

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА  
НАВЧАЛЬНО-НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри молекулярної біотехнології та біоінформатики  
доцент Нипорко Олексій Юрійович  
Протокол № \_\_\_\_\_ засідання кафедри  
від «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 р.

**СТВОРЕННЯ ПЛАЗМІДНИХ КОНСТРУКТІВ ДЛЯ НОКАУТУ ТА  
НОКІНУ ГЕНА ГІПОКАЛЬЦИНА В ПЕРВИННІЙ КУЛЬТУРІ  
НЕЙРОНІВ ГІПОКАМПА**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра  
студентки спеціальності 091 «Біологія»  
ОП «Біологія (високі технології)»  
**Верховець Єлизавети Олександрівни**

Науковий керівник від кафедри  
доцент кафедри біотехнології та біоінформатики  
**к.ф.-м.н. Войтешенко Іван Сергійович**

Робота виконана у відділі біофізики сенсорної сигналізації  
Інституту фізіології ім. Богомольця НАН України  
під керівництвом д.б.н **П. В. Білана**

Частина практичної роботи виконана у відділі сигнальних систем клітини  
Інституту молекулярної біології та генетики НАН України  
під керівництвом к.б.н **С. С. Пальчевського**

Оцінка захисту роботи

---

Київ - 2024 р.

## АНОТАЦІЯ

**Верховець Є. О.** Створення плазмідних конструктів для нокауту та нокіну гена гіпокальцина в первинній культурі нейронів гіпокампа. — Випускна кваліфікаційна робота бакалавра за спеціальністю 091 Біологія ОП «Біологія (високі технології)».

Однією з головних проблем під час дослідження сигналізації гіпокальцина з мутаціями, що асоційовані з первинною дистонією, є низька експресія екзогенного білка, порівняно з відповідним ендегенним. Для розв'язання цієї проблеми необхідно нокаутувати ген гіпокальцина клітинах, що досліджуються. Але використання первинної культури нейронів вимагає контрольованого нокауту, що дозволить одразу оцінити успішність нокаутування ендегенного білка.

У роботі було детально досліджено білок гіпокальцин, його функції й структуру, проаналізовано методи редагування геному на основі технології CRISPR/Cas9 та методи молекулярного клонування. У ході дослідження було створено плазмідні конструкти для контрольованого нокауту гіпокальцина. Вектори, створені в результаті виконання дипломної роботи, будуть використані для подальших нейрофізіологічних досліджень, що спрямовані на вивчення функцій гіпокальцина.

**Ключові слова:** гіпокальцин, первинна дистонія, редагування геному, плазмідні вектори, молекулярне клонування.

## ANNOTATION

**Verkhovets Y.O.** Construction of plasmid vectors for knockout and knock-in of the hyppocalcin gene in primary hippocampal neuronal culture. — Qualification work of bachelor in the field of study 091 Biology, “Biology (High Technologies)”.

One of the main problems in the study of hyppocalcin signalling with mutations associated with primary dystonia is the low expression of exogenous protein compared to the corresponding endogenous protein. To solve this problem, it is necessary to knockout the hyppocalcin gene in the cells. However, the use of primary neuronal culture requires a controlled knockout, which allows us to immediately assess the success of knocking out the endogenous protein.

We studied the hyppocalcin protein, its functions and structure, analyzed genome editing methods based on CRISPR/Cas9 technology and molecular cloning methods. In our research, we created plasmid constructs for controlled knockout of hyppocalcin. The vectors created during our research will be used for further neurophysiological studies to study the functions of hyppocalcin.

**Key words:** hyppocalcin, primary dystonia, genome editing, plasmid vectors, molecular cloning.

## ЗМІСТ

Вступ .....	6
Перелік умовних скорочень.....	8
Розділ 1. Огляд літератури.....	9
1.1 Сигнальна роль нейронного кальцієвого сенсора в нейронах .....	9
1.1.1 Загальні відомості про нейронні кальцієві сенсорні білки.....	9
1.1.2 Сигналізація гіпокальцина у нейронах гіпокампа.....	10
1.1.3 Мутації гена гіпокальцина.....	11
1.2 Флуоресценція в нейрофізіологічних дослідженнях.....	12
1.3 Методи редагування геному .....	13
1.3.1 Технологія CRISPR-cas9 .....	13
1.3.2 Технологія TKIT .....	15
1.3.3 Технологія ORANGE.....	16
1.4 Методи молекулярного клонування .....	17
1.4.1 SLIC.....	18
1.4.2 Метод клонування Гібсона .....	19
1.4.3 Gateway .....	19
1.4.4 Golden Gate .....	19
Розділ 2. Методи, що використовувалися в роботі .....	21
2.1 Фосфорилування та відпалювання олігонуклеотидів .....	21
2.2 Лігування фосфорильованих нуклеотидів .....	21
2.3 Підготовка чашок Петрі для посіву .....	22
2.4 Приготування компетентних клітин.....	23
2.5 Трансформація компетентних клітин продуктами лігування.....	23
2.6 Виділення плазмід .....	23
2.7 Перевірка вставки gRNA у векторну плазмиду за допомогою ПЛР та гель-	

	5
електрофорез отриманих ампліконів .....	24
2.2.8 Клонування флуоресцентного білка LSSmOrange за допомогою ПЛР та гель-електрофорез ампліконів .....	25
2.2.9 Виділення та очищення продуктів ПЛР з гелю .....	27
2.2.10 Рестрикція отриманих клонів за допомогою рестриктаз KpnI та XbaI	27
2.2.11 SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning).....	28
Розділ 3. Практична частина.....	30
3.1 Пошук інструментів для створення клонів на основі CRISPR/Cas9 .....	30
3.2 Дизайн плазмідних векторів для нокіну гена гіпокальцину у щурів.....	31
3.3 Дизайн контрольного вектора .....	34
3.4 Збірка плазмідних векторів.....	36
3.4.1 Збірка векторів .....	36
3.4.2 Збірка векторів <i>in silico</i> .....	40
Розділ 4. Обговорення результатів.....	44
Висновки.....	46
Список використаних джерел.....	47
Додатки.....	56

## Вступ

Первинна дистонія — це хронічний неврологічний розлад, який характеризується аномальними та мимовільними скручувальними й поворотними м'язовими рухами. Хвороба також може супроводжуватися болем та емоційними розладами [1]. Відомо, що при дистонії спостерігаються порушення у багатьох ділянках мозку, таких як кора головного мозку, смугасте тіло, мозочок, таламус, середній мозок та гіпокамп [2, 3].

Зокрема, було виявлено, що при симптомах дистонії у гіпокампі спостерігаються зміни регуляції концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [4] та експресії  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків [5]. Серед  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих білків важливу роль у розвитку первинної дистонії відіграє гіпокальцин. Це нейронний кальцієвий сенсорний білок, що містить три EF-домени, здатні зв'язувати  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Зв'язування з іонами кальцію призводить до активації  $\text{Ca}^{2+}$ -міристилового перемикачання, внаслідок чого відбувається зміна конформації гіпокальцину та вивільнення міристильованого N-кінця із гідрофобної кишені молекули [7]. Відомо, що цей механізм дозволяє гіпокальцину транслокуватися з цитозолу до плазматичної мембрани. Було показано, що мутації гена гіпокальцина, асоційовані з первинною дистонією, погіршують його здатність зв'язуватися з іонами кальцію та зменшують його транслокацію до плазматичної мембрани, що асоційовано із порушеннями в механізмах короткотривалої пластичності, повільної постгіперполяризації (sAHP) і спричиняє підвищення збудливості нейронів [8]. Також припускають, що зв'язування гіпокальцина з іонами лежить в основі довготривалої депресії — зниження ефективності нейронних синапсів [9]. Проте механізм його сигналізації у цьому випадку до кінця не встановлений.

Дослідження сигналізації гіпокальцина проводять на клітинах, які трансфікуються плазмідами, що містять флуоресцентно мічений гіпокальцин з мутаціями, які викликають дистонію. Однією з головних проблем у цих дослідженнях є оцінка рівня експресії екзогенного білка, порівняно з відповідним ендегенним. Було показано, що концентрація екзогенного

гіпокальцина в досліджуваних нейронах гіпокампа становить не більше 10 мкМ, що втричі менше, порівняно з концентрацією ендogenous, яка становить близько 30 мкМ [10]. Відповідно, при дослідженні механізму сигналізації гіпокальцина з мутаціями, висока концентрація ендogenous білка спотворює результати експерименту. Також труднощі виникають через використання у дослідженнях первинної культури, що не пересівається. Адже це унеможлиблює використання класичного методу CRISPR/Cas9 для нокауту гена гіпокальцина, що полягає у відборі моноклонів в іморталізованих лініях.

Тому метою роботи було проаналізувати доступні методи редагування геному та створити плазмідни, за допомогою яких можна буде нокаутувати ген гіпокальцина в первинній культурі нейронів гіпокампа й одразу їх валідувати.

Відповідно до мети було сформовано наступні завдання:

- 1) Провести аналіз методів редагування геному та знайти підхід на основі CRISPR/Cas9, який дозволить робити контрольований нокаут або нокін геному гіпокальцина в первинній культурі нейронів гіпокампа;
- 2) Відповідно до обраного підходу розробити дизайн напрямних РНК, праймерів та готових плазмідних векторів;
- 3) Створити плазмідні вектори *in silico*;
- 4) Розпочати збірку плазмідних векторів.

### Перелік умовних скорочень

NCS — Neuronal Calcium Sensor, нейронні кальцієві сенсори

CaBP — Calcium-Binding Proteins, Ca<sup>2+</sup>-зв'язуючі білки

NMDAR — N-methyl-D-Aspartate Receptor, рецептор, що селективно зв'язує N-метил-Д-аспартат

HPCA — ген гіпокальцина

LTD — long-term depression, довготривала депресія

sAHP — slow afterhyperpolarization, повільна постгіперполяризація

CRISPR — clustered regularly interspaced short palindromic repeats, короткі регулярно розташовані паліндромні повтори

gRNA — guide RNA, напрямна РНК

crRNA — CRISPR RNA, CRISPR РНК

tracrRNA — trans-activating CRISPR RNA, трансактивуюча РНК

PAM — protospacer adjacent motif, протоспейсерний суміжний мотив

NHEJ — non-homologous end joining, негомологічне з'єднання кінців

НІТІ — homology-independent targeted insertion, гомологічно-незалежна цільова вставка

HDR — homology-directed repair, гомологічно-залежна рекомбінація

ПЛР — полімеразна ланцюгова реакція

## Розділ 1. Огляд літератури

### 1.1 Сигнальна роль нейронного кальцієвого сенсора в нейронах

#### 1.1.1 Загальні відомості про нейронні кальцієві сенсорні білки

Іони  $\text{Ca}^{2+}$  — майже універсальні сигнальні іони, що робить їх критично важливими для клітин. Вони регулюють багато процесів в організмі, зокрема скорочення м'язових клітин, екзоцитоз, рух та ріст клітин, апоптоз тощо [11, 12, 13]. Звісно кальцій відіграє важливу роль і в нейронах, контролюючи вивільнення нейромедіаторів, беручи участь у передачі деполяризаційного сигналу та відіграючи сигнальну роль [14]. Відомо, що в основі кальцієвої сигналізації лежить зміна концентрації іонів  $\text{Ca}^{2+}$  у цитоплазмі клітин. Відповідно, для передачі цієї зміни в нейронах експресуються здатні до зв'язування іонів  $\text{Ca}^{2+}$  білки, що належать до суперсімейства кальмодуліну [15]. Особливістю цих білків є наявність  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючих EF-доменів [16]. До них відносяться два сімейства: нейронні кальцієві сенсорні (NCS) та  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючі білки (CaBP).

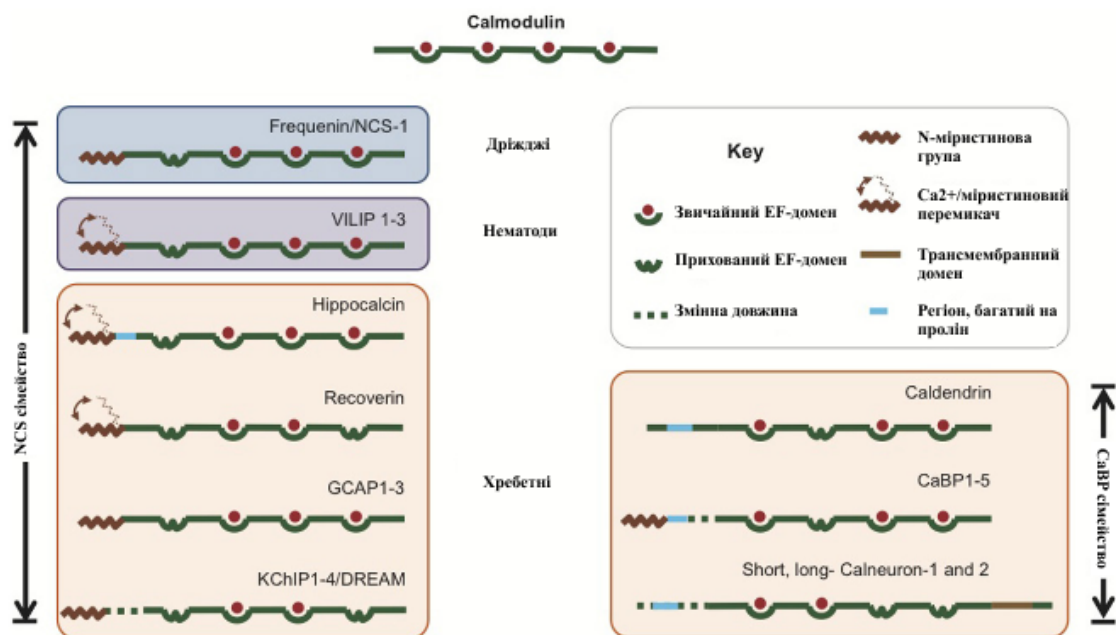


Рисунок 1.1.1.1 — Загальний огляд суперсімейства кальмодуліну [15]

До сімейства NCS належать білки NCS-1, гіпокальцин, нейрокальцин- $\delta$ , VILIP1-3, рековерин, GCAP1-3 та KChIP1-4 [16]. Найбільш дослідженим серед нейронних кальцієвих сенсорів є рековерин, що був першим відкритим білком NCS [17]. Експресується цей білок у фоторецепторах, біполярних клітинах колбочок сітківки та шишкоподібній залозі [19]. Він, як і більшість білків NCS, має міристинову групу на N-кінці, що знаходиться у гідрофобній кишені при низькій концентрації  $\text{Ca}^{2+}$ . При збільшенні концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  EF-домени рековерину зв'язуються з кальцієм, внаслідок чого активується  $\text{Ca}^{2+}$ -міристиловий перемикач, відбувається зміна конформації гіпокальцину та вивільнення міристильованого N-кінця із гідрофобної кишені молекули. Така конформаційна зміна дозволяє йому вбудовуватися у мембрану, адже за низьких концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  рековерин знаходяться у цитозолі [15]. Подібно до рековерину, після зв'язування з кальцієм  $\text{Ca}^{2+}$ -міристиловий перемикач активується у гіпокальцина, нейрокальцина- $\delta$ , VILIP-1 та VILIP-3. Натомість NCS-1 та KChIP1-4 навіть за низьких концентрацій  $\text{Ca}^{2+}$  локалізовані у мембрані.

### 1.1.2 Сигналізація гіпокальцину у нейронах гіпокампа

Гіпокальцин — представник нейронних кальцієвих сенсорів, який має три EF-домени, що здатні зв'язувати іони  $\text{Ca}^{2+}$  [6]. Послідовність гіпокальцину складається зі 195 амінокислотних залишків та має молекулярну масу 22574 дальтон [20]. В основному цей білок експресується у пірамідних нейронах гіпокампа, але також може експресуватися в деяких інших типах нейронних клітин [21]. Як видно з рисунка 1.1.2.1, гіпокальцин має дуже високу концентрацію в клітинах порівняно з іншими нейронними кальцієвими сенсорами та поступається лише кальмодуліну. Також, як і більшість білків NCS, гіпокальцин може змінювати свою конформацію після зв'язування з  $\text{Ca}^{2+}$  та вбудовуватися у ліпідний бішар.

Білок	$P_t$ ( $\mu\text{M}$ )	$N$	$K_{dCa}$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_t$ ( $\mu\text{M}$ )	$E_b$ ( $\mu\text{M}$ )	$P_{sat}$ ( $\mu\text{M}$ )	$\kappa_B$ at 100 nM $\text{Ca}^{2+}$
Hippocalcin	35.6	3	0.324	106.8	49.72	16.57	192.48
NCS-1	10 <sup>#</sup>	3	0.440 <sup>b</sup>	30	29.37	9.79	45.27
DREAM	10 <sup>#</sup>	2 <sup>s</sup>	~1	20	19.37	9.68	16.53
Caldendrin	10 <sup>#</sup>	2 <sup>s,<math>\alpha</math></sup>	7 <sup><math>\alpha</math>,<math>\delta</math></sup>	20	16.54	8.27	2.78
CaM	100	4	5.85 <sup>b</sup>	400	49.18	12.29	66.10

Рисунок 1.1.2.1 — Концентрація, афінність та інші параметри нейронних кальцієвих сенсорів та кальмодуліну [16].

Відомо, що гіпокальцин може інгібувати апоптоз нейронів (NAIP), що індукований підвищенням концентрації  $\text{Ca}^{2+}$  [22]. Також було показано, що зв'язування  $\text{Ca}^{2+}$  з гіпокальцином бере участь у виникненні повільної післягіперполяризації (sAHP) [23]. Відомо, що синаптичні NMDA-рецептори є основним джерелом притоку  $\text{Ca}^{2+}$  у відростки нейронів, що спричиняє транслокацію гіпокальцину з цитозолу у ліпідний бішар [24]. З цього випливає, що ймовірно гіпокальцин відіграє важливу роль у NMDAR-залежній довготривалій депресії (Long-term depression, LTD) [24].

### 1.1.3 Мутації гена гіпокальцина

Відомо, що з мутаціями у гені гіпокальцина пов'язаний розвиток аутосомно-рецесивної первинної дистонії (DYT2) — хвороби, що характеризується порушенням функції рухової системи. Мутації T71N та N75K знаходяться в межах другого EF-домену гіпокальцина. Було виявлено, що ці мутації погіршують зв'язування білка з  $\text{Ca}^{2+}$ , що перешкоджає його транслокації [8]. Зокрема мутація в N75K значно зменшує транслокацію білка до мембрани, що викликає порушення sAHP та підвищує збудливість нейронів. Також було проведено секвенування геному трьох братів та сестер, хворих на первинну дистонію аутосомно-рецесивної форми [25]. В результаті було знайдено мутацію p.Asn75Lys (N75K), про яку згадувалося раніше. Ця мутація спричиняє заміну

нейтрального аспаргіну або негативно зарядженої аспарагінової кислоти у послідовності  $\text{Ca}^{2+}$ -зв'язуючого залишку в межах другого EF-домену, на позитивно заряджений лізин [25]. Саме це і є причиною порушення зв'язування з іонами  $\text{Ca}^{2+}$ .

## 1.2 Флуоресценція в нейрофізіологічних дослідженнях

Знання точної локалізації білків дуже важливі у нейрофізіологічних дослідженнях, оскільки дають можливість детально дослідити їхні функції, взаємодію та динаміку в реальному часі [26, 27]. Також, як було згадано раніше, для коректності досліджень є важливою візуалізація ендогенного білка. Один з ефективних способів його візуалізувати — ввести флуоресцентну генетичну мітку до білка інтересу [26].

Флуоресцентні білки можна класифікувати залежно від походження флуорофора наступним чином [28]:

1. Внутрішньо флуоресцентні білки, у яких флуорофор утворюється після згортання;
2. Зовнішньо флуоресцентні білки, що використовують ендогенні біомолекули як флуорофор;
3. Зовнішньо флуоресцентні білки, які потребують введення екзогенного ліганду в якості флуорофора [28].

Внутрішньо флуоресцентні білки — найпростіші у використанні. Всі вони мають однаковий тип згортання та схожий механізм утворення флуорофора [28]. Флуорофор утворюється після згортання білка шляхом автокаталізу трьох амінокислотних залишків з ароматичними бічними ланцюгами: фенілаланіну, тирозину та триптофану [29]. Важливою умовою для згортання білка та утворення флуорофору є наявність кисню [28], а швидкість цього процесу залежить від типу білка та може тривати від кількох хвилин [30] до кількох днів [31]. Класичним представником цього типу флуоресцентних білків є зелений флуоресцентний білок GFP [32], а також до внутрішньо флуоресцентних білків

належать mCherry [33], EGFP [34], LSSmOrange, що використовувався у практичній частині цієї дипломної роботи [35], та інші [28].

Зовнішньо флуоресцентні білки з ендogenousними лігандами у ролі флуорофора також доволі прості у використанні за умови наявності відповідного флуорофора у клітині інтересу [28]. Їхня перевага над попереднім типом — здатність зв'язувати ендogenousний флуорофор за відсутності кисню, що цінно для дослідження анаеробних організмів, у яких не дозрівають внутрішньо флуоресцентні білки. Серед цих білків — зелений флуоресцентний білок UnaG, що використовує білірубін як флуорофор [36], а також зелені флуоресцентні білки, які використовують флавіни як флуорофор [37, 38].

Зовнішньо флуоресцентні білки з екзогенними лігандами у ролі флуорофора мають кілька механізмів дії [28]. Перший з них — зв'язування флуороген-активуючих білків з нефлуоресцентними молекулами, що набувають флуоресцентних властивостей після зв'язування. Прикладом такого механізму є FlAsH/ReAsH, в якому тетрацистеїновий мотив розпізнає миш'яквмісні барвники [39], що стають флуоресцентними після зв'язування з тетрацистеїновою міткою. Інший механізм ґрунтується на ковалентному приєднанні до білка молекули барвника з флуоресцентними властивостями. Прикладами таких міток є SNAP tag [40], CLIP tag [41], Halo tag [42].

### 1.3 Методи редагування геному

#### 1.3.1 Технологія CRISPR-cas9

CRISPR/Cas9 — адаптивна імунна система бактерій та архей, що захищає їх від чужорідних нуклеїнових кислот. Вона складається з регулярно розташованих коротких паліндромних повторів CRISPR, які розділені варіабельними ділянками ДНК — спейсерами, нуклеотидні послідовності яких відповідають протоспейсерам — фрагментам ДНК чужорідних генетичних елементів, а також з набору cas генів, що асоційовані з CRISPR, та кодують білки Cas з ендонуклеазною активністю [43]. CRISPR/Cas системи поділяються на 2

класи, 6 типів та кілька підтипів, залежно від білків-ефекторів, що використовуються у цих системах [44]. Для редагування геному найчастіше використовується система CRISPR/Cas9, що належить до II типу CRISPR/Cas систем [45]. Основними компонентами цієї системи є РНК-керована ендонуклеаза Cas9, що отримується з *Streptococcus pyogenes*, та одноланцюгова напрямна РНК (gRNA). gRNA своєю чергою складається з крРНК (CRISPR RNA, crRNA), що комплементарна цільовій ДНК, та транскрипційної РНК (tracrRNA), що забезпечує взаємодію крРНК з білком Cas9 [46]. Редагування геному за допомогою системи CRISPR/Cas9 відбувається у три етапи: розпізнавання, розщеплення та відновлення [47]. На першому етапі gRNA розпізнає протоспейсер та спрямовує білок Cas9. Важливу роль у цьому процесі відіграє протоспейсерний мотив (PAM) — коротка послідовність, що прилягає до протоспейсера. Для Cas9 протоспейсерним мотивом є послідовність з трьох нуклеотидів 5'-NGG-3', де N може бути будь-яким нуклеотидом [48]. Після розпізнавання ендонуклеаза Cas9 робить дволанцюгові розриви у ділянці між фрагментом комплементарної до крРНК цільової ДНК та PAM. Розщеплення ДНК відбувається завдяки двом доменам Cas9: HNH-домен розщеплює комплементарний ланцюг, а RuvC-домен — не комплементарний [49]. Відновлення утворених дволанцюгових розривів відбувається за допомогою клітинних механізмів. Існує два основні механізми відновлення: негомологічне з'єднання кінців (NHEJ) та гомологічно-спрямоване відновлення (HDR) [48]. За негомологічного з'єднання кінців відновлення дволанцюгових розривів відбувається шляхом з'єднання фрагментів ДНК за допомогою ензиматичного процесу за відсутності екзогенної гомологічної ДНК. Цей механізм активний у всіх фазах клітинного циклу та є найефективнішим механізмом відновлення в клітинах, але його недоліком є утворення випадкових інсерцій або делецій (indel-мутацій). Для відновлення шляхом гомологічного відновлення потрібна донорна ДНК, що буде вставлятися за місцем розриву. Такий механізм забезпечує високоточну вставку необхідного фрагменту ДНК, але є ефективним лише у S та G2 фазах клітинного циклу.

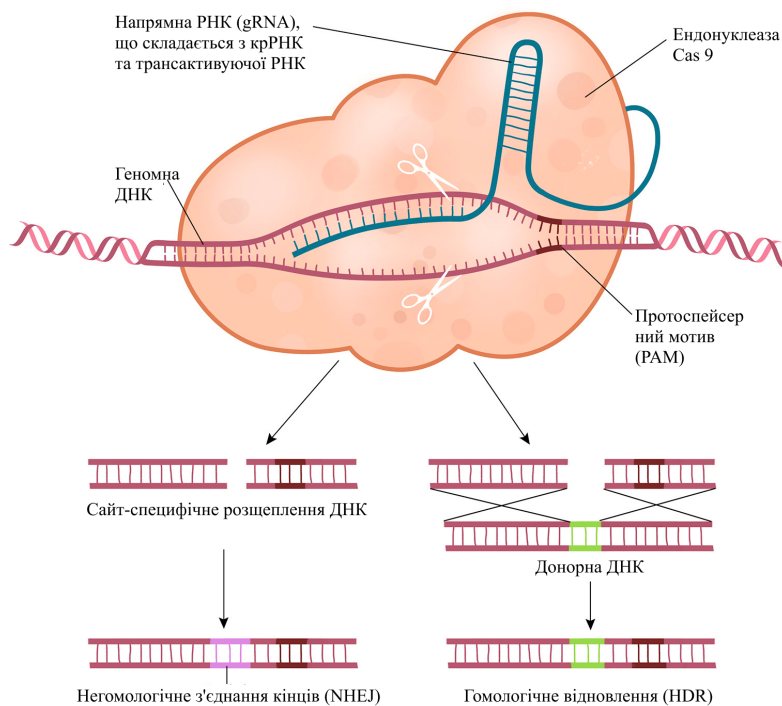


Рисунок 1.3.1.1. — Схематичне зображення механізму редагування геному за допомогою CRISPR/Cas9 [50]

### 1.3.2 Технологія ТКІТ

Технологія цільового нокіну за допомогою двох напрямних послідовностей (ТКІТ, Targeted Knock-In with Two guides) ґрунтується на методі гомологічно-незалежної цільової вставки (НІТІ) та використовується для візуалізації ендогенних білків у нейронах [51]. Суть технології ТКІТ полягає у використанні двох напрямних РНК, що розрізають цільову послідовність ДНК поза межами рамки зчитування в межах 5'ДНТ та інтрона, завдяки чому виключаються indel-мутації кодуючої ділянки. Також введення двох напрямних послідовностей дозволяє більш точно редагувати геном завдяки обмежуванню регіону геному, що підлягає заміні. Для редагування геному цією технологією використовуються два плазмідні вектори. Перший з них експресує білок Cas9 та напрямні послідовності — gRNA. А другий містить донорну послідовність з флуоресцентною міткою, що також обмежена послідовностями gRNA, але у зворотному порядку. Після вирізання фрагмента цільової ДНК на його місце має

вбудуватися донорна ДНК, цей процес відбувається випадковим чином під час негомологічного з'єднання кінців. Існує два можливі варіанти вставки донорної послідовності: пряма (правильна) та зворотна (неправильна). Якщо донорна послідовність вбудувалася у зворотній орієнтації та при цьому не відбулося indel-мутацій, напрямні послідовності залишаються неушкодженими. У такому випадку відбудеться повторне розрізання послідовності білком Cas9, причому такий цикл буде продовжуватися до моменту правильної вставки або ж поки indel-мутації не пошкодять напрямні послідовності.

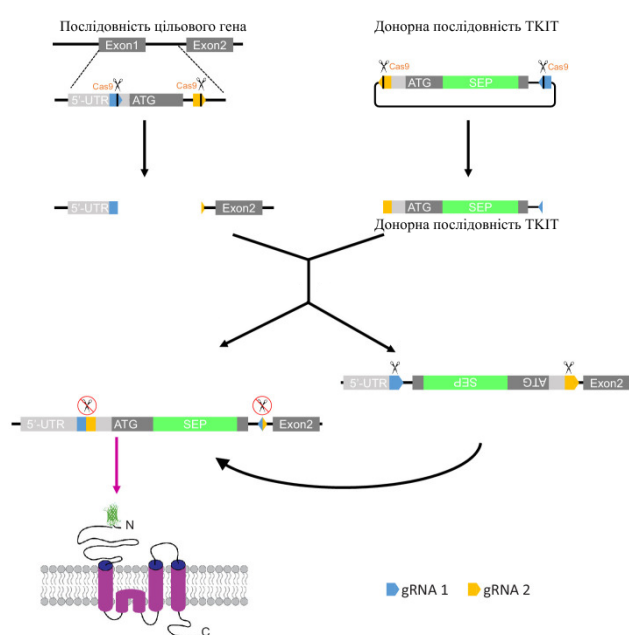


Рисунок 1.3.2.1 — Схематичне зображення механізму редагування геному за допомогою методу ТКІТ [51]

### 1.3.3 Технологія ORANGE

Технологія ORANGE (Open Resource for the Application of Neuronal Genome Editing, відкритий ресурс для редагування геному нейронів) також ґрунтується на NHEJ-опосередкованому методі гомологічно-незалежної цільової вставки (HITI) [52]. Основна відмінність від попередньої технології ТКІТ — це введення у цільові клітини лише одного плазмідного вектора, який містить усі необхідні

елементи для редагування: 20-ти нуклеотидну напрямну послідовність gRNA, білок Cas9 та донорну послідовність з флуоресцентною міткою. Відповідно, після введення вектора у клітини експресуються gRNA та білок Cas9. Останній розрізає цільову ділянку геному та одночасно з цим вирізає донорну послідовність з флуоресцентною міткою з плазміди. Вставка донорної послідовності відбувається шляхом негомологічного з'єднання кінців. У цій технології також можливі два можливі варіанти вставки донорної послідовності: пряма та зворотня. Як і у випадку ТКІТ, при неправильній вставці відбувається повторне розрізання до моменту правильної вставки. Ця технологія значно простіша у виконанні, але має суттєвий недолік — вона не убезпечує від indel-мутацій.

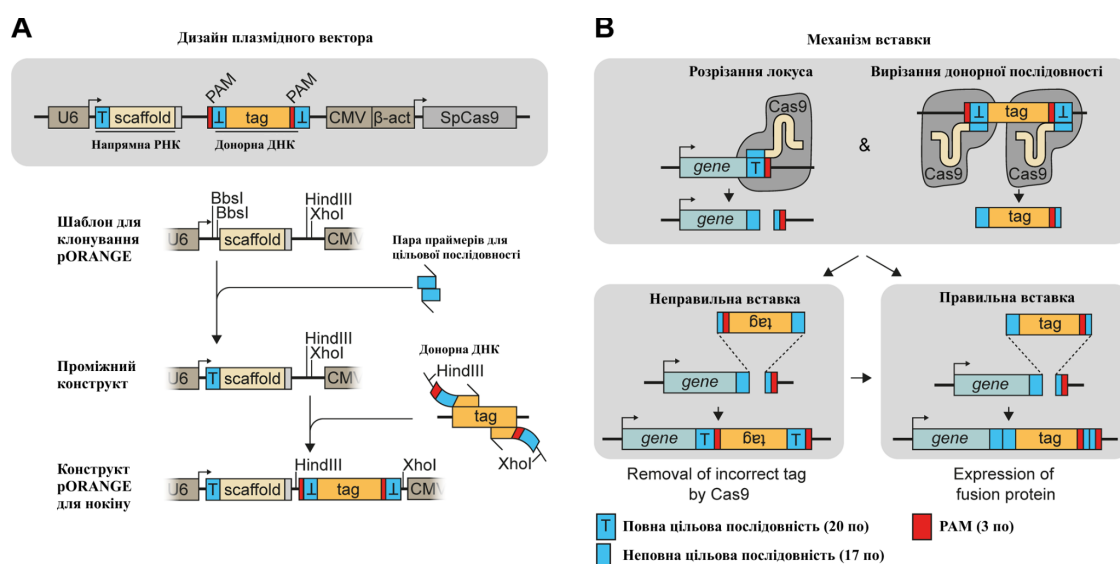


Рис. 1.3.3.1 Схематичне зображення механізму редагування геному за допомогою методу ORANGE [52]: А — дизайн плазмідного вектора для клонування; В — механізм вставки.

#### 1.4 Методи молекулярного клонування

Молекулярне клонування — це створення рекомбінантних ДНК, тобто послідовностей ДНК, що утворюються шляхом з'єднання двох або більше нуклеотидних послідовностей. Цей метод з'явився наприкінці 20 століття та

спричинив значний прогрес у молекулярній біології [53]. Молекулярне клонування передбачає виділення певної послідовності ДНК або її фрагменту та введення у плазмідний вектор для подальшого розмноження. Традиційно клонування складається з таких етапів:

1. Виділення цільових фрагментів ДНК за допомогою рестрикції або полімеразної ланцюгової реакції;
2. Лігування виділених фрагментів у плазмідний вектор;
3. Трансформація компетентних клітин рекомбінантними плазмідними векторами;
4. Валідація та відбір клонів для подальших досліджень за допомогою ПЛР, рестрикції або ж секвенування.

Залежно від вибраного методу клонування дані етапи дещо змінюються, але всі вони мають схожий принцип. Також залежно від методу у вектори можна вставити від одного до десяти фрагментів ДНК.

#### 1.4.1 SLIC

Клонування, незалежне від послідовності та лігування (SLIC, Sequence and Ligation Independent Cloning) ґрунтується на проведенні гомологічної рекомбінації *in vitro* [54]. За цим методом векторні плазмідні з дволанцюговими розривами інкубуються з Т4 ДНК полімеразою, яка за відсутності dNTP проявляє ендонуклеазну активність та генерує “липкі кінці”. Цей процес імітує гомологічну рекомбінацію. Для наступного етапу важливо зауважити, що в *E. coli* гомологічна рекомбінація може відбуватися як за присутності рекомбінази А (RecA), так і за її відсутності [55]. Відпалювання проводять з RecA, якщо концентрація ДНК низька, але якщо концентрація перевищує 100 нг/мкл, то RecA не додається. Після відпалювання проводиться трансфекція компетентних клітин проміжними продуктами рекомбінації, створеними *in vitro*, для відновлення та, відповідно, отримання бажаного конструкта. Переваги цього методу — можливість одночасно робити до п’яти вставок, а також працювати з гомологією від 20 до 60 пар нуклеотидів.

### 1.4.2 Метод клонування Гібсона

Метод клонування Гібсона також ґрунтується на використанні гомологічної рекомбінації. Цей метод дозволяє швидко та ефективно збирати складні та великі конструкти та найкраще працює з фрагментами понад 200 пар нуклеотидів. У реакції використовуються одразу три ензими: T5 екзонуклеаза, Phusion ДНКполімераза та Taq ДНК-лігаза. Спочатку екзонуклеаза розрізає послідовність для утворення одноланцюгових кінців, потім вони відновлюються Phusion ДНК-полімеразою та лігуються Taq ДНК-лігазою [56].

### 1.4.3 Gateway

Метод клонування Gateway ґрунтується на сайт-специфічній рекомбінації. Рекомбінація відбувається у два етапи та потребує використання двох ферментних сумішей — BP clonase та LR clonase [57]. В ході реакції BP за допомогою суміші ферментів BP Clonase відбувається рекомбінація сайтів attB і attP між фагом  $\lambda$  та геномом *E. coli*, внаслідок чого касета Gateway замінюється на цільову ДНК, що оточена сайтами attL або attR. Побічний продукт реакції — ген ccdB, що вирізався з донорського вектора. Під час цієї реакції утворюється початковий клон для наступного етапу. В ході реакції LR за допомогою ферментів LR clonase відбувається рекомбінація між сайтами attL початкового клону та сайтами attR вектора-мішені. В результаті утворюється експресійний клон з ДНК інтересу, фланкований сайтами attB. Як і в попередній реакції, фрагмент ДНК з геном ccdB вирізається з вектора-мішені.

Перевагами цього методу є ефективність, надійність та швидкість створення конструктів. Проте є й певні недоліки, наприклад, висока вартість наборів та складність переходу в майбутньому на інші системи клонування.

#### 1.4.4 Golden Gate

Метод клонування Golden Gate полягає у використанні рестриктаз типу IIS, які розрізають послідовність за межами сайту розпізнавання [58]. За допомогою цього методу можна робити вставку одразу кількох фрагментів. Розщеплення послідовності ДНК рестриктазою *BsaI* призводить до утворення чотирьохнуклеотидних одноланцюгових “липких кінців”, що використовуватимуться для лігування фрагментів між собою [59]. Після цього відбувається лігування плазмідного вектора та фрагментів ДНК для утворення зібраного конструкта.

Перевагою цього методу є можливість використовувати для приєднання фрагментів лише невеликі послідовності з чотирьох нуклеотидів. Також перевагою є те, що сайт розпізнавання рестриктаз не залежить від послідовності гена інтересу. Ще одна важлива перевага — відсутність проблем з несумісністю буферів чи температур, адже для обох ділянок розщеплення використовується лише одна рестриктаза.

## Розділ 2. Методи, що використовувалися в роботі

### 2.1 Фосфорилування та відпалювання олігонуклеотидів

Фосфорилування та відпалювання олігонуклеотидів проводили шляхом їхнього інкубування з полінуклеотидкіназою T4 (NEB M0201S, США) та лігазним буфером T4 (NEB B0201S, США) протягом 30 хвилин за температури 37°C. Потім олігонуклеотиди нагрівали за допомогою термоциклера до температури 95°C протягом 5 хвилин. Після цього зразки охолоджували до 25°C з кроком 5°C/хвилину. Загальний час охолодження становив 14 хвилин.

Таблиця 2.1.1 — Склад реакційної суміші для відпалювання олігонуклеотидів

Реактиви	Об'єм
10x T4 DNA лігазний буфер (NEB B0202S, США)	1 мкл
T4 PНК (NEB M0201S, США)	1 мкл
Прямий праймер	1 мкл
Зворотний праймер	1 мкл
Вода, очищена від нуклеаз	6 мкл
Загальний об'єм реакції — 10 мкл	

### 2.2 Лігування фосфорильованих нуклеотидів

Фосфорильовані олігонуклеотиди розводили водою без нуклеаз у співвідношенні 1:75. Як основу для роботи використовували плазмиду pX333 (addgene 64073). Лігування олігонуклеотидів у плазмиду pX333, попередньо

порізану BbsI (NEB R3539S, США), проводили шляхом їхнього інкубування з ДНК-лігазою Quick (NEB M2200S, США) та лігазним буфером Quick (NEB B2200S, США) протягом 14 хвилин за температури 25°C. Потім продукти лігування переміщувалися на лід та інкубувалися протягом 5 хвилин.

Таблиця 2.2.1 — Склад реакційної суміші для лігування фосфорильованих олігонуклеотидів у плазміді

Реактиви	Об'єм
2x Quick лігазний буфер (NEB B2200S, США)	5 мкл
Quick лігаза (NEB M2200S, США)	0,5 мкл
Фосфорильований нуклеотид, розведений з водою 1:75	1 мкл
Плазмідна порізана BbsI	3 мкл/20ng
Вода, очищена від нуклеаз	0,5 мкл
Загальний об'єм реакції	10 мкл

### 2.3 Підготовка чашок Петрі для посіву

Свіжоприготоване поживне середовище LB agar автоклавували при температурі 121 °C протягом 20 хвилин. Коли поживне середовище охолоджувалося, додавали 150 мкл антибіотика ампіциліну (Arterium, Україна) у концентрації 100 мкг/мл. Після цього середовище розливали по чашках Петрі, що були попередньо автоклавовані при температурі 132 °C протягом 20 хвилин,

приблизно по 20 — 25 мл середовища на чашку. Далі чашки залишали на рівній горизонтальній поверхні при кімнатній температурі до повного застигання агару (приблизно на 30 хвилин). Через годину чашки Петрі герметизували за допомогою плівки Parafilm та переміщували на зберігання у холодильник з температурою 4 °С.

#### 2.4 Приготування компетентних клітин

Для приготування компетентних клітин засіювали 1,5 мл поживного середовища LB broth з *E. coli* штаму DH10B або XL, інкубували при 200 об/хв за температури 37°C протягом 12 — 15 годин. 0,1 мл нічної культури розводили у співвідношенні 1:10, додаючи у 900 мл середовища LB, інкубували при 200 об/хв за температури 37°C протягом 100-120 хвилин. Потім культуру клітин розводили у співвідношенні 1:1, додаючи 900 мл холодного розчину 2x TSS та обережно перемішували [60]. Культуру аліквотували по 200 мкл у кріопробірки, заморожували швидким зануренням в азот та зберігали у рідкому азоті до використання.

#### 2.5 Трансформація компетентних клітин продуктами лігування

Аліквоту 200  $\mu$ l компетентних клітин розморожували у холодильнику при температурі 4°C. Клітини розливали у дві пробірки на 1,5 мл, по 50 мкл у кожену. У пробірки вносили по 10 мкл продуктів лігування та інкубували протягом 40 хвилин у холодильнику при температурі 4°C. Після інкубації у компетентні клітини вносили 10 мкл 1М глюкози та 450 мкл поживного середовища LB, які попередньо підігрівалися до температури 37°C. Потім отриману суспензію інкубували протягом 40 хвилин при температурі 37°C. Трансформантів сіяли на чашки Петрі з антибіотиком ампіцеліном (Arterium, Україна) за допомогою бактеріального шпателя наступним чином: на одну сторону чашки наносили 20—100 мкл суспензії, а на іншу — 40—200 мкл суспензії. Чашки Петрі інкубували всю ніч при температурі 37°C.

## 2.6 Виділення плазмід

1 – 5 мл бактеріальної культури осаджувалися за допомогою центрифугування протягом 30 секунд. В експерименті використовувалися реагенти з набору Monarch Plasmid Miniprep Kit (NEB T1010L, США). В осаджені клітини додавали 200 мкл розчину Plasmid Resuspension Buffer та перемішували за допомогою вортексу до повного ресуспендування. Лізис клітин проводили шляхом додавання 200 мкл розчину Plasmid Lysis Buffer, пробірки обережно перевертали кілька разів для змішування розчинів та інкубували протягом 1 хвилини. Нейтралізацію проводили шляхом додавання 400 мкл розчину Plasmid Neutralization Buffer, пробірки обережно перевертали кілька разів для змішування розчинів та інкубували протягом 2 хвилин. Лізат осаджували за допомогою центрифугування протягом 5 хвилин при 14500 RPM. Супернатант переносили у пробірки з колонками та центрифугували протягом 1 хвилини, залишки виливали. Колонки промивали шляхом додавання 200 мкл розчину Plasmid Wash Buffer 1, який очищує зразок від РНК, протеїнів та ендотоксинів, та центрифугували протягом 1 хвилини. Потім додавали 400 мкл розчину Plasmid Wash Buffer 2 та центрифугували 1 хвилину. Колонки переносили у чисті пробірки на 1,5 мкл та проводили елюцію шляхом додавання 30 мкл розчину DNA Elution Buffer на колонку, інкубували 7 хвилин та центрифугували протягом 2 хвилин. Концентрацію плазмідної ДНК вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop.

## 2.7 Перевірка вставки gRNA у векторну плазмиду за допомогою ПЛР та гель-електрофорез отриманих ампліконів

Наявність вставки gRNA у векторну плазмиду перевіряли шляхом проведення полімеразної ланцюгової реакції. Для ПЛР використовували полімеразу DreamTaq, зелений буфер 10x DreamTaq та 10 мМ dNTP. Як прямий праймер використовувався праймер U6F (gagggcctatttcccatgattcc), а зворотного — зворотна послідовність gRNA (для Clta — ggatccaactcagccatga; для 20Rev —

cttgctattctgcttgccca). Фінальна концентрація праймерів — 0,5 мкМ. ПЛР проводили у термоциклері з наступними температурними режимами: початкова денатурація проводилася при температурі 95°C протягом 3 хвилин; денатурація при температурі 95°C протягом 30 секунд, відпал при температурі 58°C протягом 30 секунд та елонгація при температурі 72°C протягом 15 секунд повторювалися 35 циклів; фінальна елонгація проводилася при температурі 72°C протягом 5 хвилин.

Таблиця 2.7.1 — Склад реакційної суміші для ПЛР

Реактиви	Об'єм
Зелений буфер 10x DreamTaq (TF B71, США)	2
Полімераза DreamTaq (TF EP0705, США)	0,5 мкл
dNTP (NEB N0447S, США)	0,5
Векторна плазмідна зі вставкою	0,25 мкл
Прямий праймер	1
Зворотний праймер	1
Вода	15
Загальний об'єм реакції	20,25 мкл

Електрофоретичне розділення проводили у 0,8% агарозному гелі, який готували шляхом змішування 0,4 г агарозу та 50 мл розчину 0,5% ТАЕ, а також додавали 1,5 мкл бромистого етидію. До зразків додавали барвник Thermo Scientific 6x TriNrack DNA Loading Dye (TF R1161, США), в якості маркера використовували 1 кб Thermo Scientific Gene Ruler (TF SM0311, США).

Електрофорез проводили за напруги 80 мА протягом 50 хвилин. В якості буферу використовували розчин 0,5% ТАЕ.

### 2.2.8 Клонування флуоресцентного білка LSSmOrange за допомогою ПЛР та гель-електрофорез ампліконів

Клонування флуоресцентного білка проводили за допомогою полімеразної ланцюгової реакції з праймерами для відповідних gRNA. Джерелом донорної послідовності з флуоресцентним білком LSSmOrange став вектор pLSSmOrange-N1 (Addgene 37130). Реакцію проводили у термоциклері з наступним температурним режимом: початкова денатурація проводилася при температурі 98°C протягом 30 секунд; денатурація при температурі 98°C протягом 10 секунд, відпал при температурі 64°C протягом 25 секунд та елонгація при температурі 72°C протягом 30 секунд повторювалися 35 циклів; фінальна елонгація проводилася при температурі 72°C протягом 5 хвилин.

Таблиця 2.8.1 — Склад реакційної суміші для клонування флуоресцентних білків LSSmOrange-C1ta та LSSmOrange-20Rev

Реактиви	Об'єм
Вода	11 мкл
Буфер 5x NEB (NEB B0518S, США)	5 мкл
10mM dNTP (NEB N0447S, США)	1,4 мкл
Шаблон pLSSmOrange-N1	2 мкл
Прямий праймер	1,25 мкл
Зворотний праймер	1,25 мкл
Підсилювач NEB 5x Q5 High GC	5 мкл

Полімераза HF Q5 (NEB M0491S, США)	0,5 мкл
Загальний об'єм реакції	27,4 мкл

Електрофоретичне розділення продуктів ПЛР плазміді із LSSmOrange з праймерами, що містили послідовності відповідних gRNA та хвостиків для SLIC, проводили у 1% агарозному гелі, який готували шляхом змішування 0,75 г агарозу та 75 мл розчину 0,5% TAE, а також додавали 2,3 мкл бромистого етидію. До зразків додавали барвник Thermo Scientific 6x TriNrack DNA Loading Dye (TF R1161, США), як маркер використовували 1 кб Thermo Scientific Gene Ruler (TF SM0311, США). Електрофорез проводили за напруги 80 мА протягом 50 хвилин. В якості буферу використовували розчин 0,5% TAE.

#### 2.2.9 Виділення та очищення продуктів ПЛР з гелю

Фрагменти гелю вирізали з гелю за допомогою скальпеля під візуальним контролем з увімкненим ультрафіолетовим світлом. Вирізані фрагменти поміщали у 1,5 мл пробірки. В експерименті використовувалися реагенти з набору Monarch DNA Gel Extraction Kit (NEB T1020L, США). До пробірок вносили 500 мкл буферу Monarch Gel Dissolving Buffer та інкубували при температурі 50°C протягом 5 хвилин. Весь об'єм переносили в пробірки з колонками та центрифугували на 14500 RPM протягом 1 хвилини. До колонок додавали 20 мкл розчину DNA Wash Buffer та центрифугували протягом 1 хвилини. Промивку повторювали двічі. Елюцію робили шляхом нанесення 5 мкл DNA Elution Buffer на мембрану колонки, інкубували 1 хвилину та центрифугували 1 хвилину. Концентрацію виділених продуктів вимірювали за допомогою спектрофотометра NanoDrop.

#### 2.2.10 Рестрикція отриманих клонів за допомогою рестриктаз KpnI та XbaI

Рестрикцію проводили шляхом інкубування отриманих клонів з рестриктазами KpnI (TF 00030908, США) та XbaI (TF 00032843, США). Інкубація тривала 40 хвилини за температури 37°C. Потім рестриктази інактивували шляхом інкубування при температурі 80°C протягом 10 хвилин.

Таблиця 2.10.1 — Реакційна суміш для рестрикції проміжних плазмідних векторів за допомогою рестриктаз KpnI та XbaI

Реагент	Об'єм
Вода, очищена від нуклеаз	14 мкл
10x FD Буфер (TF 00021834, США)	2 мкл
Плазмідний вектор	3,7 мкл
KpnI (TF 00030908, США)	0,35 мкл
XbaI (TF 00032843, США)	0,35 мкл
Загальний об'єм — 20 мкл	

### 2.2.11 SLIC (Sequence and Ligation Independent Cloning)

Клонування методом SLIC проводилося шляхом інкубування плазмід рХ333 зі вставкою gRNA, порізаних рестриктазами KpnI (TF 00030908, США) та XbaI (TF 00032843, США), з синтезованими раніше донорними послідовностями з флуоресцентним білком LSSmOrange та T4 ДНК полімеразою (NEB M0203S, США). Інкубували реакційну суміш за кімнатної температури протягом 5 хвилин. Після чого переносили на лід також на 5 хвилин.

Таблиця 2.11.1 — Реакційна суміш для клонування

Реагент	Об'єм
Вода, очищена від нуклеаз	3,6 мкл
Буфер G (TF 00019731, США)	1 мкл
Плазмідний вектор, порізаний KpnI та XbaI	1 мкл
LSSmOrange-gRNA	4 мкл
T4 ДНК полімераза (NEB M0203S, США)	0,35 мкл
Загальний об'єм — 10 мкл	

## Розділ 3. Практична частина

### 3.1 Пошук інструментів для створення клонів на основі CRISPR/Cas9

Як згадувалося раніше, для вивчення функцій білка гіпокальцину під час проведення біофізичних досліджень необхідно візуалізувати ендogenous білок. Одним з методів, який дозволяє досягти цієї мети, є введення флуоресцентної генетичної мітки до білка інтересу шляхом створення плазмідних векторів з нокіном відповідного гену. Для ефективного мічення у цьому випадку використовують технологію редагування геному CRISPR/Cas9 [61, 62]. Існує два класичні методи нокіну на основі цієї технології, які відрізняються механізмами рекомбінації при відновленні дволанцюгових розривів після розрізання білком Cas9. Перший метод базується на гомологічно-залежній рекомбінації (HDR) для вставки донорної ДНК у геномний локус [26]. Однак цей метод не ефективний для первинної культури нейронів, оскільки нейрони — постмітотичні клітини, а гомологічно-залежна рекомбінація відбувається під час S та G2 фаз клітинного циклу [63]. Інший метод базується на негомологічному з'єднанні кінців (NHEJ). Цей метод виявляє більшу ефективність у нейронах, оскільки відбувається протягом усього клітинного циклу, але він може спричиняти indel-мутації та порушувати роботу цільових генів [64]. Отже, використання класичних методів на основі CRISPR/Cas9 для введення флуоресцентної генетичної мітки до гіпокальцину буде неефективним. Тому першим методом для нашого дослідження було обрано метод спрямованої вставки з використанням двох напрямних послідовностей стратегію TKIT (Targeted Knock-In with Two guides) [51]. Цей метод є резистентним до indel-мутацій та забезпечує точне редагування геному шляхом введення двох напрямних послідовностей (gRNA), які обмежують регіон геному, що підлягає заміні. Суть методу полягає в тому, щоби ввести у цільові клітини (у нашому випадку — нейрони) два плазмідні вектори: перший з них буде експресувати білок Cas9 та дві послідовності gRNA, а другий міститиме донорну послідовність з флуоресцентною міткою для вставки у геном,

що також обмежена gRNA, які розташовані у зворотному порядку. Детально цей метод описаний у розділі 1.3.2. Його недолік — складність процесу вставки у цільові клітини через використання кількох векторів, що зменшує ймовірність правильної вставки. Тому для наших досліджень ми зупинилися на іншому методі — ORANGE (Open Resource for the Application of Neuronal Genome Editing). ORANGE був розроблений на основі методу гомологічно-незалежної цільової інтеграції (HITI) для мічення ендогенних білків у постмітотичних нейронах [52]. Його суть полягає у тому, що у цільові клітини вводять лише один плазмідний вектор, який містить всі необхідні елементи для редагування геному: пряму послідовність gRNA, що націлена на геномний локус, донорну послідовність з флуоресцентною міткою та білок Cas9. Детально цей метод описаний у розділі 1.3.3. Цей метод значно збільшує ймовірність правильної вставки, оскільки у цільові клітини вводиться лише один плазмідний вектор, до того ж він менший за розміром, що також спрощує вставку.

Отже, після аналізу наявних методів редагування геному, які можуть бути використані для вставки флуоресцентних міток у первинну культуру клітин гіпокампа, було обрано метод ORANGE.

### 3.2 Дизайн плазмідних векторів для нокіну гена гіпокальцину у щурів

Після вибору методу для створення плазмідних векторів необхідно було визначитися з усіма елементами, потрібними для редагування геному. Першим кроком було детально проаналізовано структуру гена HPCA щура (*R. norvegicus*), який кодує білок гіпокальцин. У результаті аналізу було вирішено локалізувати вставку по N-кінцю послідовності.

Наступний етап — вибір послідовностей gRNA, які визначатимуть місце розщеплення ДНК білком Cas9. gRNA — це послідовності, які складаються з 20 нуклеотидних пар, за якими знаходиться протоспейсерний суміжний мотив (PAM). Для пошуку потенційних gRNA було використано програму CRISPOR.

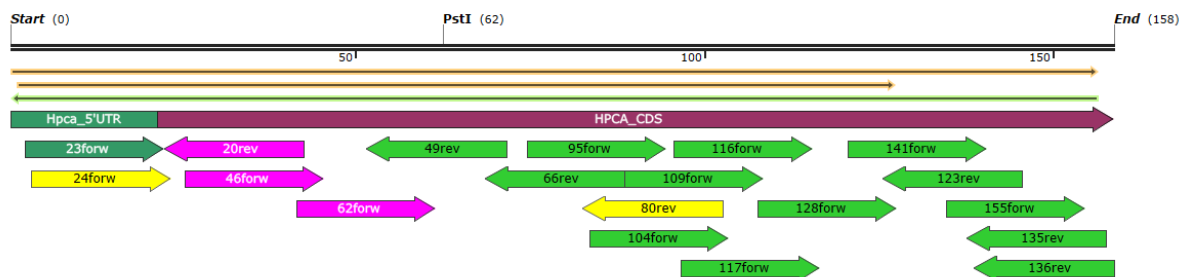


Рисунок 3.2.1 — N-кінець гена HPCA з потенційними gRNA для редагування геному.

Напрямні послідовності було вибрано з урахуванням специфічності за шкалою MIT-Specificity score та Doench2016 [65]. Проте наразі немає даних, які демонструють критичний вплив цього показника на ефективність нокину.

Таблиця 3.2.1 — Інформація про вибрані gRNA

gRNA	Нуклеотидна послідовність та PAM	MIT-Specificity score	Doench2016
20rev	CTTGCTATTCTGCTTGCCCA <u>TG G</u>	64	45
46forw	GCAAGCAGAATAGCAAGCT <u>GCGG</u>	62	67
62forw	GCTGCGGCCAGAGATGCTG <u>CAGG</u>	61	49

Примітка: підкреслені нуклеотиди — протоспейсерний суміжний мотив (PAM)

Відповідно до цих напрямних послідовностей було створено дизайн комплементарних олігонуклеотидів (Додаток 1). Джерелом донорної послідовності з флуоресцентним білком LSSmOrange став вектор pLSSmOrange-N1 (Addgene 37130) [35].

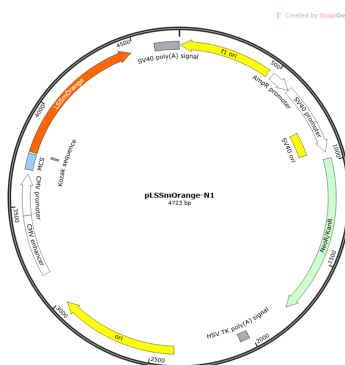


Рисунок 3.2.2 — Генетична карта вектора pLSSmOrange-N1, з якого синтезувався флуоресцентний білок, SnapGene.

Для синтезу донорних послідовностей для кожної gRNA також було створено дизайн праймерів (Додаток 2). Між сайтами-мішенями та послідовністю мітки було введено додаткові пари нуклеотидів для утворення лінкерів. Для створення плазмідних векторів було вибрано плазмиду рХ333 (Addgene 64073) [66]. Ця плазміда несе два підготовлені сайти вставки gRNA під незалежними промоторами U6 та кодує послідовність білка Cas9.

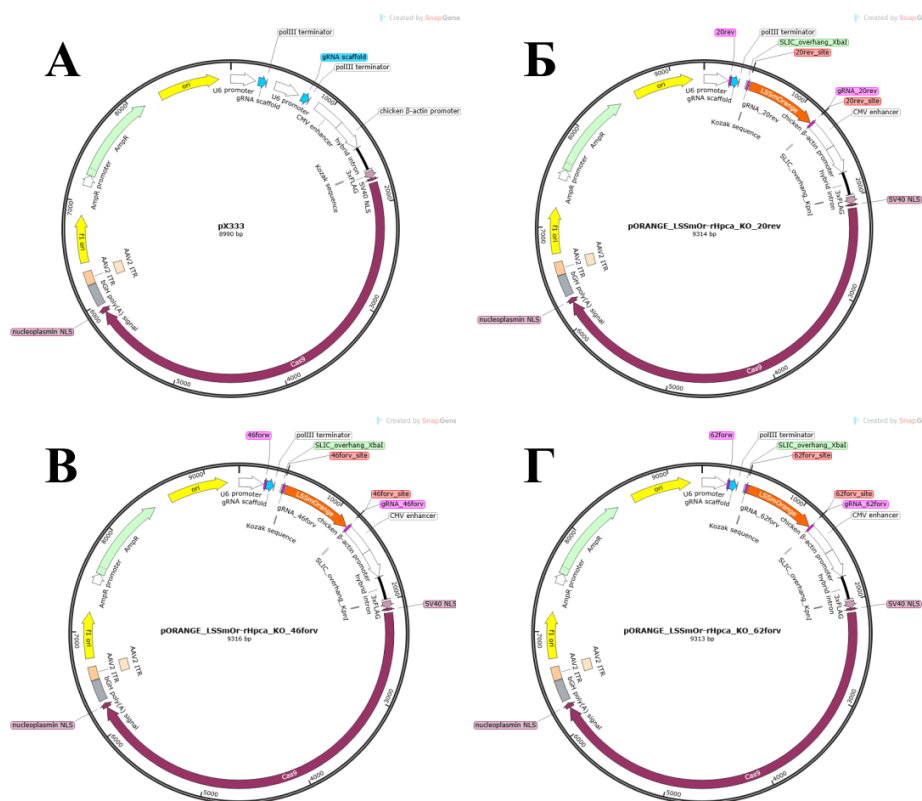


Рис. 3.2.3 А — генетична карта пустої плазмиди рХ333, 8990 пар нуклеотидів; Б — очікувана генетична карта плазмідного вектора рOrange\_LSSmOr-rHpsa\_KO\_20Rev, 9314 пар нуклеотидів; В — очікувана генетична карта плазмідного вектора рOrange\_LSSmOr-rHpsa\_KO\_46Forw, 9316 пар нуклеотидів; Г — очікувана генетична карта плазмідного вектора рOrange\_LSSmOr-rHpsa\_KO\_62Forw, 9314 пар нуклеотидів.

### 3.3 Дизайн контрольного вектора

Цей плазмідний вектор був створений в якості контролю за дизайном, наведеним в оригінальній статті [52]. Вектор розроблявся для внесення флуоресцентної мітки в ген *Clta*, який кодує білок клатрин А (clathrin light chain A). Він має 7 екзонів, розмір яких складає 747 нуклеотидних пар.

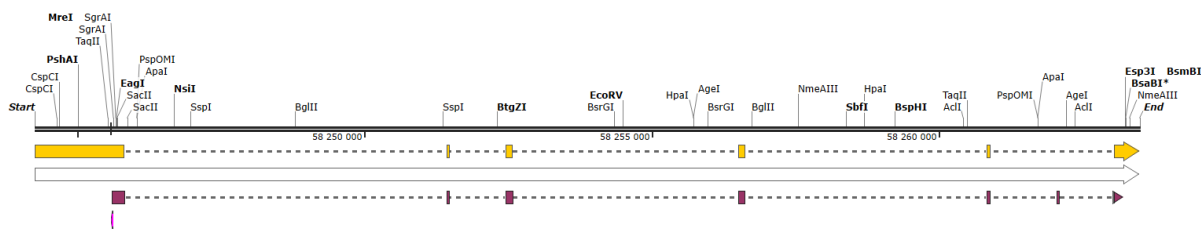


Рисунок 3.3.1 — Структура гена Clta: жовта стрілка — мРНК; біла стрілка — основа ДНК (backbone); фіолетова стрілка — кодуєча послідовність.

Послідовність gRNA була взята зі статті, автори вибирали її з урахуванням специфічності за шкалою MIT-Specificity score [65].

Таблиця 3.3.1 — Інформація про вибрану gRNA

gRNA	Нуклеотидна послідовність та PAM	MIT-Specificity score
Clta	GGATCCAACTCAGCCATGAC <u>G</u> <u>G</u>	73

Відповідно до послідовності gRNA було підбрано комплементарні олігонуклеотиди (Додаток 3). Флуоресцентним білком для мітки було вибрано LSSmOrange, для його синтезу обрали вектор pLSSmOrange-N1 (Addgene 37130) [35], як і для інших плазмідних векторів. Для синтезу донорної послідовності також було створено дизайн праймерів (Додаток4). У праймери для синтезу донорної послідовності між сайтами-мішенями та послідовністю мітки було введено додаткові лінкерні послідовності, які склалися зі щонайменше 3 амінокислот, а також додаткові пари основ, що складаються щонайменше з трьох амінокислот, та додаткові пари основ для того, щоби після вставки в геном донорна послідовність знаходилася в рамці зчитування. Для створення плазмідних векторів було вибрано плазмиду pX333 (Addgene 64073) [66], як і для попередніх векторів.

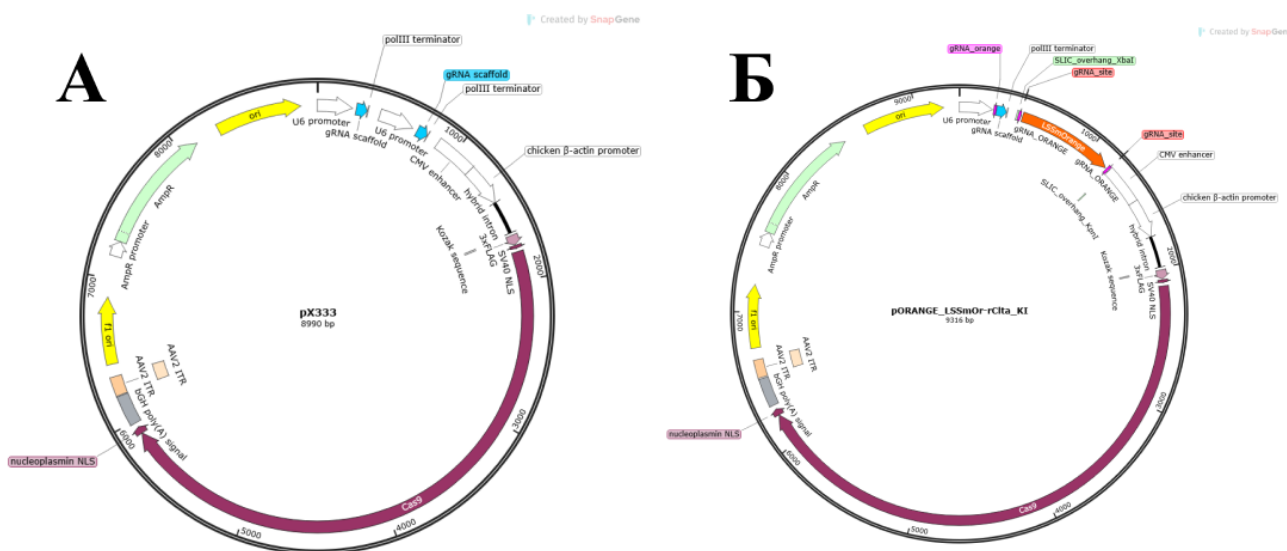


Рисунок 3.2.2 А — генетична карта пустої плазмиди рХ333, 8990 пар нуклеотидів; Б — очікувана генетична карта плазмідного вектора рOrange\_LSSmOr-CIta, 9316 пар нуклеотидів.

### 3.4 Збірка плазмідних векторів

#### 3.4.1 Збірка векторів

Як згадувалося раніше, збірка плазмідних векторів за допомогою інструментарію ORANGE відбувається у два етапи. Перший етап — вставка таргетної олігонуклеотидної послідовності — gRNA, яка спрямує білок Cas 9 до відповідного геномного локусу, у плазмідну ДНК. Цей крок було виконано паралельно для двох майбутніх векторів. Було проведено фосфорилування й обпалювання одноланцюгових олігонуклеотидів та реакцію лігування, внаслідок чого в плазміді рХ333, попередньо порізану рестриктазою VbsI, було вставлено напрямні послідовності. Далі було проведено трансформацію компетентних клітин отриманими плазмідними векторами. У результаті було отримано якісних трансформантів.

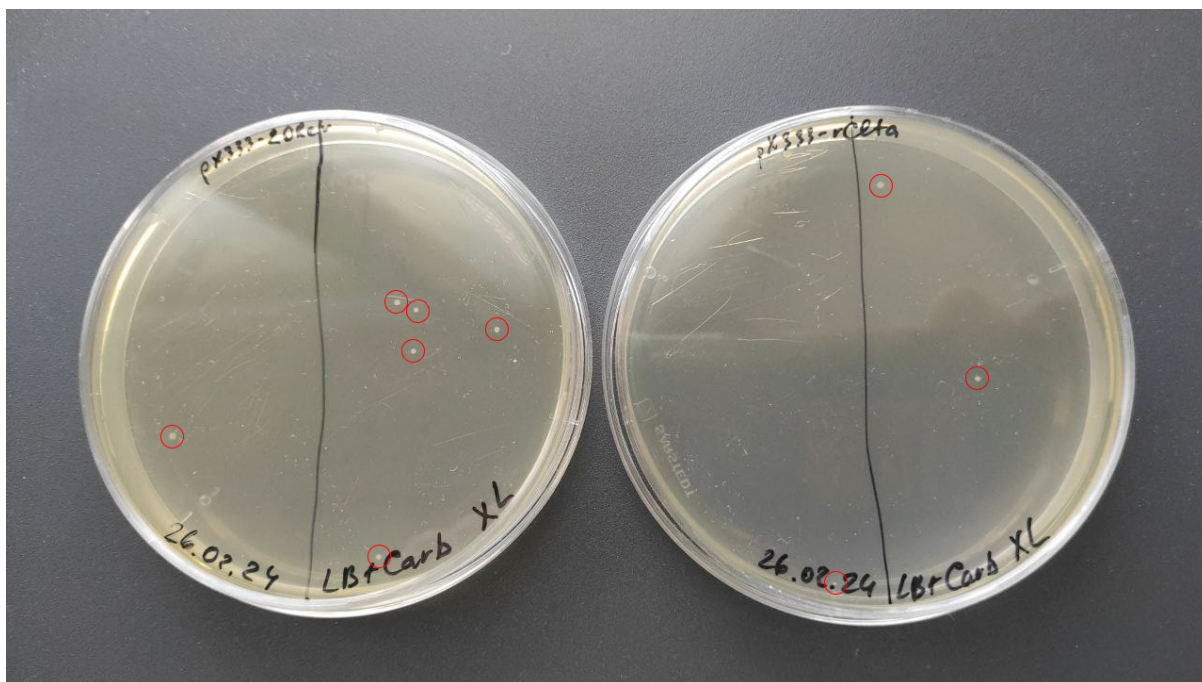


Рис. 3.4.1.1 — Чашки Петрі з вирощеними колоніями бактерій, що містять отримані в попередньому етапі плазмідні ДНК. Ліва чашка — колонії бактерій з плазмідною рХ333-20Rev; права чашка — колонії бактерій з плазмідною рХ333-Clta. Примітка: мала кількість колоній була отримана внаслідок помилкової концентрації таргетних послідовностей на початку збірки.

Для кожного конструкта було одержано по 3 клони, якість плазмідної ДНК була задовільною. Для того, щоби підтвердити або спростувати вставку таргетних послідовностей, було проведено ПЛР. Очікувалося, що продукти реакції матимуть 268 (рХ333-Clta) та 269 (рХ333-20Rev) нуклеотидів, тож на гель-електрофорезі ми мали побачити смужку в районі 250 нуклеотидів у лунках з отриманими плазмідами.

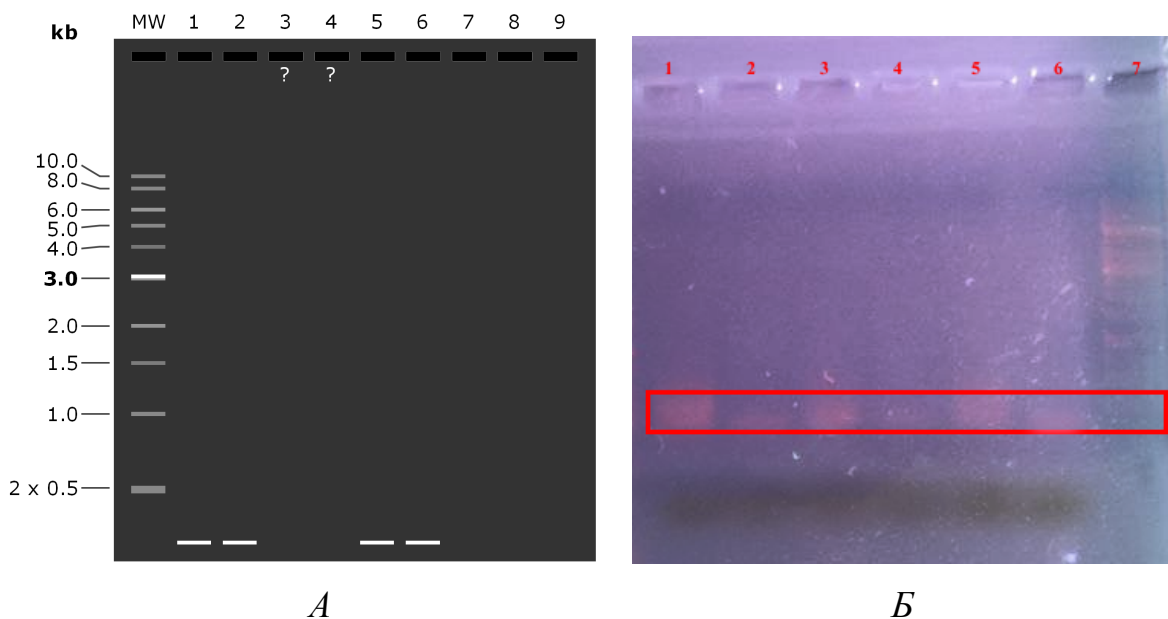
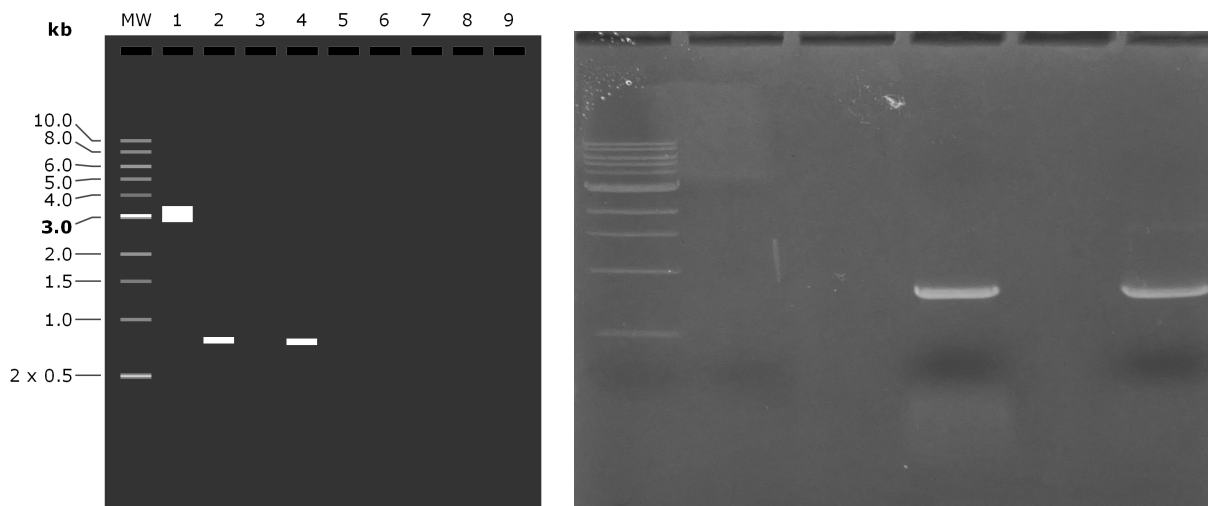


Рис. 3.4.1.2 — А — Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів ПЛР. Б — Електрофореграма, отримана при розділенні продуктів ПЛР. 1 — рХ333-20Rev; 2 — рХ333-Clta; 3 — рХ333 (контроль); 4 — рХ333gRNA1 (контроль з іншого клонування); 5 — рХ333-20Rev; 6 — рХ333-Clta.

На електрофореграмі видно смужку приблизно на 250 нуклеотидах у лунках з отриманими плазмідами, але також ми побачили смужку у контрольному зразку з чистою плазмідною рХ333. У лунці з іншим контрольним зразком смужки не було, як і очікувалося. Тому можлива причина — помилка при внесенні зразків у гель. Оцінивши результати, ми можемо сказати, що вставка таргетних послідовностей у плазмідний вектор пройшла успішно.

Наступний етап збірки — вставка в отримані плазмідні вектори донорних послідовностей, що містять флуоресцентний білок (у нашому випадку це — оранжевий LSSmOrange). Донорні послідовності було згенеровано за допомогою ПЛР реакції з праймерами, що містять лінкерні та таргетні послідовності, а також очищено з гелю в задовільній концентрації.

Також було проведено рестрикцію плазмід рХ333-20Rev та рХ333-Clta рестриктазами XbaI та KpnI. В результаті цього з плазмід вирізається частина послідовності, розміром 444 нуклеотиди. Вставка донорних послідовностей у плазмідні вектори була проведена методом клонування SLIC.

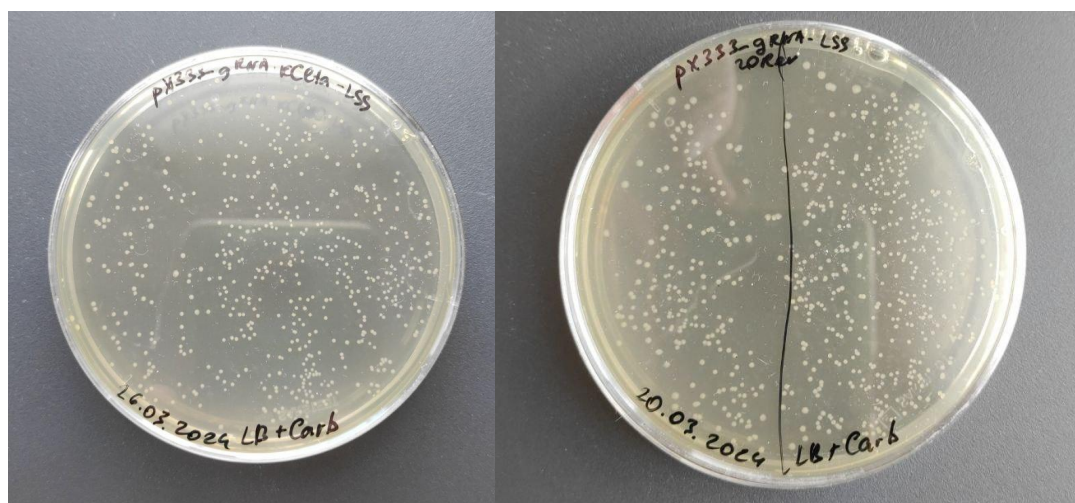


А

Б

Рис. 3.4.1.3 — А — Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів ПЛР: 1 — pLSSmOrange-N1; 2 — LSSmOrange-CltA; 3 — LSSmOrange-20Rev. Б — електрофореграма при розділенні продуктів ПЛР: 1 — pLSSmOrange-N1; 2 — LSSmOrange-CltA; 3 — LSSmOrange-20Rev.

Після трансформації компетентних клітин плазмідними векторами було отримано хороші трансформанти. Результати трансформації показано на Рисунку 3.3.1.4.



А

Б

Рисунок 3.4.1.4 — Чашки Петрі з вирощеними колоніями бактерій, що містять фінальні плазмідні вектори. А — колонії бактерій з плазмідною рX333-LSSmOr-CltA; Б — колонії бактерій з плазмідною рX333-LSSmOr-rHrca-20Rev.

Для конструкції pX333-LSSmOr-Clta було отримано 2 клони, а для конструкції pX333-LSSmOr-rHpsa-20Rev — 3 клони. Якість плазмідних ДНК була задовільною. Для валідації зібраних плазмідних векторів буде проведено два рестрикційні аналізи:

- 1) Рестрикційний аналіз за допомогою рестриктаз BbsI та BsaI;
- 2) Рестрикційний аналіз за допомогою рестриктаз XbaI та KpnI.

В обох варіантах на правильну вставку вказуватимуть продукти, розміром 9314 та 9316 пар нуклеотидів.

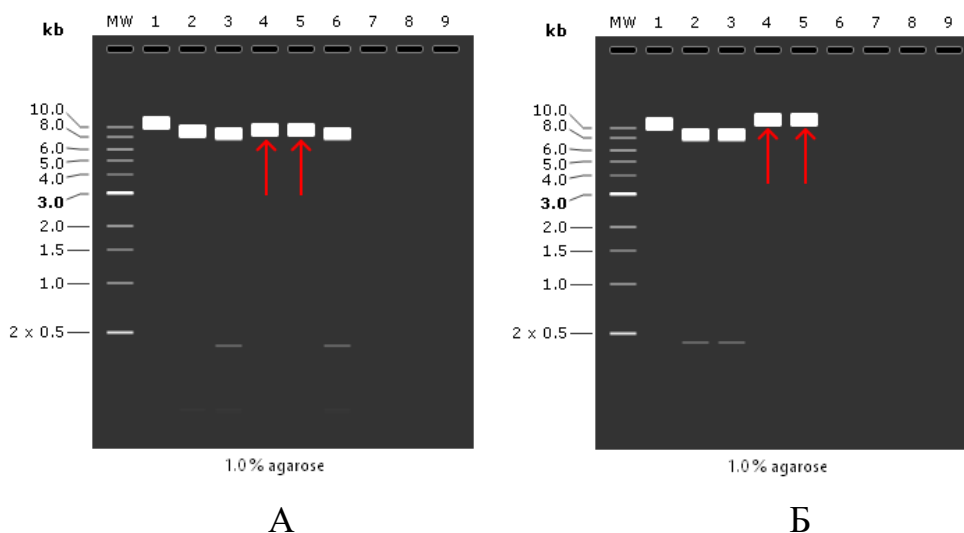


Рис. 3.4.1.5 — А — Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів рестрикції рестриктазами BbsI та BsaI. 1 — pX333; 2 — pX333-Clta, порізана BbsI та BsaI; 3 — pX333-20Rev, порізана BbsI та BsaI; 4 — плазмідний вектор pOrange\_LSSmOr-Clta, порізаний BbsI та BsaI 6 — pX333, порізана BbsI та BsaI.

Б — Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів рестрикції рестриктазами BbsI та BsaI. 1 — pX333, порізана XbaI та KpnI; 2 — pX333-Clta, порізана XbaI та KpnI; 3 — pX333-20Rev, порізана XbaI та KpnI; 4 — плазмідний вектор pOrange\_LSSmOr-rHpsa\_KO\_20Rev, порізаний XbaI та KpnI; 5 — плазмідний вектор pOrange\_LSSmOr-Clta, порізаний XbaI та KpnI.

### 3.4.2 Збірка векторів *in silico*

Було також змодельовано експерименти для збірки та валідації плазмід `pOrange_LSSmOr-rHpsa_KO_46Forw` та `pOrange_LSSmOr-rHpsa_KO_62Forw`. Першим кроком необхідно вставити gRNA у плазмідну ДНК шляхом лігування фосфорильованих та відпалених нуклеотидів. Для того, щоби підтвердити або спростувати вставку gRNA, буде проведено ПЛР з прямим праймером U6 та зворотним праймером — зворотною послідовністю gRNA. Очікується, що за умов успішної вставки ми отримаємо продукти розміром 272 та 269 пар нуклеотидів.

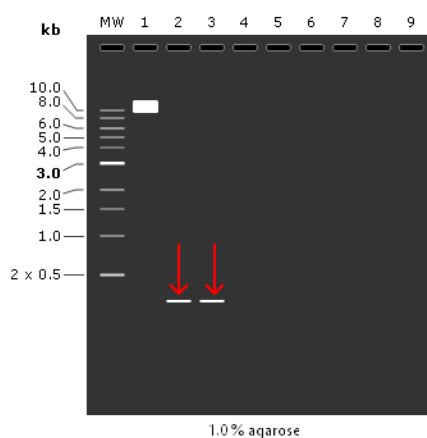


Рис. 3.4.2.1 – Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів ПЛР. 1 — pX333; 2 — pX333-46Forw; 3 — pX333-62Forw.

Наступним кроком буде вставка в отримані плазмідні вектори донорних послідовностей, що містять флуоресцентний білок LSSmOrange. Донорні послідовності LSSmOrange-46Forw та LSSmOrange-62Forw будуть синтезовані за допомогою ПЛР реакції з відповідними праймерами.

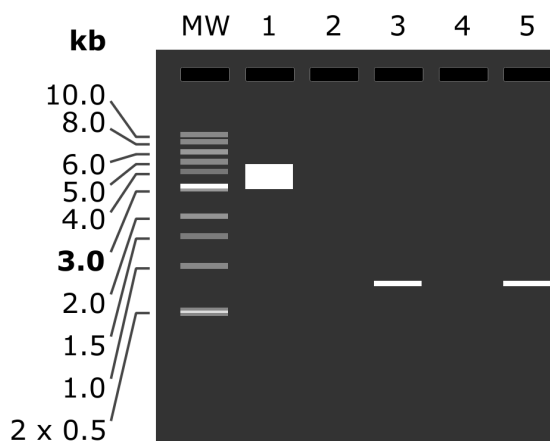


Рис. 3.4.2.2 – Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів ПЛР. 1 — рХ333; 2 — пуста лунка; 3 — LSSmOrange-46Forw; 3 — LSSmOrange-62Forw.

Далі буде проведено рестрикцію плазмід рХ333-46Forw та рХ333-62Forw рестриктазами XbaI та KpnI. Очікується, що в результаті утворяться 3 продукти розмірами 8118, 444 та 430 пар нуклеотидів.

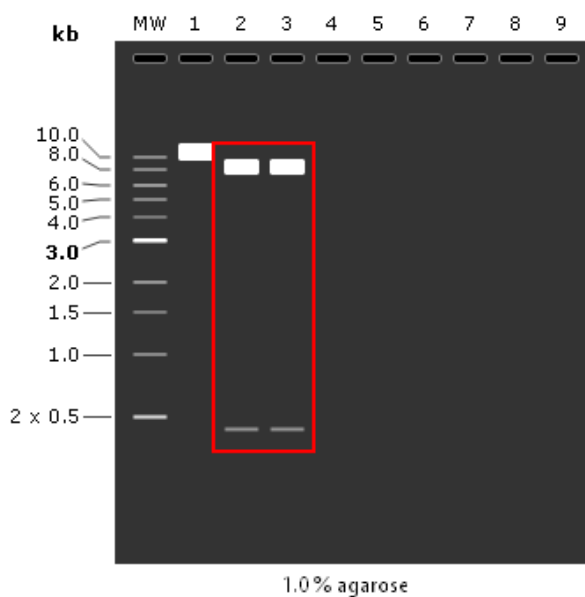


Рис. 3.4.3.3 – Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів рестрикції. 1 — рХ333; 2 — рХ333-46Forw, порізана XbaI та KpnI; 3 — рХ333-62Forw, порізана XbaI та KpnI.

Наступним кроком буде проведено клонування методом SLIC для вставки LSSmOrange-46Forw та LSSmOrange-62Forw у раніше створені плазміді рХ333-

46Forw та pX333-62Forw та створення фінальних векторів. Для валідації зібраних плазмідних векторів буде проведено рестрикційний аналіз за допомогою рестриктаз XbaI та KpnI. На правильну вставку вказуватимуть продукти розміром 9314 та 9316 пар нуклеотидів.

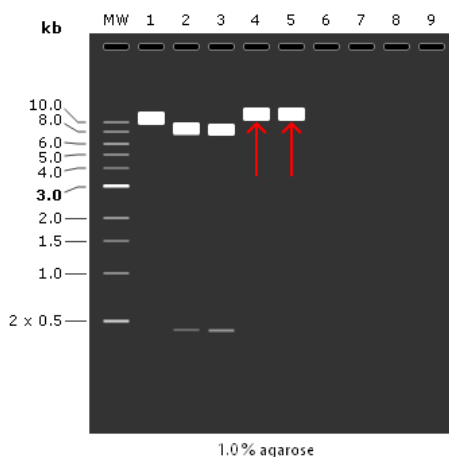


Рис. 3.4.1.4 – Прогнозована електрофореграма при розділенні продуктів рестрикції рестриктазами XbaI та KpnI. 1 — pX333, порізана XbaI та KpnI; 2 — pX333-46Forw, порізана XbaI та KpnI; 3 — pX333-62Forw, порізана XbaI та KpnI; 4 — плазмідний вектор pOrange\_LSSmOr-rHrca\_KO\_46Forw, порізаний XbaI та KpnI; 5 — плазмідний вектор pOrange\_LSSmOr-rHrca\_KO\_62Forw, порізаний XbaI та KpnI.

## Розділ 4. Обговорення результатів

Глобальним завданням роботи було створити систему для контрольованого нокауту гена гіпокальцина в первинній культурі нейронів гіпокампа з метою швидкої валідації клітин, у яких відсутній ендегенний гіпокальцин. Відсутність ендегенного білка покращить результати нейрофізіологічних досліджень, що спрямовані на дослідження локалізації гіпокальцина з мутаціями, асоційованими з первинною дистонією, для детального з'ясування механізмів виникнення хвороби.

У ході роботи було *in silico* створено чотири плазмідних вектори та розпочато їхню збірку. Очікується, що створені плазмідні вектори будуть нокаутувати ген гіпокальцина у первинній культурі нейронів, що можна буде візуально побачити завдяки світінню флуоресцентного білка LSSmOrange. Створені вектори потребують додаткової валідації для розуміння успішності та правильності збірки.

Першим кроком для валідування отриманих векторів буде проведено рестрикційний аналіз плазмідної ДНК за допомогою рестриктаз KpnI та XbaI або BbsI та VsaI. Після цього також буде проведено секвенування послідовності плазмідних векторів, щоби переконатися у правильності збірки.

Наступний крок — трансфекція в первинну культуру нейронів гіпокампа. Якщо під ультрафіолетовим світлом ми побачимо світіння помаранчевого кольору — це означатиме, що трансфекція пройшла успішно і можна стверджувати, що нейрон не містить ендегенного гіпокальцина. Для того, щоби остаточно переконатися у правильності та ефективності проведеної роботи, бажано також виділити геномну ДНК (гДНК) та/або матричну РНК (мРНК) з нейронів, що успішно пройшли трансфекцію, та провести секвенування. Відповідно, отримання правильної нуклеотидної послідовності на цьому етапі остаточно підтвердить правильність дії плазмідних векторів, що були зібрані під час виконання дипломної роботи.

Отже, дана робота — це лише перший етап дослідження, тож результати, а саме створені плазмідні вектори, потребують додаткових досліджень.

## Висновки

Під час виконання роботи було проаналізовано методи редагування геному на основі технології CRISPR/Cas9 та обрано метод ORANGE, який дозволяє створити нокін-конструкти для флуоресцентного мічення ендогенного білка. Також було детально досліджено білок гіпокальцин, його функції та структуру, для створення ефективних плазмідних векторів.

Відповідно до методу ORANGE було розроблено дизайн усіх необхідних для редагування геному компонентів: gRNA, праймерів та фінальних плазмідних конструктів.

Було створено чотири плазмідні вектори *in silico*, включаючи моделювання проміжних експериментів, необхідних для валідації конструктів. Відповідно до цих моделювань було проведено збірку двох плазмідних векторів, які потенційно будуть нокаутувати ген гіпокальцина у первинній культурі нейронів. Також було заплановано подальші дослідження, що спрямовані на валідацію даних конструктів та зможуть остаточно підтвердити правильність збірки.

### Список використаних джерел

- 1 — Bernstein CJ, Ellard DR, Davies G, et al. Behavioural interventions for people living with adult-onset primary dystonia: a systematic review. *BMC Neurology*. 2016;16(1). doi:10.1186/s12883-016-0562-y
- 2 — Bostan, A., Strick, P.L., 2012. The cerebellum and basal ganglia are interconnected. *Neuropsychol. Rev.* 20, 261–270. <https://doi.org/10.1007/s11065-010-9143-9>.The.
- 3 — Ceballos-Baumann, A. O., et al. “Overactive Prefrontal and Underactive Motor Cortical Areas in Idiopathic Dystonia.” *Annals of Neurology*, vol. 37, no. 3, Mar. 1995, pp. 363–372, <https://doi.org/10.1002/ana.410370313>. Accessed 1 Oct. 2022.
- 4 — S. Iwabuchi, Y. Kakazu, J.-Y. Koh, N.C. Harata. Abnormal cytoplasmic calcium dynamics in central neurons of a dystonia mouse model. *Neurosci. Lett.*, 548 (2013), pp. 61-66, <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.05.047>
- 5 — K. Byun, D. Kim, E. Bayarsaikhan, J. Oh, J. Kim, G. Kwak, G.-B. Jeong, S.-M. Jo, B. Lee. Changes of calcium binding proteins, c-Fos and COX in hippocampal formation and cerebellum of Niemann–pick, type C mouse. *J. Chem. Neuroanat.*, 52 (2013), pp. 1-8, <https://doi.org/10.1016/j.jchemneu.2013.04.006>
- 6 — N. Helassa, S.V. Antonyuk, L.Y. Lian, L.P. Haynes, R.D. Burgoyne  
Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Hum. Mol. Genet.*, 26 (2017), pp. 2426-2435, <https://doi.org/10.1093/hmg/ddx133>
- 7 — J. B. Ames, R. Ishima, T. Tanaka, J. I. Gordon, L. Stryer, and M. Ikura, “Molecular mechanics of calcium-myristoyl switches.,” *Nature*, vol. 389, no. 6647, pp. 198–202, Sep. 1997.
- 8 — G. Charlesworth, P. R. Angelova, F. Bartolomé-Robledo, M. Ryten, D. Trabzuni, M. Stamelou, A. Y. Abramov, K. P. Bhatia, and N. W. Wood, “Mutations in HPCA cause autosomal-recessive primary isolated dystonia,” *Am. J. Hum. Genet.*, vol. 96, no. 4, pp. 657–665, Apr. 2015.

- 9 — Stacho M, Manahan-Vaughan D. The Intriguing Contribution of Hippocampal Long-Term Depression to Spatial Learning and Long-Term Memory. *Front Behav Neurosci*. 2022 Apr 25;16:806356. doi: 10.3389/fnbeh.2022.806356. PMID: 35548697; PMCID: PMC9084281.
- 10 — Cherkas V, Grebenyuk S, Osypenko D, Dovgan AV, Grushevskiy EO, Yedutenko M, Sheremet Y, Dromaretsky A, Bozhenko A, Agashkov K, Kononenko NI, Belan P. Measurement of intracellular concentration of fluorescently-labeled targets in living cells. *PLoS One*. 2018 Apr 25;13(4):e0194031. doi: 10.1371/journal.pone.0194031. PMID: 29694385; PMCID: PMC5918622.
- 11 — Giorgi, C., Marchi, S. & Pinton, P. The machineries, regulation and cellular functions of mitochondrial calcium. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 713–730 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0052-8>
- 12 — Bootman MD. Calcium signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012 Jul 1;4(7):a011171. doi: 10.1101/cshperspect.a011171. PMID: 22751152; PMCID: PMC3385957.
- 13 — Prakriya M. Calcium and cell function. *J Physiol*. 2020 May;598(9):1647-1648. doi: 10.1113/JP279541. PMID: 32350889; PMCID: PMC7885240.
- 14 — Brini M, Calì T, Ottolini D, Carafoli E. Neuronal calcium signaling: function and dysfunction. *Cell Mol Life Sci*. 2014 Aug;71(15):2787-814. doi: 10.1007/s00018-013-1550-7. Epub 2014 Jan 19. PMID: 24442513; PMCID: PMC11113927.
- 15 — Burgoyne RD, Haynes LP. Understanding the physiological roles of the neuronal calcium sensor proteins. *Mol Brain*. 2012 Jan 23;5(1):2. doi: 10.1186/1756-6606-5-2. PMID: 22269068; PMCID: PMC3271974.
- 16 — Raghuram V, Sharma Y, Kreutz MR. Ca(2+) sensor proteins in dendritic spines: a race for Ca(2+). *Front Mol Neurosci*. 2012 May 8;5:61. doi: 10.3389/fnmol.2012.00061. PMID: 22586368; PMCID: PMC3347464.
- 17 — Dizhoor AM, Ray S, Kumar S, Niemi G, Spencer M, Brolley D, Walsh KA, Philipov PP, Hurley JB, Stryer L. Recoverin: a calcium sensitive activator of retinal rod guanylate cyclase. *Science*. 1991 Feb 22;251(4996):915-8. doi: 10.1126/science.1672047. PMID: 1672047.

- 18 — Burgoyne RD. Neuronal calcium sensor proteins: generating diversity in neuronal Ca<sup>2+</sup> signalling. *Nat Rev Neurosci.* 2007 Mar;8(3):182-93. doi: 10.1038/nrn2093. PMID: 17311005; PMCID: PMC1887812.
- 19 — Lambrecht HG, Koch KW. Recoverin, a novel calcium-binding protein from vertebrate photoreceptors. *Biochim Biophys Acta.* 1992 Nov 10;1160(1):63-6. doi: 10.1016/0167-4838(92)90038-f. PMID: 1358206.
- 20 — Takamatsu, K., & Noguchi, T. (1993). *Hippocalcin: a calcium-binding protein of the EF-hand superfamily dominantly expressed in the hippocampus.* *Neuroscience Research*, 17(4), 291–295. doi:10.1016/0168-0102(93)90112-4
- 21 — Paterlini M, Revilla V, Grant AL, Wisden W. Expression of the neuronal calcium sensor protein family in the rat brain. *Neuroscience.* 2000;99(2):205-16. doi: 10.1016/s0306-4522(00)00201-3. PMID: 10938426.
- 22 — Mercer EA, Korhonen L, Skoglösa Y, Olsson PA, Kukkonen JP, Lindholm D. NAIP interacts with hippocalcin and protects neurons against calcium-induced cell death through caspase-3-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 2000 Jul 17;19(14):3597-607. doi: 10.1093/emboj/19.14.3597. PMID: 10899114; PMCID: PMC313967.
- 23 — Tzingounis AV, Kobayashi M, Takamatsu K, Nicoll RA. Hippocalcin gates the calcium activation of the slow afterhyperpolarization in hippocampal pyramidal cells. *Neuron.* 2007 Feb 15;53(4):487-93. doi: 10.1016/j.neuron.2007.01.011. PMID: 17296551; PMCID: PMC1832111.
- 24 — Palmer CL, Lim W, Hastie PG, Toward M, Korolchuk VI, Burbidge SA, Banting G, Collingridge GL, Isaac JT, Henley JM. Hippocalcin functions as a calcium sensor in hippocampal LTD. *Neuron.* 2005 Aug 18;47(4):487-94. doi: 10.1016/j.neuron.2005.06.014. PMID: 16102532; PMCID: PMC1563146.
- 25 — Charlesworth G, Angelova PR, Bartolomé-Robledo F, Ryten M, Trabzuni D, Stamelou M, Abramov AY, Bhatia KP, Wood NW. Mutations in HPCA cause autosomal-recessive primary isolated dystonia. *Am J Hum Genet.* 2015 Apr 2;96(4):657-65. doi: 10.1016/j.ajhg.2015.02.007. Epub 2015 Mar 19. PMID: 25799108; PMCID: PMC4385177.

- 26 — Uemura, T., Mori, T., Kurihara, T. *et al.* Fluorescent protein tagging of endogenous protein in brain neurons using CRISPR/Cas9-mediated knock-in and *in utero* electroporation techniques. *Sci Rep* 6, 35861 (2016). <https://doi.org/10.1038/srep35861>
- 27 — Arsić, A., Hagemann, C., Stajković, N. *et al.* Minimal genetically encoded tags for fluorescent protein labeling in living neurons. *Nat Commun* 13, 314 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-27956-y>
- 28 — Thorn K. Genetically encoded fluorescent tags. *Mol Biol Cell*. 2017 Apr 1;28(7):848-857. doi: 10.1091/mbc.E16-07-0504. PMID: 28360214; PMCID: PMC5385933.
- 29 — Gakamsky, Dmitry & Gakamsky, Anna. (2017). Intrinsic fluorescence of proteins as a medical diagnostic tool. *Spectroscopy Europe*. 29. 6-9.
- 30 — Kamiyama D, Sekine S, Barsi-Rhyne B, Hu J, Chen B, Gilbert LA, Ishikawa H, Leonetti MD, Marshall WF, Weissman JS, Huang B. Versatile protein tagging in cells with split fluorescent protein. *Nat Commun*. 2016 Mar 18;7:11046. doi: 10.1038/ncomms11046. PMID: 26988139; PMCID: PMC4802074.
- 31 — Baird GS, Zacharias DA, Tsien RY. Biochemistry, mutagenesis, and oligomerization of DsRed, a red fluorescent protein from coral. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Oct 24;97(22):11984-9. doi: 10.1073/pnas.97.22.11984. PMID: 11050229; PMCID: PMC17281.
- 32 — Tsien RY. Constructing and exploiting the fluorescent protein paintbox (Nobel Lecture). *Angew Chem Int Ed Engl*. 2009;48(31):5612-26. doi: 10.1002/anie.200901916. PMID: 19565590.
- 33 — Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, Tsien RY. Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol*. 2004 Dec;22(12):1567-72. doi: 10.1038/nbt1037. Epub 2004 Nov 21. PMID: 15558047.
- 34 — Yang TT, Cheng L, Kain SR. Optimized codon usage and chromophore mutations provide enhanced sensitivity with the green fluorescent protein. *Nucleic*

Acids Res. 1996 Nov 15;24(22):4592-3. doi: 10.1093/nar/24.22.4592. PMID: 8948654; PMCID: PMC146266.

35 — Shcherbakova DM, Hink MA, Joosen L, Gadella TW, Verkhusha VV. An orange fluorescent protein with a large Stokes shift for single-excitation multicolor FCCS and FRET imaging. *J Am Chem Soc.* 2012 May 9;134(18):7913-23. doi: 10.1021/ja3018972. Epub 2012 Apr 24. PMID: 22486524; PMCID: PMC3348967.

36 — Kumagai A, Ando R, Miyatake H, Greimel P, Kobayashi T, Hirabayashi Y, Shimogori T, Miyawaki A. A bilirubin-inducible fluorescent protein from eel muscle. *Cell.* 2013 Jun 20;153(7):1602-11. doi: 10.1016/j.cell.2013.05.038. Epub 2013 Jun 13. PMID: 23768684.

37 — Buckley AM, Petersen J, Roe AJ, Douce GR, Christie JM. LOV-based reporters for fluorescence imaging. *Curr Opin Chem Biol.* 2015 Aug;27:39-45. doi: 10.1016/j.cbpa.2015.05.011. Epub 2015 Jun 15. PMID: 26087123.

38 — Chapman S, Faulkner C, Kaiserli E, Garcia-Mata C, Savenkov EI, Roberts AG, Oparka KJ, Christie JM. The photoreversible fluorescent protein iLOV outperforms GFP as a reporter of plant virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 16;105(50):20038-43. doi: 10.1073/pnas.0807551105. Epub 2008 Dec 5. PMID: 19060199; PMCID: PMC2604982.

39 — Gaietta G, Deerinck TJ, Adams SR, Bouwer J, Tour O, Laird DW, Sosinsky GE, Tsien RY, Ellisman MH. Multicolor and electron microscopic imaging of connexin trafficking. *Science.* 2002 Apr 19;296(5567):503-7. doi: 10.1126/science.1068793. PMID: 11964472.

40 — Keppler A, Gendreizig S, Gronemeyer T, Pick H, Vogel H, Johnsson K. A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nat Biotechnol.* 2003 Jan;21(1):86-9. doi: 10.1038/nbt765. Epub 2002 Dec 9. PMID: 12469133.

41 — Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Corrêa IR Jr, Kindermann M, Beaufils F, Johnsson K. An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol.* 2008 Feb;15(2):128-36. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.01.007. PMID: 18291317.

- 42 — Los GV, Encell LP, McDougall MG, Hartzell DD, Karassina N, Zimprich C, Wood MG, Learish R, Ohana RF, Urh M, Simpson D, Mendez J, Zimmerman K, Otto P, Vidugiris G, Zhu J, Darzins A, Klaubert DH, Bulleit RF, Wood KV. HaloTag: a novel protein labeling technology for cell imaging and protein analysis. *ACS Chem Biol*. 2008 Jun 20;3(6):373-82. doi: 10.1021/cb800025k. PMID: 18533659.
- 43 — Xu Y, Li Z. CRISPR-Cas systems: Overview, innovations and applications in human disease research and gene therapy. *Comput Struct Biotechnol J*. 2020 Sep 8;18:2401-2415. doi: 10.1016/j.csbj.2020.08.031. PMID: 33005303; PMCID: PMC7508700.
- 44 — Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017 May 22;46:505-529. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28375731.
- 45 — Koonin EV, Makarova KS, Zhang F. Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr Opin Microbiol*. 2017 Jun;37:67-78. doi: 10.1016/j.mib.2017.05.008. Epub 2017 Jun 9. PMID: 28605718; PMCID: PMC5776717.
- 46 — Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013 Nov;8(11):2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24157548; PMCID: PMC3969860.
- 47 — Makarova KS, Haft DH, Barrangou R, Brouns SJ, Charpentier E, Horvath P, Moineau S, Mojica FJ, Wolf YI, Yakunin AF, van der Oost J, Koonin EV. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2011 Jun;9(6):467-77. doi: 10.1038/nrmicro2577. Epub 2011 May 9. PMID: 21552286; PMCID: PMC3380444.
- 48 — Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat Protoc*. 2013 Nov;8(11):2281-2308. doi: 10.1038/nprot.2013.143. Epub 2013 Oct 24. PMID: 24157548; PMCID: PMC3969860.

- 49 — Deltcheva E, Chylinski K, Sharma CM, Gonzales K, Chao Y, Pirzada ZA, Eckert MR, Vogel J, Charpentier E. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 2011 Mar 31;471(7340):602-7. doi: 10.1038/nature09886. PMID: 21455174; PMCID: PMC3070239.
- 50 — Savić, Nataša & Schwank, Gerald. (2015). Advances in therapeutic CRISPR/Cas9 genome editing. *Translational Research*. 168. 10.1016/j.trsl.2015.09.008.
- 51 — Fang H, Bygrave AM, Roth RH, Johnson RC, Haganir RL. An optimized CRISPR/Cas9 approach for precise genome editing in neurons. *Elife*. 2021 Mar 10;10:e65202. doi: 10.7554/eLife.65202. PMID: 33689678; PMCID: PMC7946428.
- 52 — Willems J, de Jong APH, Scheefhals N, Mertens E, Catsburg LAE, et al. (2020) ORANGE: A CRISPR/Cas9-based genome editing toolbox for epitope tagging of endogenous proteins in neurons. *PLOS Biology* 18(4): e3000665. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000665>
- 53 — Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. Isolating, Cloning, and Sequencing DNA. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26837/>
- 54 — Hill RE, Eaton-Rye JJ. Plasmid construction by SLIC or sequence and ligation-independent cloning. *Methods Mol Biol*. 2014;1116:25-36. doi: 10.1007/978-1-62703-764-8\_2. PMID: 24395354.
- 55 — Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods*. 2007 Mar;4(3):251-6. doi: 10.1038/nmeth1010. Epub 2007 Feb 11. PMID: 17293868.
- 56 — Avilan L. Assembling Multiple Fragments: The Gibson Assembly. *Methods Mol Biol*. 2023;2633:45-53. doi: 10.1007/978-1-0716-3004-4\_4. PMID: 36853455.
- 57 — Reece-Hoyes JS, Walhout AJM. Gateway Recombinational Cloning. *Cold Spring Harb Protoc*. 2018 Jan 2;2018(1):pdb.top094912. doi: 10.1101/pdb.top094912. PMID: 29295908; PMCID: PMC5935001.
- 58 — Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PLoS One*. 2008;3(11):e3647. doi:

10.1371/journal.pone.0003647. Epub 2008 Nov 5. PMID: 18985154; PMCID: PMC2574415.

59 — Marillonnet S, Grütznér R. Synthetic DNA Assembly Using Golden Gate Cloning and the Hierarchical Modular Cloning Pipeline. *Curr Protoc Mol Biol*. 2020 Mar;130(1):e115. doi: 10.1002/cpmb.115. PMID: 32159931.

60 — Chung CT, Niemela SL, Miller RH. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Apr;86(7):2172-5. doi: 10.1073/pnas.86.7.2172. PMID: 2648393; PMCID: PMC286873.

61 — Knott GJ, Doudna JA. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. *Science*. 2018;361(6405):866–9. Epub 2018/09/01. pmid:30166482.

62 — Lee SH, Kim S, Hur JK. CRISPR and Target-Specific DNA Endonucleases for Efficient DNA Knock-in in Eukaryotic Genomes. *Mol Cells*. 2018;41(11):943–52. Epub 2018/11/30. pmid:30486613; PubMed Central PMCID: PMC6277560.

63 — Heyer, W. D., Ehmsen, K. T. & Liu, J. Regulation of homologous recombination in eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 44, 113–139 (2010).

64 — Iyama, T. & Wilson, D. M. III. DNA repair mechanisms in dividing and non-dividing cells. *DNA Repair* 12, 620–636 (2013).

65 — Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, Li Y, Fine EJ, Wu X, Shalem O, Cradick TJ, Marraffini LA, Bao G, Zhang F. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat Biotechnol*. 2013 Sep;31(9):827-32. doi: 10.1038/nbt.2647. Epub 2013 Jul 21. PMID: 23873081; PMCID: PMC3969858.

66 — Maddalo D, Manchado E, Concepcion CP, Bonetti C, Vidigal JA, Han YC, Ogradowski P, Crippa A, Rekhman N, de Stanchina E, Lowe SW, Ventura A. In vivo engineering of oncogenic chromosomal rearrangements with the CRISPR/Cas9 system. *Nature*. 2014 Dec 18;516(7531):423-7. doi: 10.1038/nature13902. Epub 2014 Oct 22. Erratum in: *Nature*. 2015 Aug 27;524(7566):502. PMID: 25337876; PMCID: PMC4270925.

## Додатки

## Додаток 1.

## Дизайн олігонуклеотидів для клонування

20rev	
Прямий олігонуклеотид	5' <u>CACC</u> CTTGCTATTCTGCTTGCCCA
Зворотний олігонуклеотид	5' <u>AAAC</u> TGGGCAAGCAGAATAGCAAG
46forw	
Прямий олігонуклеотид	5' <u>CACCG</u> CAAGCAGAATAGCAAGCTG
Зворотний олігонуклеотид	5' <u>AAACC</u> AGC TTGCTATTCT GCTTGC
62forw	
Прямий олігонуклеотид	5' <u>CACCG</u> CTGCGGCCAGAGATGCTGC
Зворотний олігонуклеотид	5' <u>AAAC</u> GCAGCATCTCTGGCCGCAGC

Примітка: підкреслені нуклеотиди утворюють “липкі кінці”, які необхідні для лігування олігонуклеотидів.

## Додаток 2.

## Праймери для синтезу донорних послідовностей з флуоресцентною міткою

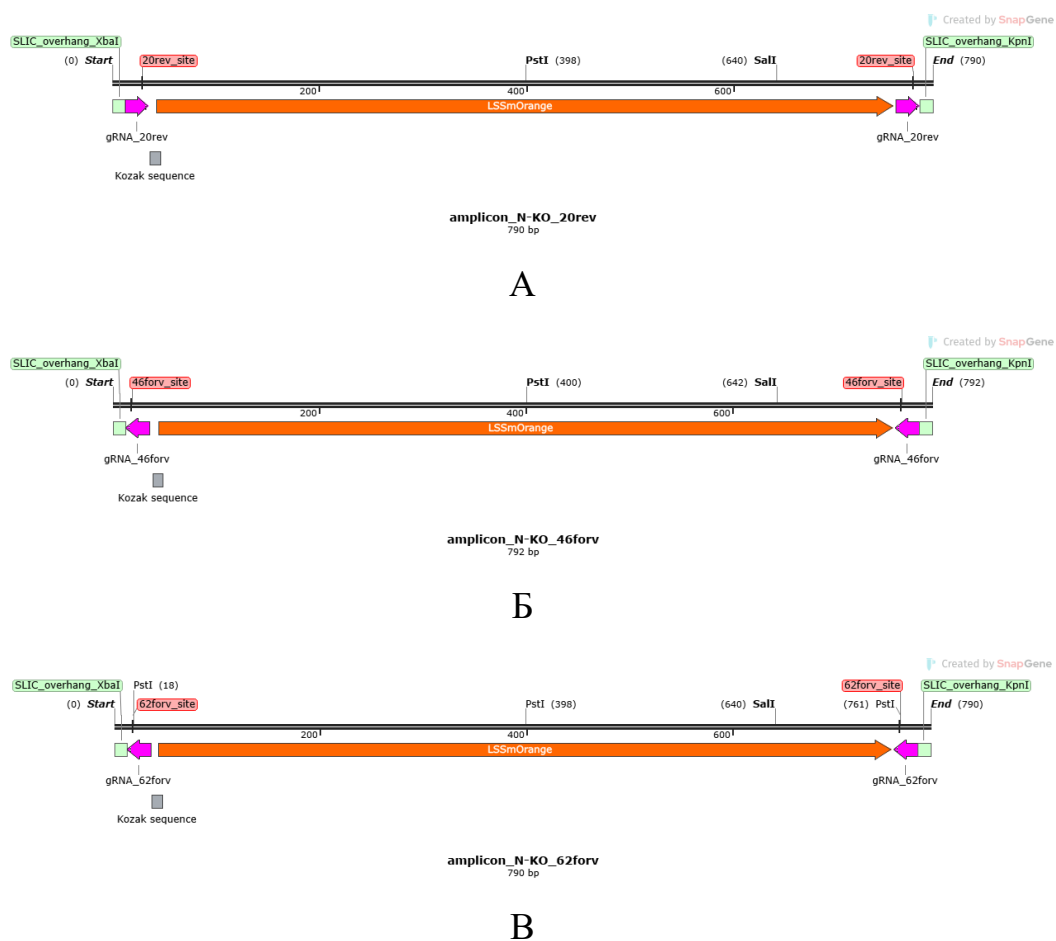
LSSmOrange_20rev	
Прямий праймер	5'AGACAAATGGCT <u>CT</u> CTTGCTATTCTGCT TGCCCATGG <u>A</u> GCCACCATGGTGAGC
Зворотний праймер	5'

LSSmOrange_20rev	
	GTTATGTAACGG <u>CC</u> ATGGGCAAGCAG AATAGCAAGT <u>A</u> TTACTTGTACAGCTCG TCC
LSSmOrange_46forw	
Прямий праймер	AGACAAATGGCT <u>C</u> CGCAGCTTGCTATT CTGCTTGCAT <u>A</u> GCCACCATGGTGAGC
Зворотний праймер	GTTATGTAACGGGCAAGCAGAATAGC AAGCTGCGGT <u>A</u> TTACTTGTACAGCTCG TCC
LSSmOrange_62forw	
Прямий праймер	AGACAAATGGCT <u>C</u> CTGCAGCATCTCTG GCCGCAGC <u>A</u> GCCACCATGGTGAGCAA G
Зворотний праймер	GTTATGTAACGGGCTGCGGCCAGAGA TGCTGCAGGT <u>A</u> TTACTTGTACAGCTCG TCC

Примітка: підкреслені нуклеотиди були додані до послідовності для утворення лінкерів.

## Додаток 3.

## Очікувані донорні послідовності для вставки у плазмідний вектор



А — донорна послідовність для LSSmOrange\_20rev; Б — донорна послідовність для LSSmOrange\_46forv; В — LSSmOrange\_62forv

## Додаток 4.

## Дизайн олігонуклеотидів для клонування контрольного вектора

Clta	
Прямий олігонуклеотид	5' <u>CACCGGATCC</u> AACTCAGCCA TGA
Зворотний олігонуклеотид	5' <u>AAACTCA</u> TGGCTGAGTT GGATCC

Примітка: підкреслені нуклеотиди утворюють “липкі кінці”, які необхідні для лігування олігонуклеотидів.

## Додаток 5.

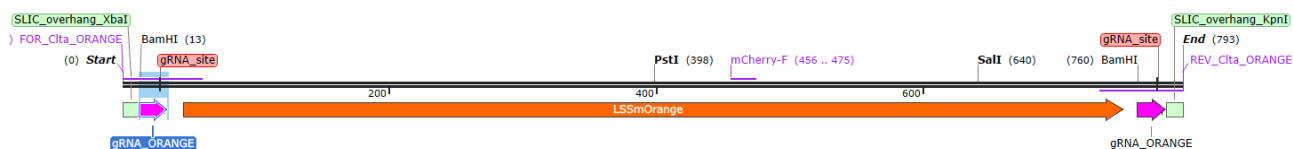
## Праймери для синтезу донорної послідовності з флуоресцентною міткою

LSSmOrange_CltA	
Прямий праймер	5'AGACAAATGGCT <u>GGATCCA</u> ACTCAG CCATGAGGGGCAGGTAGCGGAGTGAGC AAGGGCGAG
Зворотний праймер	5' GTTATGTAACGG <u>CCCTCATGGCT</u> GAGT TGGATCCT <u>CCGCTACCC</u> TTGTACAGCT CGTCCATG

Примітка: підкреслені нуклеотиди — додаткові лінкерні послідовності

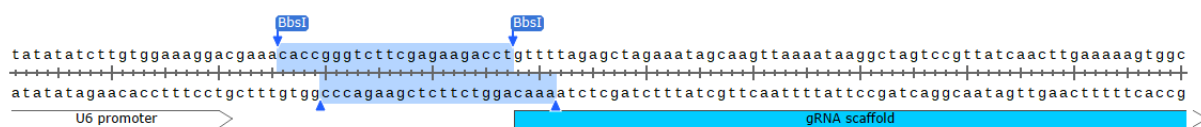
## Додаток 6.

## Очікувана донорна послідовність для вставки у плазмідний вектор для створення контрольного вектора

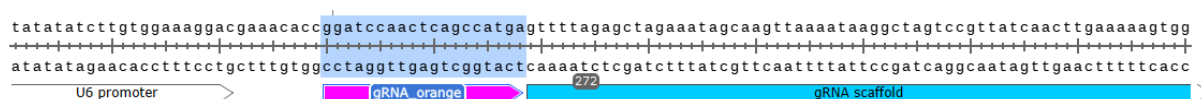


## Додаток 7.

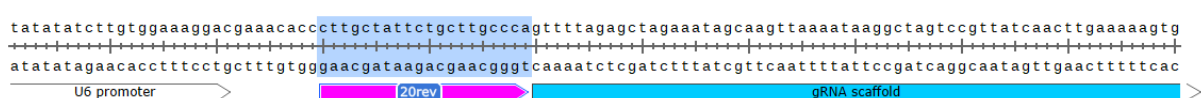
## Очікувані результати після вставки таргетних послідовностей у плазміді рХ333.



А



Б

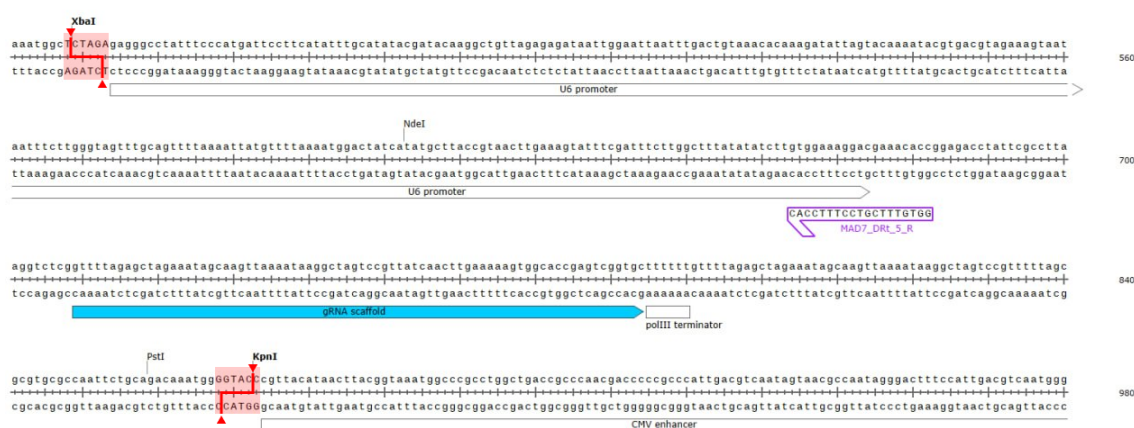


В

А — нуклеотидна послідовність плазміді рХ333 та сайти рестрикції BbsI; Б — зміни у нуклеотидній послідовності плазміді рХ333 після вставки gRNAClta; В — зміни у нуклеотидній послідовності плазміді рХ333 після вставки gRNA20Rev.

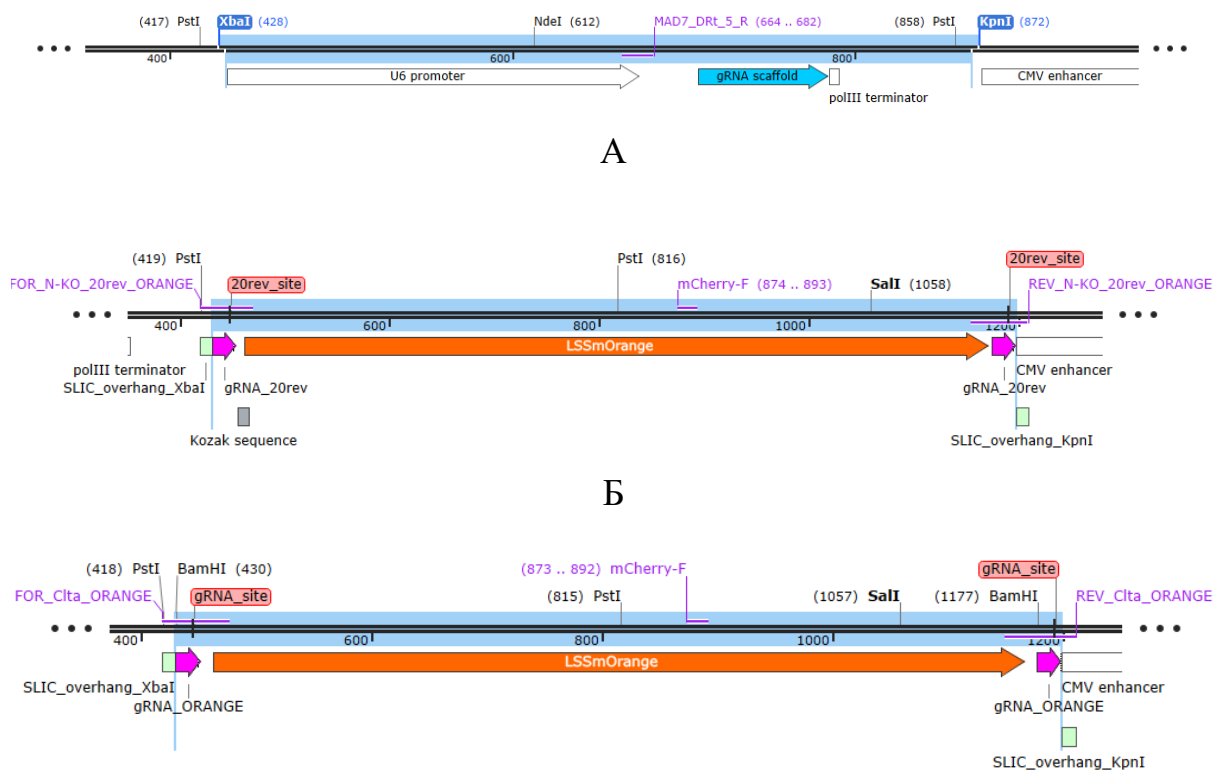
## Додаток 8.

## Сайти рестрикції рестриктаз XbaI та KpnI.



## Додаток 9.

## Нуклеотидні послідовності після вставки



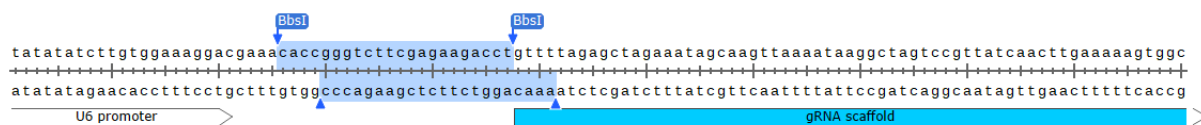
Б

В

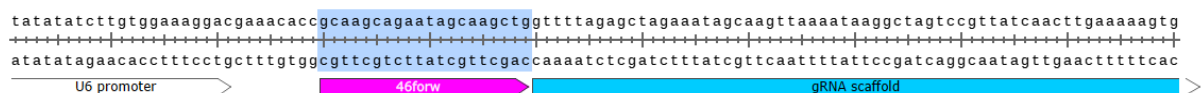
А — Нуклеотидна послідовність рХ333-20Rev та рХ333-CIta до рестрикції, виділений фрагмент — частина послідовності, що вирізається під час рестрикції; Б — Зміни нуклеотидної послідовності рХ333-20Rev після SLIC, виділений фрагмент — донорна послідовність; В — Зміни нуклеотидної послідовності рХ333-CIta після SLIC, виділений фрагмент — донорна послідовність.

## Додаток 10.

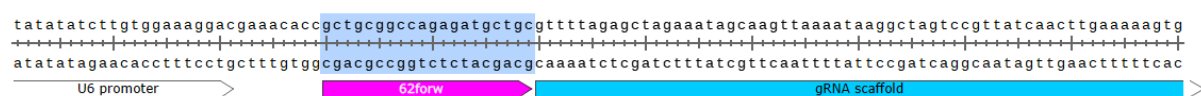
## Очікувані результати після вставки таргетних послідовностей у плазміді рХ333.



А



Б

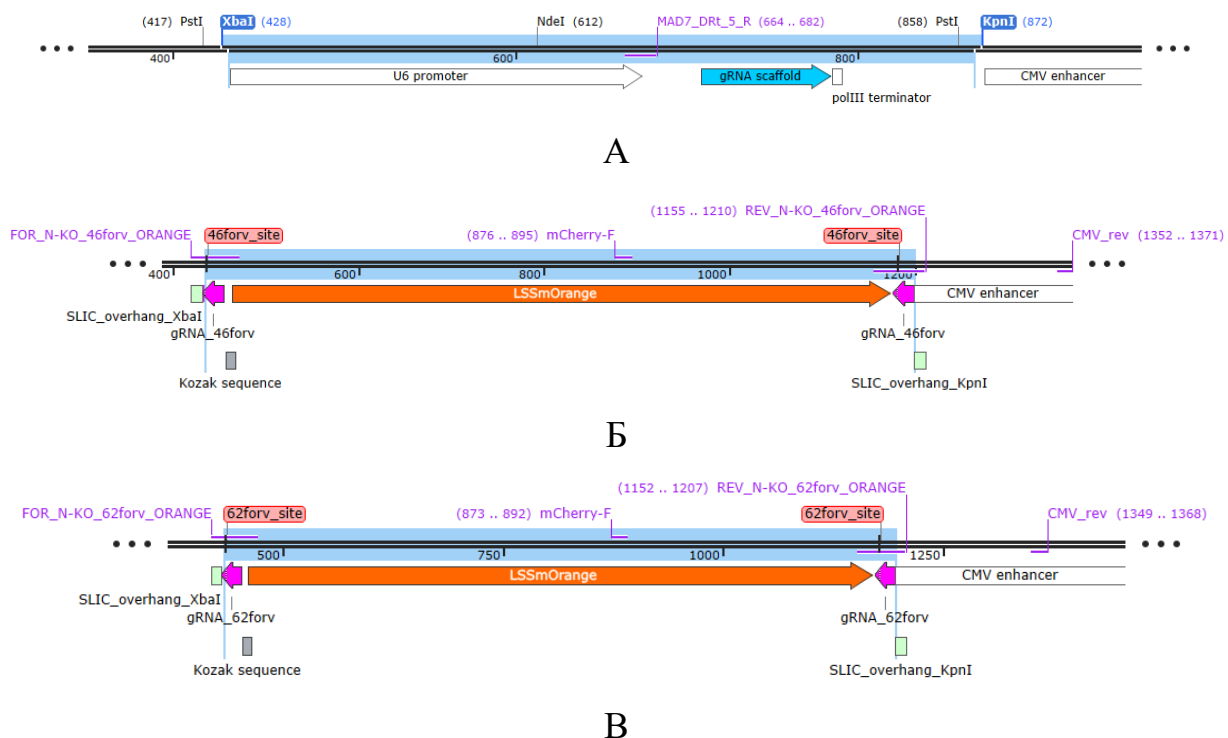


В

А — нуклеотидна послідовність плазміді рХ333 та сайти рестрикції BbsI; Б — зміни у нуклеотидній послідовності плазміді рХ333 після вставки gRNA46Forw; В — зміни у нуклеотидній послідовності плазміді рХ333 після вставки gRNA62Forw.

## Додаток 11.

## Нуклеотидні послідовності після SLIC



Нуклеотидна послідовність рХ333-46Forw та рХ333-62Forw до рестрикції, виділений фрагмент — частина послідовності, що вирізається під час рестрикції; Б — Зміни нуклеотидної послідовності рХ333-46Forw після SLIC, виділений фрагмент — донорна послідовність; В — Зміни нуклеотидної послідовності рХ333-62Forw після SLIC, виділений фрагмент — донорна послідовність.