necelé 1 %. Finálním testem cytotoxicity komplexu PEI+MNPs byla zjištěna nesignifikantní toxicita částic.

Výsledky této práce potvrdily možné budoucí použití vytvořené metodiky s výsledným terapeutickým použitím, kdy bude možné zacílit na konkrétní mutované geny.

Klíčová slova: nanočástice, genová terapie, CRISPR/Cas9