

Afrykański pomór świń (ASF) jest wolno szerzącą się wirusową, zakaźną chorobą świń i dzików. Na zakażenie wrażliwe są również inne gatunki z rodziny *Suidae*. Najważniejszym wektorem wirusa afrykańskiego pomoru świń (ASFV) na terenie Europy wschodniej są dziki. Z kolei na Półwyspie Iberyjskim oraz w krajach Europy zachodniej o klimacie śródziemnomorskim, Afryce i niektórych regionach Rosji wektorem ASFV mogą być również kleszcze należące do rodzaju *Ornithodoros*. ASF ma bardzo duże znaczenie epidemiologiczne oraz ekonomiczne ze względu na ograniczenia związane z międzynarodowym handlem trzodą chlewną oraz produktami przetworzonymi. Dotychczas nie udało się opracować skutecznej szczepionki przeciwko ASF, co jest związane z unikalną charakterystyką wirusa. Przeprowadzone dotychczas badania naukowe i porównania kompletnych genomów ASFV różnych szczepów wskazują na duże znaczenie niektórych regionów jego genomu w wirulencji. Celem podjętych badań będzie konstrukcja oraz zbadanie właściwości biologicznych rekombinowanego szczepu ASFV pozbawionego genów A238L, EP402R i 9GL. Geny te mają udział w blokowaniu ekspresji czynników związanych z odpowiedzią immunologiczną gospodarza oraz są odpowiedzialne za hemadospreję i tzw. dojrzewanie cząstek wirusowych. Badania zostaną przeprowadzone z użyciem reprezentatywnego szczepu ASFV, który zostanie wybrany po analizie techniką sekwencjonowania następnej generacji (NGS) z kolekcji zgromadzonych dotychczas 93 izolatów wirusa występujących w populacji dzików oraz 3 izolatów pochodzących od świń. Przeprowadzone przez zespół Krajowego Laboratorium Referencyjnego ds. ASF w PIWet-PIB badania własne dotyczące pochodzenia izolatów ASFV krążących w Polsce na podstawie sekwencji genów A238L, EP153L, EP402R i MGF505-2R wykazały, że ich podobieństwo wynosiło od 99,4 do 100% do szczepu Georgia 2007/1. Szczep ten wprowadzono na teren Gruzji w 2007 roku i krąży on nadal w populacji dzików i świń na terenie Rosji, Litwy, Łotwy i Estonii. Konstrukcja rekombinowanego szczepu ASFV z wprowadzonymi mutacjami w obrębie regionów A238L, EP402R i 9GL pozwoliła by na sprawdzenie wpływu indukowanych mutacji na właściwości biologiczne ASFV w hodowlach komórkowych oraz na przykładzie modelu świń. Badania tego typu z wykorzystaniem techniki CRISPR/Cas9 nie były dotychczas prowadzone w żadnej światowej jednostce naukowej. Oprócz poznawczej wartości planowanych badań ich wyniki pozwolą na wskazanie kierunku badań do otrzymania potencjalnych kandydatów do opracowania szczepionki przeciwko ASF. W pierwszym zadaniu badawczym do konstrukcji rekombinowanego szczepu ASFV pozbawionego genów A238L, EP402R i 9GL zostanie wybrany reprezentatywny izolat wirusa z kolekcji KLR ds. ASF w PIWet-PIB. W drugim etapie projektu w komórkach linii VERO z użyciem technologii CRISPR/Cas9 zostanie przeprowadzony etap mutageny regionów A238L, EP402R i 9GL. W tym celu zostaną zaprojektowane matrycowe odcinki gRNA (ang. guided RNA) dla endonukleazy Cas9 związanej z systemem CRISPR (regularnie zgrupowanych i oddzielonych krótkich sekwencji palindromowych). Dokładnie zaprojektowane matryce gRNA pozwolą na przecięcie podwójnej nici DNA w regionach A238L, EP402L i 9GL a następnie ponowne połączenie DNA dzięki homologicznym systemom naprawczym. Otrzymany rekombinowany szczep ASFV będzie badany w hodowlach komórkowych VERO lub linii komórkowej makroflagów świń. W trzecim zadaniu będą badane właściwości biologiczne otrzymanego rekombinowanego szczepu ASFV oraz szczepu pierwotnie użytego do badań. Badania te będą przeprowadzone z użyciem 30 świń o znanym statusie immunologicznym w pomieszczeniach dla zwierząt klasy PCL3+ PIWet-PIB o wysokich standardach bioasekuracji. Uzyskane wyniki będą analizowane statystycznie i pozwolą na określenie wpływu wprowadzenia indukowanych mutacji na replikację, wirulencję i siewstwo ASFV do otoczenia. Proponowane badania mają bardzo duże znaczenie poznawcze dla współczesnej epidemiologii i immunologii ASF. Zastosowanie po raz pierwszy na świecie technologii CRISPR/Cas9 do otrzymania rekombinowanego szczepu ASFV pozwoli na swobodną manipulację w obrębie wybranych regionów genomu tego wirusa. W przyszłości efekty badań mogą pozwolić na znalezienie potencjalnych kandydatów do szczepionki przeciwko ASF. Wyniki badań będą publikowane w renomowanych czasopiśmie wirusologicznych oraz poświęconych chorobom zakaźnym świń. Wyniki będą też prezentowane podczas konferencji krajowych i międzynarodowych poświęconych chorobom świń.