

**КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА**

Завідувач кафедри
к.б.н., доцент Нипорко О. Ю.
Протокол №____ засідання кафедри
від «____» _____ 2023 р.

**АДАПТАЦІЯ CRISPR-CAS СИСТЕМИ IV ТИПУ ДЛЯ РЕДАГУВАННЯ
ГЕНОМУ В ЕУКАРІОТИЧНИХ КЛІТИНАХ**

Випускна кваліфікаційна робота
магістра студентки спеціальності
162 Біотехнологія та біоінженерія
ОП «Високі технології (Біотехнологія)»
Пономарьової Дарії Сергіївни

Науковий керівник від кафедри:
Професор кафедри молекулярної
біотехнології та біоінформатики
Солдаткін Олексій Петрович

Робота виконана у Вільнюському Університеті
При інституті співробітництва VU-EMBL
Під керівництвом Доктора **Патріка Пауша**

Оцінка захисту роботи

Київ – 2023 р.

АНОТАЦІЯ

Пономарьова Д. С. Адаптація CRISPR-Cas системи IV типу для редагування геному в еукаріотичних клітинах – Випускна кваліфікаційна робота магістра за спеціальністю 162 Біотехнологія та біоінженерія ОП «Високі технології (Біотехнологія)».

Під час цього дослідження моєю метою було покращити розуміння CRISPR Cas систем IV типу, оскільки не всі механізми дії та біологічні функції систем IV типу відомі, системи CRISPR-Cas IV типу є найменш дослідженими з шести відомих типів CRISPR-Cas.

Метою дослідження також було створення системи для використання CRISPR-Cas IV типу для редагування геному в еукаріотичних клітинах. Можливості використання редагування CRISPR *in vivo* обмежуються, частково, через обмежену місткість AAV векторів, які є важливою платформою доставки редакторів геному в еукаріотичні клітини. Цю проблему потенційно можна вирішити за допомогою адаптації компактних редакторів геному, таких як CRISPR-Cas IV типу (3,2 кб).

Метою роботи також було дослідження можливостей додаткової мінімізації систем CRISPR-Cas IV типу за рахунок видалення білка Cas_{бе}, оскільки коли зрілі crRNA одиничного розміру забезпечуються незалежним від Cas_{бе} шляхом термінації транскрипції, система CRISPR-Cas потенційно може функціонувати без Cas_{бе}. Систему також можна мінімізувати шляхом виключення білка DinG та адаптації системи для епігенетичного використання.

Такі методи, як конструювання плазмід, ПЛР, збірка Golden Gate, використовувалися під час цього дослідження для створення еукаріотичної системи експресії для експресії білків типу IV у еукаріотичних клітинах, а також для створення векторів для експресії функціонального мінімального

типу системи IV, і, нарешті, для створення методу визначення активності системи IV типу.

Ключові слова: CRISPR-Cas, class 1 CRISPR, редагування еукаріотичного геному.

ABSTRACT

Ponomariova D.S. Adaptation of CRISPR-Cas type IV system for genome editing in eukaryotic cells - Master's final qualification thesis on specialty 162 Biotechnology and bioengineering OP "High technologies (Biotechnology)".

In this study, my goal was to improve the understanding of type IV CRISPR Cas systems, since not all mechanisms of action and biological functions of type IV systems are known, type IV CRISPR-Cas systems are the least studied of the six known types of CRISPR-Cas.

The aim of the study was also to create a system for using CRISPR-Cas type IV for genome editing in eukaryotic cells. The possibilities of using CRISPR editing in vivo are limited, in part, by the limited capacity of AAV vectors, which are an important platform for the delivery of genome editors into eukaryotic cells. This problem can potentially be solved by adapting compact genome editors such as CRISPR-Cas type IV (3.2 kb).

The goal of the work was also to investigate the possibilities of additional minimization of CRISPR-Cas systems of type IV by removing the Cas6e protein, since when mature single-sized crRNAs are provided in a Cas6e-independent manner by transcription termination, the CRISPR-Cas system can potentially function without Cas6e. The system can also be minimized by excluding the DinG protein and adapting the system for epigenetic use.

Techniques such as plasmid construction, PCR, Golden Gate assembly were used in this study to create a eukaryotic expression system to express type IV proteins in eukaryotic cells, and to create vectors to express a functional minimal type IV system, and finally to creation of a method for determining the activity of a type IV system.

Keywords: CRISPR-Cas, class 1 CRISPR, eukaryotic genome editing

ЗМІСТ

ВСТУП.....	10
РОЗДІЛ 1. Огляд літератури.....	12
1.1 Огляд системи CRISPR-Cas	12
1.2 Системи CRISPR-Cas класу 1 і 2	13
1.3 Системи CRISPR-Cas типу IV	18
1.4 Редагування геному за допомогою CRISPR-Cas	16
1.5 Редагування геному наступного покоління	19
РОЗДІЛ 2. Матеріали та методи	22
2.1 Матеріали.....	22
2.1.1. Обладнання	22
2.1.2 Реактиви	23
2.1.3 Ферменти та буфери	24
2.1.4 Фарби	25
2.1.5 Комерційні комплекти.....	25
2.1.6 Плазмідни.....	26
2.1.7 Штами бактерій	26
2.1.8 Середовища.....	27
2.1.9 Розчини	27
2.1.10 Програмне забезпечення	29
2.2 Методи	29

	6
2.2.1 Дизайн плазмід і праймерів.....	29
2.2.2 Відпал олігонуклеотидів	31
2.2.3 ПЛР.....	31
2.2.4 ПЛР колоній.....	33
2.2.5 Видалення початкового шаблону	34
2.2.6 ДНК-гель-електрофорез	35
2.2.7 Збірка плазмідни Golden Gate	35
2.2.8 Очищення плазмідної ДНК	38
2.2.9 Очищення плазмідної ДНК без набору	39
2.2.10 Рестрикційний аналіз.....	39
2.2.11 Секвенування ДНК	40
2.2.12 Гліцеринові бактеріальні стоки.....	40
2.2.13 Електрокомпетентні клітини E. coli.....	40
2.2.14 Кальційкомпетентні клітини E. coli.....	40
2.2.15 Трансформація електрокомпетентних клітин E. coli	41
2.2.16 Трансформація кальцій-компетентних клітин E. coli	41
2.2.17 Ефективність аналізу трансформації	42
2.2.18 Статистичний аналіз.....	42
РОЗДІЛ 3. Результати досліджень та їх обговорення.....	43
3.1 Конструкція вектора для еукаріотичної експресії CRISPR-Cas системи IV типу	43

	7
3.2 Конструювання плазмід-гайду із HHR послідовністю	46
3.3 Конструювання плазмід що несе мінімальну CRISPR-Cas систему IV типу	47
3.4. Аналіз активності систем CRISPR-Cas IV типу	48
ВИСНОВКИ	52
СПИСОК ВИКОРИСТАНОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	53

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – Кластеризовані регулярно розташовані між собою короткі паліндромні повтори .

Cas (CRISPR-associated proteins) – CRISPR-асоційовані білки.

MGE (Mobile genetic elements) – Мобільні генетичні елементи

PAM (protospacer adjacent motif) – суміжний мотив до протоспейсера

HDR (Homology directed repair) – Відновлення, спрямоване на гомологію

NHEJ (non homologous end joining) – не гомологічне з'єднання кінців

EDTA (Ethylenediaminetetraacetic acid) – Етилендіамінтетраоцтова кислота

IPTG (Isopropyl β - d-1-thiogalactopyranoside) – ізопропіл β -d-1-тіогалактопіранозид

SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) – додецилсульфат натрію

SOC (Super Optimal Broth with Catabolic repressor) – супероптимальний бульйон з катаболічним репресором

TB (terrific broth) – чудовий бульйон

TRIS (tris(hydroxymethyl)aminomethane) – трис(гідроксиметил)аміном етан

TE (Tris, EDTA) – Тріс, ЕДТА

PCR (polymerase chain reaction) – полімеразна ланцюгова реакція

dNTP (Deoxynucleoside triphosphates) – Дезоксинуклеозидтрифосфати

CMV (Cytomegalovirus) – Цитомегаловірус

AAV (adeno associated vector) – аденоасоційований вектор

LB (Lysogeny broth) – Лізогенний бульйон

HHR (hammerhead ribozyme) – НН рибозим

NLS (nuclear localization signal) – сигнал ядерної локалізації

P2A (2A peptide) – 2A пептид

CFU (colony forming unit) – одиниця формування колоній

CmR (Chlorophorm resistance) – стійкість до хлорамфеніколу

TAE (Tris-acetate-EDTA) – Трис-ацетат-EDTA

RT-PCR (Real Time-Polymerase Chain Reaction) – полімеразна ланцюгова реакція в реальному часі

ВСТУП

CRISPR-Cas є адаптивною бактеріальною імунною системою, яка може зв'язуватися з нуклеїновими кислотами та руйнувати їх залежно від направляючої РНК. У природі система складається з масиву CRISPR і білків Cas, необхідних для отримання спейсерів, обробки крРНК і формування ефекторного комплексу. Як інструмент редагування геному система представлена комплексом направляючої РНК і ефектора Cas, який націлює систему на фрагмент ДНК, який цікавить дослідника.

Системи CRISPR-Cas включають два класи: клас 1, який характеризується мультисубодиничним ефекторним комплексом, і клас 2 з одним ефекторним білком. Більшість редакторів CRISPR, які зараз використовуються, базуються на системах класу 2. Системи CRISPR-Cas типу IV належать до класу 1 і мають кілька спільних особливостей з іншими системами класу 1, наприклад мультисубодиничний ефекторний комплекс у формі півмісяця. З усіх відомих на даний момент систем CRISPR-Cas системи IV типу є найменш дослідженими, не всі механізми дії IV типу та біологічні функції відомі [17].

Системи CRISPR-Cas можна націлити на конкретні фрагменти ДНК для розщеплення. CRISPR-Cas також можна використовувати для впровадження нових генів у геном у поєднанні з механізмом HDR. Дезактивовані комплекси CRISPR-Cas можуть регулювати експресію генів у таких системах, як CRISPRi, CRISPRa або CRISPR-опосередковане епігенетичне редагування.

Потенційне використання редагування CRISPR у клітинах людини сильно обмежене, частково через зменшену вантажопідйомність AAV (зазвичай використовуваного вірусного вектора). Цю проблему можна вирішити шляхом розробки компактних редакторів класу 1, таких як тип IV-A, оскільки компоненти, націлені на ДНК, можуть бути зменшені приблизно до 2,5-3 кБ.

Розробка мінімальних систем редагування CRISPR-Cas особливо важлива для майбутнього використання в терапії, оскільки основною проблемою для широкого використання цих систем в еукаріотичних клітинах є доставка цих великих комплексів у клітину. Крім того, мультисубодинична природа Csf2/Cas7 у комплексах CRISPR-Cas класу 1 дозволяє рекрутувати кілька ефекторних доменів, закодованих на короткій ділянці ДНК.

Метою цього дослідження є покращення розуміння системи CRISPR-Cas типу IV, встановлення функціонування цієї системи в еукаріотичних клітинах, розробка мінімальної системи CRISPR-Cas, а також розробка редакторів CRISPR типу IV для епігенетичної регуляції експресії генів.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1 Огляд системи CRISPR-Cas

CRISPR-Cas (кластеризовані регулярно розташовані між собою короткі паліндромні повтори – CRISPR-асоційовані білки) – це природна нуклеопротеїнова система, яка сприяє адаптивному імунітету бактерій і архей проти мобільних генетичних елементів (MGE), таких як бактеріофаги та плазміди. Системи CRISPR-Cas складаються з масиву CRISPR і CRISPR-асоційованих генів, які кодують ефекторні білки Cas. [1]

Локуси CRISPR-Cas локалізуються на хромосомі прокариотів, а також на деяких мегаплазмідах. [2] Вони складаються з багатої на АТ лідерної послідовності, за якою слідує низка коротких паліндромних повторів, часто розміром від 28 до 37 пар основ. У повтори втручаються «спейсери», послідовності, отримані з геномів вірусів або інших MGE під час попередньої інфекції. Зазвичай спейсери мають довжину від 32 до 38 пар основ, залежно від масиву. Деякі повтори CRISPR можуть утворювати вторинну структуру, таку як стовбутова петля, судячи з їх діадної симетрії. [3]

Імунний процес, опосередкований CRISPR-Cas, поділяється на три етапи: придбання спейсера, біогенез crRNA та інтерференція. Під час отримання спейсерів послідовності ДНК чужорідних MGE розрізаються на фрагменти та вставляються як нові спейсери в масив CRISPR нижче лідера. Таким чином, ці спейсерні послідовності є записом попередніх інфекцій. [4; 5] Фрагменти чужорідного геному, обрані для придбання як спейсери, які називаються протоспейсерами, мають тенденцію розташовуватися поруч із послідовностями ДНК розміром 3-5 bp, які називаються PAM (протоспейсерні сусідні мотиви). Наявність PAM вище або нижче потенційної комплементарної кр-РНК області розпізнається комплексом спостереження першим і є невід'ємною частиною початку спаровування цільового ланцюга-крРНК під час інтерференції. Цей механізм необхідний для усунення можливості самонацілювання, оскільки PAM відсутні в масиві CRISPR. [5; 6]

На другому етапі, біогенезі крРНК, масив CRISPR транскрибується в попередницю крРНК, а потім процесується шляхом розщеплення в зрілі напрямні крРНК. Зрілі крРНК містять спейсерну послідовність, комплементарну тій, що розташована в чужорідній молекулі ДНК,

фланковану частковими послідовностями повторів CRISPR з одного або обох боків, які необхідні для зв'язування з білками Cas. [6]

Останньою стадією процесу є формування комплексу спостереження, зібраного з одного або кількох білків Cas, пов'язаних із направляючою crRNA, що дає комплексу здатність розпізнавати специфічну секвенцію та деградувати сторонні послідовності ДНК або РНК. [7]

Коротше кажучи, під час втручання в ДНК розпізнавання РАР ініціює локалізоване розкручування ДНК і створення проміжної «петлі», необхідної для початку процесу розпізнавання цільового ланцюга. [7; 8] Гібридизація crRNA і цільового ланцюга витісняє нецільовий ланцюг і змушує затравкову петлю розширюватися в триланцюгову структуру R-петлі, що підтримується білками Cas. Після цього нуклеїнова кислота може бути розрізана ефекторним комплексом за допомогою або його внутрішньої нуклеазної активності, або окремо залученої нуклеази. [8]

1.2 Системи CRISPR-Cas класу 1 і 2

Системи CRISPR-Cas можна розділити на два основні класи, клас 1 і клас 2, на основі архітектури їхніх ефекторних молекул. Клас 1 визначається ефекторним комплексом із кількох одиниць, тоді як ефектори класу 2 містять один білок. [9]

Системи CRISPR-Cas можна додатково класифікувати на 6 типів (від типу I до типу VI) і кілька підтипів, причому типи I, III і IV належать до класу 1 (рис. 1.1a). Розрізнення між типами та підтипами CRISPR-Cas ґрунтується на характерних генах кожного типу та організації їхніх відповідних локусів [10].

Більшість типів CRISPR спрямовані на ДНК, але деякі типи, наприклад тип VI, можуть спеціально націлюватися на РНК, тоді як системи CRISPR типу III демонструють інтерференцію як РНК, так і ДНК.

У комплексах спостереження 1 типу кілька білків Cas збираються навколо crRNA. Комплекс перешкод типу I «Cascade» (комплекс противірусного захисту, пов'язаний із CRISPR) має архітектуру, схожу на морського коника, і складається з субодиниць Cas8, Cas5, Cas7, Cas11, Cas6 і кількох субодиниць Cas7. Cas7 збирається вздовж спейсера crRNA, утворюючи спіральний «хребет» структури, Cas11 утворює нитку «черева», окремі копії Cas8 (велика субодиниця) і Cas5 розташовані на 5'-кінці crRNA біля «підніжжя» комплексу та субодиниці Cas6, що перекриває кістяк комплексу шляхом зв'язування з 3'-кінцем crRNA (рис. 1.1b). [10; 11] Ендонуклеаза Cas6

потрібна більшості систем класу 1 для обробки крРНК шляхом розрізання транскрипту пре-крРНК для формування окремих молекул крРНК, які складаються з 5'-мітки, отриманої з паліндромного повтору, спейсерної області та 3'-стебла шпилька-петля. [13]

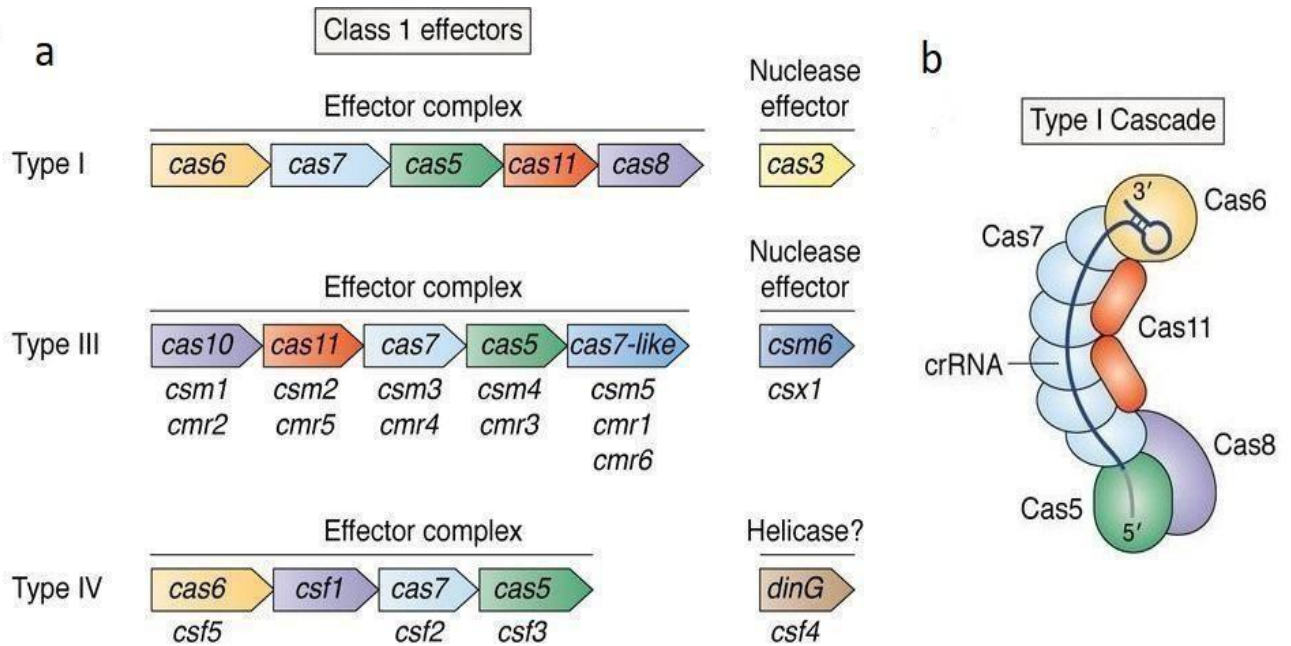


Рисунок 1.1 Ефекторні комплекси CRISPR-Cas класу 1. а. Ефекторні білки, характерні для трьох відомих типів CRISPR-Cas класу 1. Аналогічні субодиниці різних типів відображаються однаковим кольором. б. Архітектура ефекторного комплексу, керованого крРНК типу I. (Ілюстрація адаптована з Liu, Doudna, 2020)

Комплекс спостереження типу III характеризується архітектурою, подібною до комплексу типу I, але з більш розширеною формою. Білок Cas10 замінює Cas8 як велику субодиницю «стопа» комплексу в системах типу III. 3'-кінець crRNA в системах III типу пов'язаний спеціалізованою Cas7-подібною субодиницею. Комплекси спостереження III типу також відрізняються відсутністю білка Cas6. [14]

Комплекси CRISPR-Cas типу IV включають три підтипи, від IV-A до IV-E, і мають велику субодиницю Csf1 (Cas8), а також субодиниці, гомологічні Cas7, Cas6 і Cas5. (рисунок 1.2)

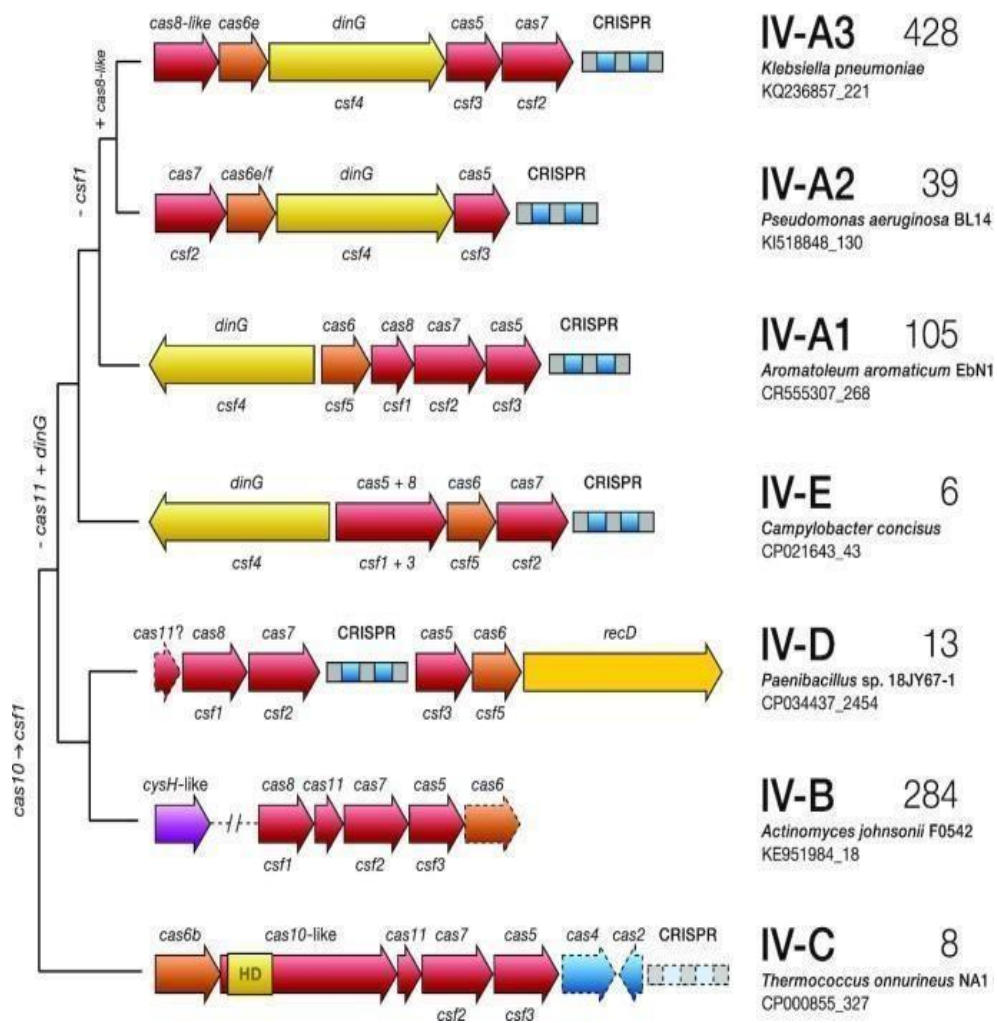


Рисунок 1.2 Системи CRISPR-Cas типу IV, організовані відповідно до локусів генома, архітектури ефекторного комплексу та еволюційних зв'язків. Типова організація оперонів підтипів системи IV типу. Гени мають кольорове кодування та мітки відповідно до сімейств білків, які вони кодують. Номенклатура Cas представлена у верхній частині кожного гена, номенклатура Csf представлена знизу. (Р. Пінілья-Редондо, 2019)

Системи CRISPR-Cas 1-го класу вимагають наявності ефекторної нуклеази та/або гелікази, яка працює разом із комплексом спостереження для розщеплення цільової ДНК або РНК. Більшість каскадних комплексів типу I, а також ефекторних комплексів типу IV не мають внутрішньої ферментативної активності, що спричиняє залежність від рекрутування гелікази-нуклеази Cas3 для деградації дцДНК у випадку системи типу I та гелікази Csf4 сімейства DinG без ДНКаз. випадок системи IV типу. [10, 12] Тип III CRISPR-Cas Csm і Cmr мають власну активність ДНКаз та РНКаз, але все ще використовують супутній ефектор нуклеази (Csm6/Csx1), активність якого стимулюється вторинним месенджером, cOA. [14]

На відміну від систем класу 1, системи класу II використовують єдиний багатофункціональний білок, такий як Cas9 або Cas12, який може націлюватися та розщеплювати ДНК, керуючись гетеродуплексом РНК, що складається з crRNA та транс-активуючої crRNA (tracrRNA) або одну направляючу РНК. [15]

1.3 Системи CRISPR-Cas типу IV

Тип IV CRISPR-Cas є підкласом систем класу 1 і, отже, має декілька ключових характеристик класу 1, таких як багатосуб'єдиничний інтерференційний комплекс із архітектурою, схожою на морського коника. [16] Системи CRISPR-Cas типу IV можна розділити на кілька підтипів: IV-A (1; 2; 3), IV-B, IV-C, IV-D і IV-E. Тип IV CRISPR-Cas є найменш дослідженим із відомих на даний момент типів CRISPR. [16; 17]

Інтерференційний комплекс системи компактний і складається з 3-5 малих білків і кРНК. Розташування генів, що спостерігається в локусі CRISPR типу IV-A, має тенденцію дотримуватись схеми csf4 (dinG), csf5 (cas6-Like), csf1 (cas8-Like), csf2 (cas7), csf3 (cas5) [18] локуси також містять збережену лідерну послідовність, наступну за масивом CRISPR (рис. 1.3).

У системах типу IV, як правило, відсутні білки, необхідні для отримання спейсерів із чужорідної ДНК, тобто Cas1 і Cas2, але деякі все ще містять суміжні масиви CRISPR. Вони здебільшого розташовані поблизу систем підтипу IV-A. За відсутності генів адаптації системи типу IV-A можуть спільно локалізуватися з деякими системами типу I та використовувати адаптаційні білки цих систем для включення нових спейсерів у свій CRISPR-матрицю. [18]

Експресія різних варіантів ендонуклеази, що процесує попередню кРНК, спостерігалася в різних системах типу IV. Ці ендонуклеази позначаються Cas6, Cas6e і Csf5. Залишки активного центру гістидину та тирозину здійснюють розщеплення ферментами Cas6 та Cas6e, тоді як активний центр Csf5 використовує залишки аргініну [18; 19]. Локуси систем підтипу IV-A кодують ендонуклеазу кРНК Csf5, яка виконує розщеплення повторів пре-кРНК на 3'-стороні передбачуваної стовбурової петлі, забезпечуючи дозрівання кРНК під час стадії біогенезу. Водночас у системах підтипу IV-B ці білки відсутні [20; 21], незрозуміло, які crRNA використовуються системами IV-B і як вони функціонують для інтерференції нуклеїнових кислот. Деякі системи типу IV використовують гомолог Cas6 з іншої

системи. наприклад тип I-E. У системах типу IV-A зріла кРНК зберігає 3'-шпилькову структуру.

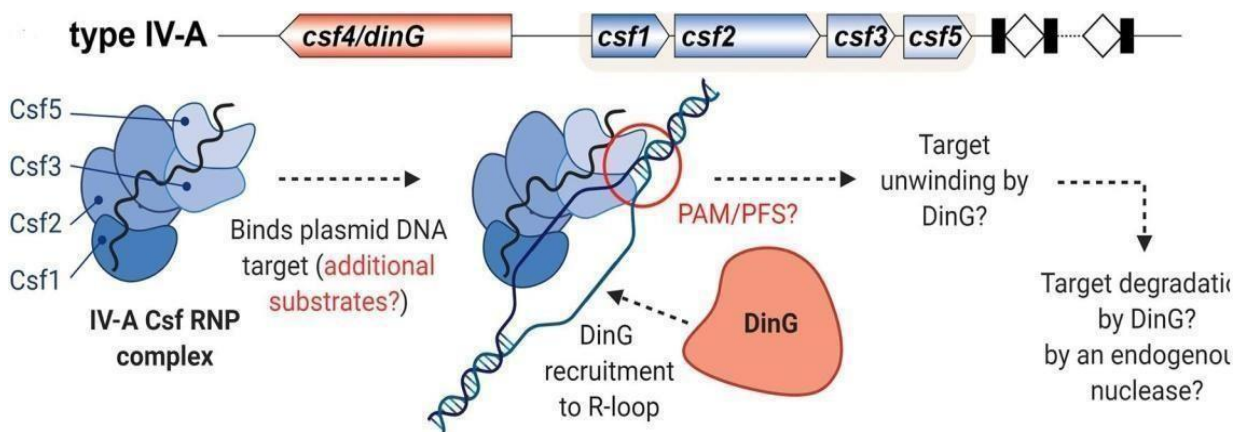


Рисунок 1.3 Модель структури рибонуклеїнового комплексу IV типу. Локус CRISPR-Cas типу IV-A складається з генів, що кодують Csf1, Csf2, Csf3, Csf5 і DinG, а також масиву CRISPR. Ефекторний комплекс складається з Csf1, Csf2, Csf3 і Csf5, геліказа DinG рекрутується окремо. Комплекси RNP IV-A, ймовірно, зв'язують ДНК-мішені та залучають DinG для розкручування та деградації мішені. (Ілюстрація адаптована з Taylor, 2021)

Для інтерференції системи типу IV утворюють керований crRNA ефекторний комплекс, подібний до каскаду типу I, що складається з Csf1, Csf3, Csf5 і кількох копій Csf2. У комплексі білки Csf2 утворюють спіральний каркас навколо crRNA. Тим часом Csf1 і Csf5 розташовані близько до 3'-кінця crRNA [22] (рис. 1.3)

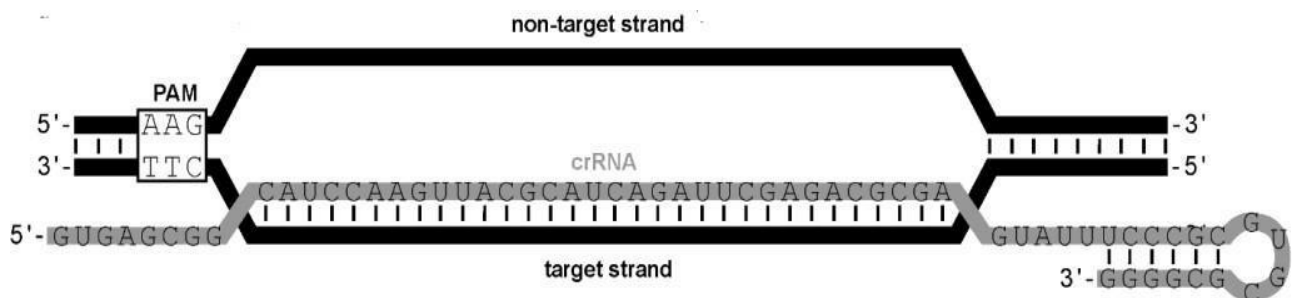


Рисунок 1.4 Схематичне зображення R-петлі типу IV-A. КрРНК типу IV-A у парі з комплементарним ланцюгом ДНК перед PAM, нецільовий ланцюг зміщується. (Ілюстрація адаптована з Guo, 2022)

Комплекс функціонує шляхом зв'язування фрагментів послідовностей нуклеїнових кислот, комплементарних керівній крРНК, що викликає утворення R-петлі (рисунок 1.4). Геліказа DinG, яка не є частиною комплексу, пізніше залучається до петлі R для інтерференції. Для початку

процесу розпізнавання ДНК необхідний відповідний PAM. Спостерігалось, що протоспейсери IV-A фланковані 5'-TTC-3' PAM, подібними до систем I-E. [23]

1.4 Редагування геному за допомогою CRISPR-Cas

Однією з ключових характеристик систем CRISPR-Cas є їхня здатність розпізнавати конкретну послідовність ДНК/РНК у цільовому геномі або RNome програмованим способом направляючої РНК. Ця функція дозволила ефективно адаптувати CRISPR-Cas для редагування генів.

Редагування генів — це набір методів, що розвиваються, спрямований на зміну генетичного складу клітин і організмів для досліджень і терапевтичних застосувань [24]

Система CRISPR-Cas, яка найчастіше використовується для редагування геному, належить до систем CRISPR 2 типу II і складається з двох компонентів: нуклеази Cas9 і штучної єдиної направляючої РНК, злиття (crRNA) і (tracrRNA). [25] Найбільш широко використовуваний варіант Cas9 походить від *Streptococcus pyogenes*. Після розпізнавання PAM комплексом spCas9-sgRNA цільовий ланцюг ДНК, розташований вище PAM, з'єднується зі спейсерною частиною sgRNA. Цільова область потім розщеплюється нуклеазою Cas9, створюючи дволанцюговий розрив з тупим кінцем. Системи CRISPR-Cas 2-го класу в основному використовуються для редагування геному через їх точність, простоту та невелику кількість компонентів, необхідних для націлювання на ДНК. [26] Це протиставляє системи класу 1, які характеризуються ефекторними комплексами, що складаються з кількох білків, які зазвичай вводять великі геномні делеції в програмах редагування генів [27].

Існує кілька стратегій редагування генів за допомогою CRISPR-Cas. Найпоширенішим використанням систем CRISPR-Cas є нокаут генів. У цій стратегії система, забезпечена послідовністю sgRNA, що відповідає послідовності гена, який потрібно інактивувати, доставляється в клітину. Потім SgRNA направляє ефектор Cas до цільової ДНК, після утворення комплексу цільової ланцюга ДНК-sgRNA, Cas нуклеаза утворить дволанцюговий розрив у протоспейсерній області. [28, 29, 30]

Розрив у ДНК можна виправити за допомогою негомологічного з'єднання кінців (NHEJ) або репарації, спрямованої на гомологію (HDR). Активація шляху NHEJ відбувається за відсутності матриці та викликає вставки або видалення, що руйнує цільові локуси. Цілеспрямовані вставки в геном

можливі за допомогою шляху відновлення, спрямованого на гомологію. Якщо фрагмент ДНК донора, гомологічний цільовому локусу, присутній після того, як білок Cas створив дволанцюговий розрив, буде активовано шлях HDR, що дає змогу вставити нову послідовність. [31]

1.5 Редагування геному наступного покоління

Окрім звичайної генної інженерії, системи CRISPR-Cas можна застосовувати для контролю експресії генів, використовуючи здатність комплексу зв'язувати конкретні, заздалегідь визначені ділянки геному, але не його каталітичну активність. Дезактивація функціонального домену білка Cas або видалення передбачуваної гелікази з комплексу класу 1 не впливає на здатність системи зв'язувати ДНК у цільовому сайті, що робить використання неактивного CRISPR-Cas у геномі наступного покоління можливе редагування. [31]

Посттрансляційні модифікації ДНК можуть допомогти керувати діяльністю клітини, регулюючи швидкість експресії певних генів. [32] Використання нових методів епігенетичного редагування на основі систем CRISPR-Cas може допомогти запрограмувати експресію генів у клітині та маніпулювати архітектурою нативного хроматину. [33, 36] Редагування епігенома можна використовувати для активації та репресії певних генів, оскільки воно пропонує широкий спектр можливостей для поступового контролю експресії генів. Системи CRISPR-Cas можна використовувати для залучення ефекторних молекул до певного сайту, дозволяючи контролювати модифікації ДНК, гістонів і архітектури хроматину. [34]

Платформи зв'язування ДНК, здатні виконувати реорганізацію хроматину та змінювати епігеном у певній послідовності шляхом рекрутування епігенетичних ефекторів, уже створені на основі деактивованих систем CRISPR-Cas класу 2. [35]

Системи CRISPR можна використовувати для систем активації CRISPR (CRISPRa), в яких sgRNA та дезактивовані або мертві (dCas9) використовуються для залучення активаторів транскрипції до сайтів початку транскрипції (TSS), щоб індукувати надекспресію гена. Кілька активаторів транскрипції можуть бути залучені до TTS за допомогою однієї sgRNA, щоб індукувати більш високі рівні надекспресії. Для досягнення цього було розроблено кілька стратегій: домени активатора можна злити з dCas9, залучити до каркасу білка, злитого з dCas9, або залучити до каркасу РНК, злитого з sgRNA. [36]

Цілеспрямованого придушення транскрипції генів можна досягти за допомогою інтерференції CRISPR (CRISPRi). Як і в CRISPRa, система складається з білка dCas9 і sgRNA. Подовження транскрипту, опосередковане РНК-полімеразою, може бути зупинено, коли комплекс Cas9-sgRNA зв'язується з областю ДНК, комплементарною sgRNA, створюючи стеричну перешкоду для полімерази та спричиняючи репресію гена-мішені. Для підвищення ефективності системи у випадках, коли комплексу dCas9-sgRNA недостатньо для повного блокування РНК-полімерази, dCas9 можна злити з доменами репресора транскрипції. [37]

Системи CRISPR-Cas також можна використовувати для сайт-специфічного рекрутингу епігенетичних ферментів, що модифікують хроматин, для редагування епігенома, специфічного для послідовності. [40]

Хоча використання систем CRISPR-Cas класу 1 є менш поширеним у редагуванні генів, ніж використання білків класу 2, таких як Cas 9, вони мають потенціал для розробки редакторів наступного покоління, частково через їх багатofункціональність. субодиничні ефекторні комплекси, які не мають внутрішньої каталітичної активності. Націлювання комплексу CRISPR-Cas класу 1 на послідовність ДНК за відсутності Cas3/DinG може заблокувати транскрипційний механізм від зв'язування з послідовністю та призвести до репресії транскрипції в цільовому гені без зміни складу його нуклеїнових кислот.

Важливою характеристикою епігенетичного редагування є необхідність створення синтезу ферментів, які беруть участь в епігенетичній регуляції *in vivo*, і ДНК-зв'язуючих білків або комплексів CRISPR-Cas, які можуть націлювати епігенетичний ефектор на певну послідовність. [39, 41] Якщо домен активатора або репресора транскрипції злито з одним із білків у комплексі класу 1, можна досягти більш точного та ефективного контролю експресії генів.

Системи CRISPR-Cas типу IV містять ефекторні комплекси з кількома субодиницями, і функціональність системи типу IV може бути розроблена шляхом додавання злиття регуляторних доменів. Система має кілька субодиниць для різних стратегій злиття білка Cas та епігенетичного ефекторного домену. Шляхом злиття активаторних і репресорних білків із комплексом і націлюванням його на промоторну ділянку гена може бути можливим посилення або зниження регуляції його експресії, відповідно, без необхідності індукувати дволанцюгові розриви в цільовій послідовності.

Основним недоліком використання систем класу 2 є їх розмір. Варіанти Cas9, виявлені в дикій природі, мають тенденцію бути великими, що може перешкоджати використанню таких редакторів через обмежену ємність упаковки звичайних векторів для редагування генів, таких як віруси, пов'язані з Адено (AAV), необхідні для доставки системи до клітини. . Упаковка SpCas9 (~4,2 кб) у вектор AAV є складною через його ємність для упаковки ~4,5 кб. [42] Хоча цей підхід можливий, він залишає мало місця для додаткових регуляторних елементів. Cas9 і кілька гРНК можуть бути упаковані в окремі вектори AAV, збільшуючи загальну ємність упаковки, але потребуючи спільної інфекції двох AAV, що обмежує дозу та ефективність [43]. Розробка менших систем CRISPR-Cas може мати великий терапевтичний потенціал.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

2.1 Матеріали

2.1.1. Обладнання

Таблиця 2.1.1.1 Обладнання, що використовувалося в дослідженні

Прилад	Виробник
Аналітичні ваги	Fisherbrand Analytical Balances
Настільна центрифуга	Fisherbrand GT4 Benchtop Centrifuge
Настільний рН-метр	Fisherbrand™ accumet™ AE150 Benchtop pH Meter
Кабінет біологічної безпеки	Airstream Gen 3 Class II Type A2 Biological Safety Cabinet
Блоковий нагрівач	Thermo Scientific block heater
Система електрофорезу	multiSUB Mini, Mini Horizontal Electrophoresis System
Електропоратор	MicroPulser Electroporator
Витяжна шафа	SCALA
Система документації гелю	GelDoc Go Imaging System Gel documentation system
Магнітна мішалка	Fisherbrand Magnetic Stirrer
Інкубаційний шейкер	New Brunswick Innova 4000 Incubating Shaker
	INCUCCELL laboratory incubator Incubating shaker
Мікрохвильова піч	Severin Microwave oven 20 liters 700 watts
ПЛР термоциклер	ProFlex™ 3 x 32-well PCR System thermocycler
Наповнювач для піпеток	Thermo Scientific S1 Pipette Filler
Джерело живлення для електрофорезу	Invitrogen PowerEase Touch 120W Power Supply DNA electrophoresis system
Охолоджувана центрифуга	Fisher Scientific accuSpin Micro 17R Refrigerated Centrifuge
Спектрофотометр	NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer
	Fisherbrand Cell Density Meter Spectrophotometer
Змінний Об'єм піпетки	Finnpipette F2 Variable Об'єм Pipettes
Вихровий змішувач	Fisherbrand Mini Vortex Mixer
Система очищення води	Millipore Milli-Q Direct Water

	Purification System
--	---------------------

2.1.2 Реактиви

Таблиця 2.1.2.1 Реактиви, використані в дослідженні

Сполука	Виробник
Оцтова кислота	Panreac
Агар	ThermoFischer Scientific
Агароза	ThermoFischer Scientific
Ампіциліну натрієва сіль	ThermoFischer Scientific
Кальцію хлорид дигідрат	Roth
Левоміцетин	Panreac
D(+)-Глюкоза	Panreac
Етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA)	Panreac
гліцерин	ThermoFischer Scientific
Хлористого-воднева кислота	Sigma-Aldrich
Ізопропіл β -D-1-тіогалактопіранозид (IPTG)	Formedium
Канаміцин	Roth
Магнію хлорид гексагідрат, 99%	Roth
Неденатурований EtOH, 99%,	Honeywell
Ацетат калію	Sigma-Aldrich
Хлорид калію	ThermoFischer Scientific
Додецилсульфат натрію (SDS)	Roth
Хлористий натрій	ThermoFischer Scientific

Їдкий натр	Roth
Супероптимальний бульйон із середовищем придушення катаболітів (SOC).	ThermoFischer Scientific
Чудовий бульйон (ТВ)	Panreac
База ТРІС	ThermoFischer Scientific
Триптон	Panreac
Дріжджовий екстракт	Roth

2.1.3 Ферменти та буфери

Таблиця 2.1.3.1 Ферменти та буфери, використані в дослідженні

Реагент	Виробник
AarI	ThermoFischer Scientific
набір dNTP	ThermoFischer Scientific
FastDigest DpnI	ThermoFischer Scientific
FastDigest BsaI/Eco3II	ThermoFischer Scientific
FastDigest Value Pack	ThermoFischer Scientific
Термочутлива лужна фосфатаза FastAP	ThermoFischer Scientific
ДНК-полімераза Phusion Plus	ThermoFischer Scientific
ДНК-полімераза Phusion	ThermoFischer Scientific
Буфер ДНК-полімерази Phusion Plus	ThermoFischer Scientific
Буфер ДНК-полімерази Phusion	ThermoFischer Scientific
Підсилювач високої GC Phusion Plus	ThermoFischer Scientific
Q5 DNR полімераза	NEB

Т4 ДНК-лігаза	ThermoFischer Scientific
Т4 полінуклеотид кіназа	ThermoFischer Scientific
50X Олігонуклеотиди для AarI, BvaI	ThermoFischer Scientific
10-кратний буфер для AarI	ThermoFischer Scientific

2.1.4 Фарби

Таблиця 2.1.4.1 Фарби, використані в дослідженні

Реагент	Виробник
Етидію бромід	Roth
GeneRuler DNA Ladder Mix	ThermoFischer Scientific
GeneRuler 1-kb сходи ДНК	ThermoFischer Scientific
Сходи ДНК GeneRuler 100 bp	ThermoFischer Scientific
Барвник SYBR® Green DNA, 9,0 мл, 5 x 1,8 мл	Roth
SYBR™ Gold Nucleic Acid Gel Stain, 500 мкл	Invitrogen

2.1.5 Комерційні комплекти

Таблиця 2.1.5.1 Комерційні набори, використані в дослідженні

Набір	Виробник
Набір для гелі-екстракції GeneJET	ThermoFischer Scientific
Набір для очищення GeneJET PCR	ThermoFischer Scientific
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFischer Scientific

2.1.6 Плазмід

Плазмиду рАСУCDuet-1, що несе ген стійкості до хлорамфеніколу, використовували як мішень під час аналізу ефективності трансформації. [44]

Висококопійну плазмиду рХ330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 для експресії ссавців використовували для конструювання вектора експресії еукаріотичного типу IV. Це оптимізована для кодонів людини SpCas9 і химерна плазмід експресії направляючої РНК. Плазмід несе ген резистентності до ампіциліну, промотор U6, послідовність енансера CMV і гРНК каркас. [45]

Висококопійну плазмиду рУТК095 використовували як основу для конструювання направляючих кодуєчих векторів, спрямованих на ген стійкості до хлорамфеніколу. Плазмід несе стійкість до ампіциліну, походження ColE1 і випадання sfGFP. [46]

2.1.7 Штами бактерій

Як хазяї для клонування прокаріотичних експресійних плазмід Mach1 (str. W ΔrecA1398 endA1 fhuA Φ80Δ(lac)M15 Δ(lac)X74 hsdR(rK–mK+)) та DH5α (F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ8 0dlacZΔM15 Δ Використовували (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), λ–) хімічно компетентні клітини *E. coli*. DH5α і Mach1 є одними з найбільш часто використовуваних штамів кишкової палички для звичайного клонування. Клітини Mach1 стійкі до фага T1 і є одними з найшвидше зростаючих хімічно компетентних штамів. Клітини DH5α мають дефіцит ендонуклеази A, мають конститутивний синтез дезоксирибози та підходять для клонування великих плазмід. Мутації RecA1 і endA1 в DH5α збільшують стабільність вставки та покращують якість плазмідної ДНК, отриманої з мініпрепаратів.

TOP10 (F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ–) електрокомпетентні клітини *E. coli* також використовували як господарі для клонування прокариотичні плазмід експресії. Клітини TOP10 мають hsdR для трансформації неметильованої ДНК з ПЛР-ампліфікацій.

DH10b (str. K-12 F– Δ(ara-leu)7697[Δ(rapA'-cra')] Δ(lac)X74[Δ('yahH-mhpE)] дуплікація(514341-627601)[nmpC-gltI] galK16 galE15 e14–(icdWT mcrA) φ80dlacZΔM15 recA1 relA1 endA1 Tn10.10 nupG rpsL150(StrR) rph+ spoT1 Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) λ– Missense(dnaA glmS glyQ lpxK mreC) murA) Нісенітниця(chiA gatZ fhuA? yigA ygcG) Електрокомпетентні клітини *E. coli*

зі зсувом рамки (*flhC mglA fruB*) використовували як хазяїв для клонування еукаріотичної ДНК. Генотип клітин DH10B подібний до штаму TOP10. DH10B має високу ефективність трансформації, здатність поглинати та стабільно підтримувати великі плазміди та відсутність систем рестрикції, залежних від метилювання (MDRS).

NEB Електрокомпетентні клітини *E. coli*, вільні від стабільної ендонуклеази I (*F'* proA+B+ lacIq Δ (lacZ)M15 zzf::Tn10 (TetR)/ Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- Φ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)) використовували для тривалого зберігання еукаріотичного вектора експресії IV типу. NEB Stable дозволяє виділяти плазмідні клони, що містять повторювані елементи та нестабільні вставки.

BL21DE3 star (B F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)) Клітини *E. coli* використовували для експресії типу IV системні білки під час аналізу затвердіння плазміди. Компетентні зіркоподібні клітини BL21(DE3) підходять для експресії нетоксичних гетерологічних генів. Штам містить лямбда-профаг DE3, який несе ген РНК-полімерази T7 під контролем промотору lacUV5, що дозволяє індукувати експресію РНК-полімерази T7 за допомогою IPTG.

2.1.8 Середовища

Рідкі середовища LB. 10 г триптоні і 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl розчиняли в 1 л води і автоклаували при 121 °C протягом 20 хвилин. Автоклавовані рідкі середовища LB зберігали при кімнатній температурі.

Твердий носій LB. 10 г триптоні і 5 г дріжджового екстракту, 10 г NaCl розчиняли в 1 л води, додавали 16 г агару, потім суміш автоклаували (121 °C, 20 хв) і зберігали при кімнатній температурі.

Носій для відновлення SOC. 31 г порошку SOC розчиняли в 1 л автоклавованої води MilliQ, рН доводили до 6,99-7 за допомогою 1 N NaOH. Середовище для відновлення SOC стерилізували за допомогою фільтра PVDF 0,22 мкм і зберігали при 4°C.

2.1.9 Розчини

Базовий розчин ампіциліну (100 мг/мл). 1 г натрієвої солі ампіциліну розчиняли в 10 мл MilliQ і стерилізували за допомогою фільтра PVDF 0,22 мкм. Розчин розподіляли в 1,5-мл мікроцентрифужні пробірки і зберігали при -20 °C.

CaCl₂ (100 мМ). 14,702 г дигідрату CaCl₂ розчинили в 1 л води MilliQ. Розчин автоклавували при 121°C протягом 20 хвилин і витримували при 4°C.

CaCl₂ (85 мМ), 15% гліцерину. 12,49 г дигідрату CaCl₂ розчиняють у 700 мл води MilliQ, до розчину додають 300 мл 50% гліцерину. Розчин автоклавували при 121°C протягом 20 хвилин і витримували при 4°C.

Базовий розчин хлорамфеніколу (20 мг/мл). 0,2 г хлорамфеніколу розчиняли в 10 мл 100% EtOH і стерилізували на фільтрі за допомогою фільтра PVDF 0,22 мкм. Розчин розподіляли в 1,5-мл мікроцентрифужні пробірки і зберігали при -20 °C.

Денатуруючий розчин для безнабірного виділення плазмідної ДНК з бактеріальної культури (0,2 N NaOH, 1,0 % SDS). 8 г NaOH і 0,576 г SDS розчинили в 200 мл води MilliQ. Розчин зберігали при кімнатній температурі.

Гліцерин (10%). 100 мл гліцерину розчинили в 900 мл води MilliQ. Розчин автоклавували при 121°C протягом 20 хвилин. Розчин гліцерину зберігали при 4 °C.

Гліцерин (50%). 500 мл гліцерину розчинили в 500 мл води MilliQ. Розчин гліцерину зберігали при кімнатній температурі.

IPTG (0,05 M). 0,11 г IPTG розчиняли в 10 мл води MilliQ і стерилізували за допомогою фільтра PVDF 0,22 мкм. Розчин розподіляли в 1,5-мл мікроцентрифужні пробірки і зберігали при -20 °C.

Базовий розчин канаміцину (50 мг/мл). 0,5 г канаміцину розчиняли в 10 мл води MilliQ і стерилізували на фільтрі за допомогою фільтра PVDF 0,22 мкм. Розчин розподіляли в 1,5-мл мікроцентрифужні пробірки і зберігали при -20 °C.

MgCl₂ (100 мМ). 20,33 г гексагідрату MgCl₂ розчинили в 1 л води MilliQ. Розчин автоклавували при 121°C протягом 20 хвилин і витримували при 4°C.

1N NaOH. 40 г NaOH розчинили в 1 л води MilliQ. Розчин зберігали при кімнатній температурі.

Ренатуруючий розчин для безнабірного виділення плазмідної ДНК з бактеріальної культури (3M ацетат калію, 2M оцтова кислота). 120 мл 5M ацетату калію та 23 мл крижаної оцтової кислоти розчинили в 57 мл води MilliQ. Розчин зберігали при 4°C

Ресуспензійний буфер для безнабірного виділення плазмідної ДНК з бактеріальної культури (25 мМ TRIS-HCl (pH 8), 50 мМ глюкози, 10 мМ EDTA). 0,6 г TPIC розчиняли в 200 мл води MilliQ і pH регулювали до досягнення 8, потім додавали 1,8 г глюкози та 0,58 г EDTA. Розчин зберігали при 4°C.

Буфер для електрофорезу TAE 50x (2 М TRIS основа, 1 М оцтова кислота, 0,05 М EDTA). 242 г TPIC-основи, 100 мл 0,5 М EDTA і 57,1 мл крижаної оцтової кислоти розчинили в 1 л води MiliQ. Розчин зберігали при кімнатній температурі.

TAE 1x буфер для електрофорезу (40 мМ трис-основи, 20 мМ оцтової кислоти, 1 мМ EDTA). 20 мл буфера 50x TAE розчиняли в 980 мл води MiliQ. Розчин зберігали при кімнатній температурі.

TE буфер (1 мМ EDTA, 10 мМ Tris-Cl). 0,2 мл EDTA (0,5 М, pH 8,0) і 1 мл трис-Cl (1 М, pH 8,0) додавали до 100 мл води MiliQ.

2.1.10 Програмне забезпечення

Benchling. Benchling — це хмарна програмна платформа для молекулярної біології. Бенчлінг використовувався для планування експериментів, проектування плазмід, праймерів і направляючих, аналізу результатів секвенування.

GraphPad Prism версії 5.01. GraphPad Prism — це програмне забезпечення для створення наукових графіків, яке використовується для побудови наукових графіків, повного підгонки кривих (нелінійної регресії), статистики та організації даних. Для статистичного аналізу та візуалізації результатів використовувався GraphPad Prism.

2.2 Методи

2.2.1 Дизайн плазмід і праймерів

Дизайн довідників CRISPR РНК, націлених на ген стійкості до хлорамфеніколу рACYCDuet-1.

Інструмент проектування направляючої РНК CRISPR використовувався для розробки напрямних РНК, націлених на ген стійкості до хлорамфеніколу плазмиди рACYCDuet-1. Послідовність плазмиди рACYCDuet-1 була імпортована в Benchling, і послідовності, розташовані нижче за течією AAG PAMs в гені та промоторі гена, були обрані як напрямні. Для експериментів із затвердінням плазмід було обрано три напрямні довжиною 32 bp, створені

програмним забезпеченням, відповідно до показників ефективності (таблиця 2.2.1.1).

Таблиця 2.2.1.1 Направляючі послідовності РНК CRISPR

Гайд	Послідовність (5' – 3')	Ціль
Guide 1	uaussagugauiuuuuuiscissauuuuaguiuc	Нижній ланцюг ДНК
Guide 2	ucgauaacusaaaaauiacgccccgguagugau	Нижній ланцюг ДНК
Guide 3	aucuuuuuiscuuuauuggugaaguuggaassu	Нижній ланцюг ДНК

Дизайн еукаріотичного вектора для експресії системи IV типу CRISPR-Cas у ссавців.

Гени системи CRISPR-Cas типу IV, що кодують білки Csf1, Csf2, Csf3, Csf4 і DinG, містять С-кінцеві сигнали ядерної локалізації SV40 (NLS), мітки FLAG і послідовності P2A, були розроблені та оптимізовані за кодоном для експресії в *Homo sapiens*. Штучні мітки FLAG-tag, також відомі як DYKDDDDK-мітки, використовувалися для позначення системних білків типу IV. Послідовності P2A, вірусні олігопептиди довжиною 18–22 амінокислоти [53], використовували для індукції розщеплення поліпептидів, синтезованих під час трансляції в еукаріотичних клітинах, на окремі білки типу IV. Синтетичні послідовності ДНК були замовлені в Twist Biosciences.

Еукаріотичний експресійний вектор типу IV, що містить керівну послідовність (таблиця 2.2.1.2), а також гени системи CRISPR-Cas типу IV і плазмідний каркас pX330, був розроблений у Benchling. Керівні олігонуклеотиди були замовлені в Metabion.

Таблиця 2.2.1.2 Керівні олігонуклеотидні послідовності

Олігонуклеотид	Послідовність (5' – 3')
Oligo 1 F	gtgtttcccctgctgctgccccggttatcggcgggtcttcgg
Oligo 3 R	tcgatccgaagaccgccgataacccccgcacgcagggga
Oligo 2 F	tgcacctcccgaagaagaccggtgtttcccctgctgctgcg
Oligo 4 R	ccgataacccccgcacgcagggggaacaccggtcttctt

2.2.2 Гібридизація олігонуклеотидів

Олігонуклеотиди фосфорилували та гібридизували шляхом інкубації з полінуклеотидкіназою T4 і лігазою T4 (таблиця 2.2.2.1) протягом однієї години при 37°C, потім нагрівали до 95°C протягом двох хвилин у термоблоці. Після цього термоблок знімали з нагрівача і реакційну суміш поступово охолоджували до кімнатної температури.

Таблиця 2.2.2.1 Реакційна суміш для гібридизації олігонуклеотидів

Реагент	Об'єм
Прямий олігонуклеотид (100 мкМ)	4 мкл
Зворотний олігонуклеотид (100 мкМ)	4 мкл
Вода MilliQ	21 мкл
T4 PNK	1 мкл

2.2.3 ПЛР

Усі реакції ПЛР проводили з використанням полімерази Phusion Plus у полімеразному буфері Phusion Plus з додаванням 10 мМ dNTP та підсилювача GC. Концентрація праймерів у кінцевій реакційній суміші становила 0,5 мкМ. Приготування реакційних сумішей проводили на льоду, щоб запобігти димеризації праймерів.

ПЛР проводили в термоциклері з початковою температурою денатурації 98 °C протягом 30 секунд, денатурацією при 98 °C (10 секунд), гібридизацією праймерів при 55 °C (10 секунд), подовженням при 72 °C (30 секунд) /kb), остаточна гібридизація при 72 °C (5 хвилин). Етапи денатурації, гібридизації та подовження повторювали протягом 35 циклів.

ПЛР проводили для введення сайтів розпізнавання ферментів типу IIS в плазмідні ділянки, що ампліфікуються (таблиця 2.2.3.1).

Таблиця 2.2.3.1 Праймери, використані в дослідженні. Великими літерами позначають послідовності інтродукованих місць розрізу.

Праймер	Послідовність (5' – 3')	Опис	Експеримент
pX330_R_Bsa I	aaggcacgGTC TCccccatccatgg tggcaccgg	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	ПЛР еукаріотичної плазмиди pX330 проводили для введення сайтів розпізнавання BsaI для

pX330_F_Bsa I	aagcacgGTCT Ccgcaagaggaac ccctagtgatggag	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	подальшої збірки Golden Gate еукаріотичного вектора експресії та видалення послідовності spCas9. Через складність еукаріотичної послідовності ПЛР довелося проводити в трьох окремих реакціях, причому в кожній реакції ампліфікували фрагмент >1,5 кб необхідної ділянки плазміди. Праймери були розроблені для введення сайтів розпізнавання BsaI у фрагменти плазміди рХ330.
pX330_guide_ R	tatagGTCTCg acacgggtgttcgt cctttccac	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	
pX330_guide_ F	tatagGTCTCgt cggttttttgttttag agctagaaatagc aag	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	
pX330_AmpR _R	gcatcttacggatg gcatgac	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	
pX330_AmpR _F	taggccaccacttc aagaactc	pX330. Додавання сайту рестрикції BsaI.	
pYTK095_HH R_F	tataCACCTG Ctatacgagaccg ggatgac	pYTK095. Додавання сайту рестрикції AarI	ПЛР плазміди pYTK095 проводили для введення послідовностей розпізнавання AarI для вставки послідовності рибозиму Hammerhead.
010-T7P-R	gggaattatgctga gtgatatcctacc gtccacatat	pYTK095. Додавання сайту рестрикції AarI	
IVA3- dDinG_Cas6d el_R	tataCACCTG Ctataactgggtca tacctttttcaagag gtgc	IVA3-dDinG. Видалення Cas6e з додаванням сайту рестрикції AarI.	
IVA3- dDinG_Cas6d el_F	tataCACCTG Ctatacagttcatgt taaattttaaccgt atcgggtc	IVA3-dDinG. Видалення Cas6e з додаванням сайту рестрикції AarI.	ПЛР проводили з прокаріотичними експресійними плазмідами, що несуть гени типу IV і гени типу IV без гелікази DinG як матриці, щоб отримати плазміди, що несуть мінімальні системні послідовності типу IV, які не містять білок Cas6e, а також послідовності, не мічені His. Місця розрізу AarI були введені для циркуляризації продукту ПЛР.
IVA3-Chis- delCas6e-R	ataCACCTGC tatacagtagaata catcagcggatt	IVA3-Chis. Видалення Cas6e з додаванням сайту рестрикції AarI.	
002-Duet-	attaCACCTG	IVA3-Chis.	

MCS1-F-AarI	Ctgcttaagtcgaa cagaaagtaatcg	Видалення Chis з додаванням сайту рестрикції AarI.	
005-RPCsf2-R	tataCACCTG Cccatcttagcgg gcagtgaaatc	IVA3-Chis. Видалення Chis з додаванням сайту рестрикції AarI.	

Температури гібридизації всіх розроблених праймерів були в межах 55-57°C.

Направляючі олігонуклеотиди та праймери були замовлені у постачальника Metabion. Перед відкриттям пробірки короткочасно центрифугували. Олігонуклеотиди та праймери ресуспендували у воді MilliQ для досягнення концентрації 100 мкМ.

2.2.4 ПЛР колоній

Для ПЛР колоній використовували полімерази Phusion у полімеразному буфері Phusion з додаванням 10 мМ dNTP. Концентрація праймерів у кінцевій реакційній суміші становила 0,5 мкМ. Зразки колоній *E. coli* переносили в реакційні суміші ПЛР за допомогою стерилізованих дерев'яних зубочисток.

ПЛР проводили в термоциклері з початковою температурою денатурації 98 °С протягом 30 секунд, денатурацією при 98 °С (10 секунд), відпалом праймера при 55 °С (30 секунд), подовженням при 72 °С (30 секунд). /kb), остаточне розширення при 72 °С (10 хвилин). Етапи денатурації, гібридизації та подовження повторювали протягом 35 циклів. Результати ПЛР оцінювали шляхом проведення гель-електрофорезу ампліфікованої ДНК.

Для перевірки послідовностей сконструйованих плазмід після лігування були необхідні ПЛР колоній (таблиця 2.2.4.1).

Таблиця 2.2.4.1 Праймери, використані для ПЛР колоній

Праймер	Послідовність (5' – 3')	Опис	Експеримент
pX330_AAV 2_ITR_R	cgcacagatgc gtaaggag	Наявність 2-го інтрона	Перевірка послідовності для еукаріотичної експресійної конструкції типу IV.
pX330_DinG _F	gctgagtcactg tatggctac	Наявність 2-го інтрона	
pX330_gRN	ggctagtccgtt	Наявність scaffold G	

A_scaffold_F	atcaccttg		
pX330_CMV_R	ggtacctctaga gccatttgc	Наявність scaffold	G
pX330_hybrid_intron_F	cctggagcacct gcc	Тип еукаріотичної експресійної конструкції. Наявність 1-го інтрона	IV
pX330_Csf1_R	gctggccagaa gtcgc	Наявність 1-го інтрона	
pX330_U6_F	ggactatcatatg cttaccgtaactg	Наявність гіда	
IVA3-Chis_F_seq2	cgagcttggtcg ctcactg	Наявність Casbe.	Перевірка послідовності конструкції мінімальної системи типу IV.
007-RPCasbe-R	tatacacctgcc catatgactactc ccctgccag	Наявність Casbe.	
IVA3-Chis_F_seq2	cgagcttggtcg ctc	Наявність Casbe.	Перевірка послідовності конструкції мінімальної системи типу IV без DinG.
RC_IVA3_DinG_Chis_R	tatacacctgcat gcatggtggtga tgatggccacac tggatatacctctt caaaatacag	Наявність Casbe.	
T7_terminator_R	ctcaagaccctg ttagaggc	наявність NHR.	Перевірка послідовності направляючої плазмиди pYTK095.

Температури гібридизації всіх розроблених праймерів були в діапазоні 50-55°C.

2.2.5 Видалення початкового шаблону

Продукти ПЛР розщеплювали рестриктазою DpnI (1 мкл на 50 мкл реакційної суміші) протягом трьох годин при 37°C для видалення залишків вихідної матриці. Плазмідну ДНК очищали з реакційної суміші за допомогою GeneJet PCR Purification Kit. Якщо були виявлені неспецифічні продукти ПЛР, продукт очищали з електрофоретичного гелю за допомогою набору для очищення гелю GeneJet.

2.2.6 ДНК-гель-електрофорез

Для аналізу послідовностей довжиною 0,5–10 кб використовували 1% агарозний гель. Для аналізу послідовностей довжиною 0,1–0,5 кб використовували 2% гелі. Гелі готували змішуванням 1 або 2 % (мас./об.) порошку агарози з буфером 1xTAE і нагріванням суміші до розплавлення агарози. До розплавленої агарози додавали бромід етидію до концентрації 0,5 мкг/мл. Для оцінки розмірів смуг ДНК використовували GeneRuler DNA Ladder Mix. Електрофорез проводили при напрузі 120 В протягом 30 хв. Потім результати візуалізували шляхом освітлення гелів УФ-світлом.

2.2.7 Збірка плазмиди Golden Gate.

Для складання плазмід використовували протокол лігування Golden Gate. Клонування Golden Gate полягає у використанні рестрикційного ферменту типу IIS і лігази в рестрикційному лігуванні для збирання кількох фрагментів ДНК у визначеному лінійному порядку у векторі за один крок. [47] 1 мкл лігази T4 і 0,5 мкл ферменту рестрикції типу IIS використовували в 15 мкл реакції з 1,5 мкл буфера для ДНК-лігази T4. Співвідношення вектора до вставки було 1:7.

Для складання РНК-направляючих, націлених на ген стійкості до хлорамфеніколу, плазмиду рУТК095 розщеплювали ендонуклеазою рестрикції BsaI (Eco31I) і очищали за допомогою набору для очищення GeneJet PCR Purification Kit. Відпалені направляючі олігонуклеотиди розводили в 100 разів і лігували в плазмиду.

Таблиця 2.2.7.1 Протокол збирання направляючих плазмід

Реагент	Об'єм
Вода MilliQ	до 20 мкл
Лінеаризована плазмід	30 нг
1:100 розведені олігонуклеотиди	2 мкл
Буфер для лігування	2 мкл
ДНК-лігаза	1 мкл

Суміші для лігування інкубували при кімнатній температурі протягом 15 хвилин, а потім трансформували в клітини штаму E.coli Mach1, компетентні щодо кальцію. Після інкубації протягом ночі при 37°C на селективному

твердому агарі LB, що містить ампіцилін, колонії, які утворилися, перевіряли за допомогою ПЛР колоній.

Плазміди, що несуть гени для експресії мінімальних систем експресії типу IV, були зібрані з продуктів ПЛР з використанням AarI і T4 лігази.

Таблиця 2.2.7.2 Протокол збирання плазмід експресії системи мінімального типу IV

Реагент	Об'єм
T4 ДНК-лігазний буфер	1,5 мкл
T4 ДНК-лігаза	1 мкл
AarI	0,5 мкл
Олігонуклеотиди для AarI	0,3 мкл
Продукт ПЛР	200 нг
Вода MilliQ	До 15 мкл

Суміш інкубували в термоциклері, умови реакції наведені в таблиці 2.2.7.3.

Таблиця 2.2.7.3 Умови реакції складання Golden Gate

Температура	Час	
37°C	2 хв	X15
16°C	5 хв	
37°C	5 хв	
80°C	10 хв	

Ліговану плазмиду трансформували в електрокомпетентні клітини Top10. Після інкубації протягом ночі при 37°C на селективному твердому агарі LB, що містить канаміцин, утворені колонії перевіряли за допомогою ПЛР колоній.

Щоб зібрати направляючу плазмиду, що містить послідовність NHR, продукт ПЛР pYTK095 інкубували з ДНК-лігазою AarI та T4 та олігонуклеотидом NHR (таблиця 2.2.7.4) для циркуляції ДНК та вставки послідовності NHR.

Таблиця 2.2.7.4 Олігонуклеотидна послідовність рибозиму NHR

Олігонуклеотид	Послідовність (5' – 3')
pYTK095 NHR oligo F	taggcgataactgatgaggccttcgggccgaaacggtgaaagccgtattatcgg
pYTK095 NHR	ctcgccgataatacggctttcaccgtttcggcccgaaggcctcatcagttatcg

oligo R	
---------	--

Таблиця 2.2.7.6 Протокол збирання направляючої плазміди з ННР.

Реагент	Об'єм
Т4 ДНК-лігазний буфер	1,5 мкл
Т4 ДНК-лігаза	1 мкл
AarI	0,5 мкл
Олігонуклеотиди для AarI	0,3 мкл
Продукт ПЛР рҮТК	160 нг
Олігонуклеотид ННР	28 нг
Вода MilliQ	До 15 мкл

Суміш інкубували в термоциклері, умови реакції наведені в таблиці 2.2.7.1.

Ліговану плазмиду трансформували в електрокомпетентні клітини Top10. Після інкубації протягом ночі при 37°C на селективному твердому агарі LB, що містить ампіцилін, колонії, які утворилися, перевіряли за допомогою ПЛР колоній.

Гени системи CRISPR-Cas типу IV і напрямні послідовності були клоновані в каркас рХ330 під контролем промотору U6. Послідовності Csf2-Csf4-DinG і Csf1-Cas6e-Csf3-Csf2, фрагменти направляючої послідовності та три фрагменти скелета плазміди рХ330 були зібрані в еукаріотичний експресійний вектор типу IV в одній реакції з використанням ендонуклеази рестрикції BsaI та лігази Т4.

Об'єм кожного фрагмента розраховували за формулою [47]:

$$\frac{20 \text{ (fmol)} \times \text{довжина (bp)}}{\text{концентрація (ng/}\mu\text{l)}} \times 1520$$

Таблиця 2.2.7.7 Суміш реакцій Golden Gate

Реагент	Об'єм
Т4 ДНК-лігаза	1,5 мкл
10-кратний буфер для лігування	2,5 мкл
BsaI	1 мкл
1,2 кб фрагмент рХ330 (7,9 нг/мкл: 1200 п.н.)	1,99 мкл

Фрагмент рХ330 1,5 кб (14,5 нг/мкл; 1500 п.н.)	1,35 мкл
Фрагмент рХ330 1,4 кб (12,27 нг/мкл; 1400 п.н.)	1,5 мкл
Csf 1, 3, 2 Cas6e (38,4 нг/мкл; 5002 bp)	1,7 мкл
Csf 2, 4 DinG (33,9 нг/мкл; 4939 bp)	1,91 мкл
Оліго 1 (2,8 нг/мкл; 44 bp)	0,2 мкл
Оліго 2 (2,8 нг/мкл; 50 bp)	0,2 мкл
Вода MilliQ	11,15 мкл

Під час інкубації використовувався протокол лігування Golden Gate >3 фрагментів з ендонуклеазою рестрикції BsaI (таблиця 2.2.7.8).

Таблиця 2.2.7.8 Збірка Golden Gate з умовами реакції ендонуклеази рестрикції BsaI для >3 фрагментів. Суміш інкубували в термоциклері.

Температура	Час	
37°C	2 хв	X50
16°C	5 хв	
50°C	5 хв	
80°C	10 хв	

Після інкубації ліговану плазмиду трансформували в електрокомпетентні клітини штаму NEB Stbl *E. coli*. Після інкубації протягом ночі при 37°C на селективному твердому агарі LB, що містить ампіцилін, колонії, які утворилися, перевіряли за допомогою ПЛР колоній.

2.2.8 Очищення плазмідної ДНК

Клітини, отримані з колоній, відібраних після колонійної ПЛР, інкубували протягом ночі при 37°C і 220 об/хв у пробірках для культивування, що містять 4 мкл рідкого середовища LB, доповненого відповідним антибіотиком. Зразки плазмід очищали з нічних колоній за допомогою

набору GeneJet Plasmid Miniprep Kit відповідно до наданої інструкції з експлуатації. Для вимірювання концентрації екстрагованої ДНК використовувався спектрометр Nanodrop 1000.

2.2.9 Очищення плазмідної ДНК без набору

1,5 мл нічної культури додавали в мікроцентрифужну пробірку на 2 мл і центрифугували при 10000 g протягом 30 секунд. Після виливання надосадової рідини осад ресуспендували в 100 мкл холодного розчину ресуспендування та перемішували протягом 2 хвилин. Додавали 200 мкл денатуруючого розчину та обережно перемішували вміст пробірки. Розчин інкубували на льоду протягом 5 хвилин, потім додавали 150 мкл холодного ренатуруючого розчину і пробірку знову інкубували на льоду протягом 5 хвилин, потім центрифугували при 12000 g протягом 5 хвилин. Супернатант обережно переливали піпеткою в нову пробірку. Суміш інкубували з 1 мкл 10 мг/мл РНКазі А при 37°C протягом 5 хвилин. Після інкубації до розчину додавали 2 об'єми (900 мкл) 100% етанолу та 1/10 об'єму (45 мкл) 3М Na-ацетату (рН 4,8). Пробірку поміщали при -80°C на 30 хвилин, центрифугували при 12000 протягом 30 хвилин при 4°C, потім супернатант зливали, а відкриті, перевернуті пробірки дренували на паперовий рушник. Осад промивали 500 мкл холодного 70% етанолу. Після центрифугування при 12000 протягом 5 хвилин етанол виливали і пробірку сушили, перевертаючи на паперовий рушник протягом 20 хвилин. Додавали буфер TE і пробірку залишали на ніч при кімнатній температурі для ресуспендування.

2.2.10 Рестрикційний аналіз

Послідовності плазмідних конструкцій, відібраних після ПЛР колонії, перевіряли перед секвенуванням за допомогою рестрикційного аналізу.

Для прогнозування розташування смуг на гелі після електрофорезу цільової плазміди, розщепленої рестриктазами, використовували програмне забезпечення для тестування. Потім довжину продуктів, отриманих після травлення, порівнювали з очікуваною довжиною.

Для рестрикційного аналізу використовували ферменти ThermoFisher FastDigest. Для оцінки послідовності розщеплення вектора експресії еукаріот типу IV за допомогою XhoI було використано, а також подвійне розщеплення за допомогою AarI та XbaI для перевірки цілісності багатої GC області, прилеглої до промотору U6 плазміди. Подвійне розщеплення за допомогою XbaI та BamHI було використано для аналізу послідовності вектора експресії системи мінімального типу IV.

2.2.11 Секвенування ДНК

Послідовності ДНК отриманих конструкцій були перевірені секвенуванням, виконаним SeqVision, MB.z

2.2.12 Гліцеринові бактеріальні стоки

Пробірки для культивування, що містять 4 мл рідкого середовища LB, доповненого 4 мкл ампіциліну, інокують клітинами NEB Stb *E. coli*, що містять вектор еукаріотичної експресії типу IV. Клітини вирощували протягом ночі при 37°C і 220 об/хв. Наступного дня 1 мл нічної культури переносили в пробірку з кришкою, що загвинчується, на 2 мл, додавали в пробірку 1 мл 50% гліцерину та обережно перемішували вміст. Основні пробірки зберігали в морозильній камері при -80°C.

2.2.13 Електрокомпетентні клітини *E. coli*

За допомогою стерильної зубочистки колонію клітин *E. coli* інокують у пробірку для культивування з 4 мл середовища LB та відповідним антибіотиком і вирощують протягом ночі. Потім 100 мл середовища LB засівали 2 мл нічної культури для досягнення початкового OD₆₀₀ 0,05. Культури вирощували в шейкері-інкубаторі при 37°C і 220 об/хв до досягнення OD₆₀₀ 0,5-0,6. Культури швидко охолоджували на крижаній бані, а клітини збирали центрифугуванням при 4°C і 4000 г протягом 10 хвилин у конічних пляшках для центрифугування на 50 мл. Потім клітини двічі промивали 50 мл крижаної води MilliQ протягом 10 хвилин при 4000 г і двічі 50 мл охолодженого 10 % гліцерину протягом 10 хвилин при 4000 г. Після останнього промивання клітини ресуспендували в 200 мкл охолодженого льодом 10% гліцерину, розподіляли в мікроцентрифужні пробірки на 1,5 мл, швидко заморожували в рідкому азоті та зберігали при -80°C.

2.2.14 Кальційкомпетентні клітини *E. coli*

1 л середовища LB інокував 10 мл культури *E. coli* протягом ночі та вирощувався при 37°C і 220 об/хв у шейкері-інкубаторі, доки OD₆₀₀ не досягне 0,35-0,4. Культуральні колби швидко охолоджували на крижаній бані. Культуру об'ємом 1 л розподіляли в охолоджені льодом конічні центрифужні пляшки об'ємом 50 мл. Клітини збирали центрифугуванням протягом 15 хвилин при 3000 g. Після видалення супернатанту осад клітин ресуспендували в охолодженому льодом 100 mM MgCl₂ і об'єднували в одну пляшку для центрифугування на 50 мл. Потім клітини промивали

охолодженим льодом 100 мМ MgCl₂ центрифугуванням протягом 15 хвилин при 2000 g. Осад ресуспендували в 50 мл охолодженого льодом 100 мМ CaCl₂ і витримували на льоду протягом 20 хвилин. Клітини центрифугували протягом 15 хвилин при 2000 g. Супернатант декантували, а осад ресуспендували в 50 мл крижаного 85 мМ CaCl₂, 15% гліцерину. Клітини центрифугували протягом 15 хвилин при 1000. Усі етапи центрифугування проводили при 4°C. Після декантації супернатанту осад ресуспендували в 2 мл охолодженого 85 мМ CaCl₂, 15% гліцерину, і суспензію розподіляли на аліквоти в 1,5 мл мікроцентрифужні пробірки та заморожували в рідкому азоті. Потім клітини зберігали при -80°C.

2.2.15 Трансформація електрокомпетентних клітин *E. coli*

Пробірки з електрокомпетентними клітинами *E. coli*, які зберігалися при -80 °C, розморожували на льоду. 20 мкл розморожених електрокомпетентних клітин змішували з 20 нг плазмідної ДНК та інкубували на льоду протягом 2 хвилин. Компетентні клітини потім додавали в охолоджену 1 мм кювету для електропорації, утворення бульбашок уникали, струшуючи пробірку. Кювету помістили в кюветну камеру електропоратора MicroPulser, і для електропорації клітин використовували бактеріальний протокол (1,8 кВ, 1 імпульс). Потім клітини негайно ресуспендували в 1 мл попередньо нагрітого середовища відновлення SOC (рН=6,9), переносили в стерильну пробірку для культивування та інкубували в шейкері-інкубаторі при 37°C і 220 об/хв протягом однієї години. Потім культуру розподіляли на селективні чашки з агаром LB та інкубували при 37°C протягом ночі.

2.2.16 Трансформація кальцій-компетентних клітин *E. coli*

Мікроцентрифужну пробірку на 1,5 мл, що містить 50 мкл кальцій-компетентних клітин *E. coli*, виймали з морозильника при -80°C і розморожували на льоду. 20 нг плазмідної ДНК додавали до 50 мкл кальцій-компетентних клітин *E. coli* та інкубували на льоду протягом 30 хвилин. Потім клітини нагрівали протягом 90 секунд при 42°C та інкубували на льоду протягом 2 хвилин. Після інкубації 500 мкл попередньо підігрітого середовища LB вносили в мікроцентрифужну пробірку і клітини витримували при 37°C протягом 45 хвилин для росту. Потім культуру розподіляли на селективні чашки з агаром LB та інкубували при 37°C протягом ночі.

2.2.17 Аналіз ефективності трансформації

Під час аналізу ефективності трансформації кальцій-компетентні клітини *E. coli* BL21DE3 трансформували стійкими до хлорамфеніколу плазмідами-мішенями, а також стійкими до ампіциліну плазмідами, що кодують одну з трьох вибраних керівних послідовностей CRISPR, або стійкими до ампіциліну нецільовими контрольними плазмідами. Були підготовлені електрокомпетентні клітини, що несуть як направляючі, так і цільові плазміди. Потім клітини трансформували стійкими до канаміцину плазмідами, що несуть послідовності систем типу IV, активність яких оцінювали. Було проведено шість етапів 10-кратного розведення з суспензіями трансформованих клітин, 5 мкл кожного розведення вносили піпеткою в селективне середовище, що містить хлорамфенікол, канаміцин та ампіцилін.

2.2.18 Статистичний аналіз

Значущість даних, отриманих під час аналізу твердіння плазмід, оцінювали за допомогою t-тесту, виконаного в GraphPad Prism.

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Конструкція вектора для еукаріотичної експресії CRISPR-Cas системи IV типу

Було зконструйовано вектор для експресії в еукаріотичних клітинах CRISPR-Cas системи IV типу. Плазмиду було змодельовано в програмі Benchling, білки системи були розташовані в послідовності що відповідає послідовності локуса системи дикого типу. ДНК послідовності прокаріотичних CRISPR-Cas білків були кодон-оптимізовані для експресії в еукаріотичних клітинах. Кодон-оптимізація була проведена щоб покращити склад кодонів рекомбінантного гена без зміни амінокислотної послідовності. Щоб оптимізувати експресію в еукаріотичному організмі, ми розробили та синтезували оптимізовані за кодонами версії білків Csf.

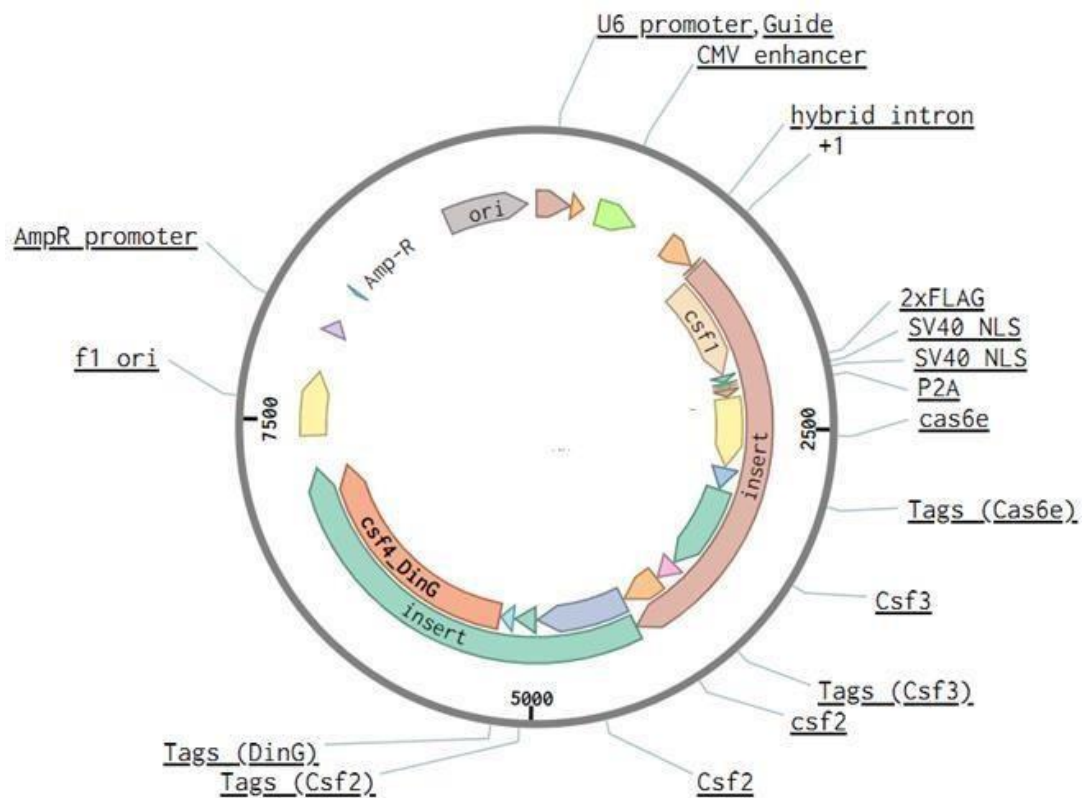


Рисунок 2.2.1.1 Карта еукаріотичного вектора експресії (9939 bp)

На С-термінальному кінці кожного білка було розташовано послідовність NLS, за якою слідував FLAG-тег. Послідовності NLS були необхідні для сприяння ядерному імпорту синтезованих і згорнутих білків назад у ядро. Використовували сигнали ядерної локалізації (NLS), отримані з антигену SV40 Т. Сигнали ядерної локалізації - це, як правило, короткі пептиди, які

діють як сигнальний фрагмент, що опосередковує транспортування білків із цитоплазми в ядро. NLS-залежне розпізнавання білків, процес, необхідний для білків-вантажів для проходження ядерної оболонки через комплекс ядерних пор. NLS великого Т-антигену SV40, використаний в даному дослідженні становить 126PKKKRKV132 з п'ятьма послідовними позитивно зарядженими амінокислотами (KKKRRK) [48].

Flag-tag - це широко використовуваний епітоп або пептидний тег, який не є похідним від природного білка. Flag-tag є штучним тегом, який на основі пептидної послідовності також називається DYKDDDDK-tag [49]. Мітка-прапорець на С-кінцевих кінцях кожного білка була використана для позначення білків Csf для застосувань захоплення та виявлення. У цьому дослідженні FLAG-мітки будуть згодом використані для аналізу Вестерн-блот, щоб визначити, чи експресуються білки в клітинах, а також їх стехіометрію.

Дослідження спрямоване на встановлення спільної експресії з однієї послідовності ДНК кількох білків в еукаріотичних клітинах. На відміну від прокариотів, в еукаріотів поліцистронна експресія зустрічається рідко, отже послідовності P2A були розташовані між послідовностями експресованих білків для розробки синтетичних поліцистронних мРНК. Під час трансляції цих пептидів рибосома зупиняється, пептидний ланцюг вивільняється, і рибосома відновлює трансляцію [50]. Таким чином, два незалежні поліпептидні ланцюги можуть бути закодовані з однієї мРНК, коли послідовність пептиду 2A розміщується між двома відкритими рамками зчитування.

Послідовності P2A, розташовані між двома цільовими генами, спричиняють «пропуск» рибосом під час трансляції, що призводить до відсутності пептидного зв'язку та фактичного роз'єднання двох білків. Головною перевагою P2A, завдяки якій його обрали, є його розмір — всього 19 амінокислот. З чотирьох широко використовуваних пептидів 2A (P2A, T2A, E2A і F2A) P2A, як правило, має найвищу ефективність розщеплення.

Послідовність-гайд була розташована в плазміді під контролем U6 промотора.

Послідовність Козака (gccaccatgg), послідовність, яка існує в мРНК еукаріот і відіграє важливу роль в ініціації трансляції була розташована після CMV енхансера. Рибосома може розпізнати цю послідовність на мРНК і

використовувати її як місце початку трансляції. [52] Послідовність Козака є оптимальною послідовністю для ініціації трансляції в еукаріотів.

Елементи, необхідні для експресії системи, були вставлені в плазмиду рХ330 для еукаріотичної експресії Cas9, що використовувалася в якості основи. Для введення в плазмиду рХ330 сайтів розпізнавання PIS ензиму для подальшої збірки за методом Golden Gate, а також для видалення послідовності Cas9 були проведені реакції ПЛР.

Через високий вміст GC (приблизно 60% основ є або цитозином (C), або гуаніном (G)) в окремих ділянках векторної плазмиди рХ330, під час конструкції вектора в послідовності рХ330 було виділено три фрагменти, довжиною 1.5 kb, 1.4 kb та 1.2 kb що були ПЛР ампліфіковані в окремих реакціях.

Послідовності ДНК, багаті GC, за своєю суттю більш стабільні, ніж послідовності з низьким вмістом GC. Для ПЛР це означає, що чим вищий вміст GC, тим вища температура плавлення ДНК. Праймери, які використовуються для ампліфікації GC-збагачених ділянок, мають тенденцію до утворення власних і перехресних димерів, а також структур стовбурової петлі (або шпильки), які можуть перешкоджати просуванню ДНК-полімерази вздовж молекули-матриці, що призводить до утворення урізаних продуктів ПЛР. [53]

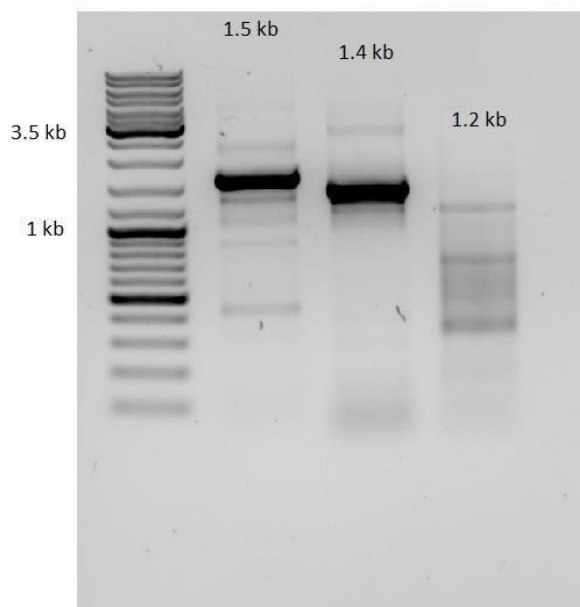


Рисунок. 3.1 Продукти трьох окремих реакцій ПЛР під час ампліфікації плазмиди рХ330.

Три фрагменти що було ампліфіковано окремо, були ліговані під час реакції Golden Gate.

Після конструювання плазміди та аналізу її методами ПЛР колоній та рестрикційного аналізу, було проведено секвенування. Секвенування послідовності вектора еукаріотичної експресії системи CRISPR-Cas IV типу вказало на відсутність значущих мутацій.

3.2 Конструювання плазміди-гайду із HHR послідовністю

Оскільки великою необхідністю є розробка мінімізованих систем для генної інженерії, була досліджена можливість видалення із системи CRISPR-Cas IV типу білку Casbe, що відповідає за розщеплення повторів пре-крРНК, забезпечуючи дозрівання кРНК під час стадії біогенезу, за рахунок використання плазміди-гайду, із спейсерною послідовністю, доповненою послідовністю HHR.

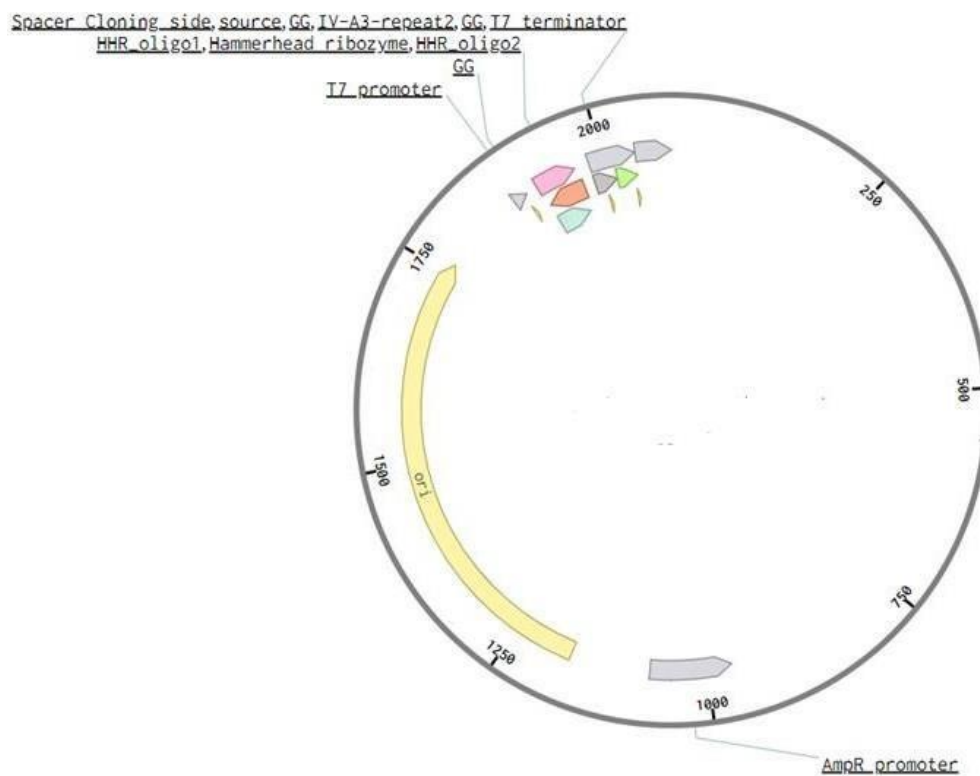


Рисунок 3.2.1 Загальний вигляд зконструйованої плазміди-гайду, що додатково несе послідовність HHR.

HHR — це невеликий мотив РНК, який саморозщеплюється в присутності йона двовалентного металу, зазвичай, Mg^{2+} , за специфічним фосфодіестерним зв'язком, утворюючи 2',3'-циклічний фосфат і 5'-гідроксильні кінці. HHR здатний до ендонуклеолітичного (само) розщеплення. Він складається з каталітичного ядра збережених нуклеотидів,

оточених трьома спіралями, дві з яких утворюють важливі третинні взаємодії для швидкого саморозщеплення за фізіологічних умов. [54]

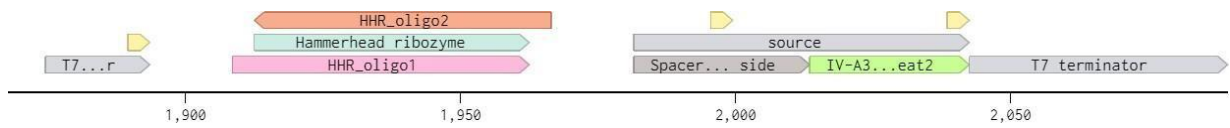


Рисунок 3.2.2 Локалізація послідовності HHR у гайд-плазміді

Ідея експерименту полягає в тому, щоб приєднати саморозщеплюваний рибозимовий модуль до кінця направляючої РНК, щоб створити касету рибозим-гРНК. Після транскрипції касети рибозим-гРНК направляюча РНК буде автоматично вивільнена з первинного транскрипту. HHR фрагмент був введений в плазмиду за допомогою протоколу Golden Gate.

Зконструйована плазмida має сайти розпізнавання Golden Gate, що дає можливість швидко замінювати спейсерні послідовності.

3.3 Конструювання плазмиди що несе мінімальну CRISPR-Cas систему IV типу

Для експериментів зі створення компактної, функціональної системи CRISPR-Cas IV що функціонує в клітинах *E.coli* було розроблено ряд векторів.

Для використання із направляючою плазмидою що містить HHR послідовність було сконструйовано мінімізовані варіації системи CRISPR-Cas IV типу. Було створено плазмиду що не усі білки IV типу, окрім Casbe та DinG.

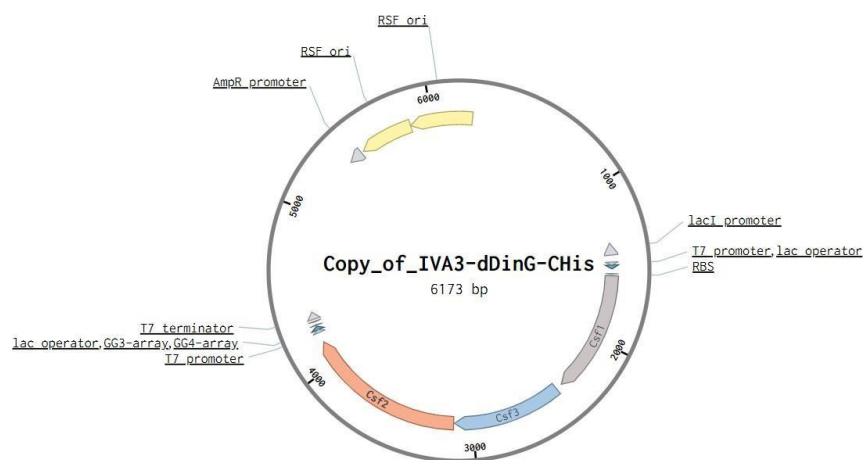


Рисунок 3.3.1 Загальний вигляд зконструйованої експресфійної плазмиди, що не несе ні Casbe та DinG

Також було створено плазмиду що не несе усі білки IV типу окрім Cas6e.

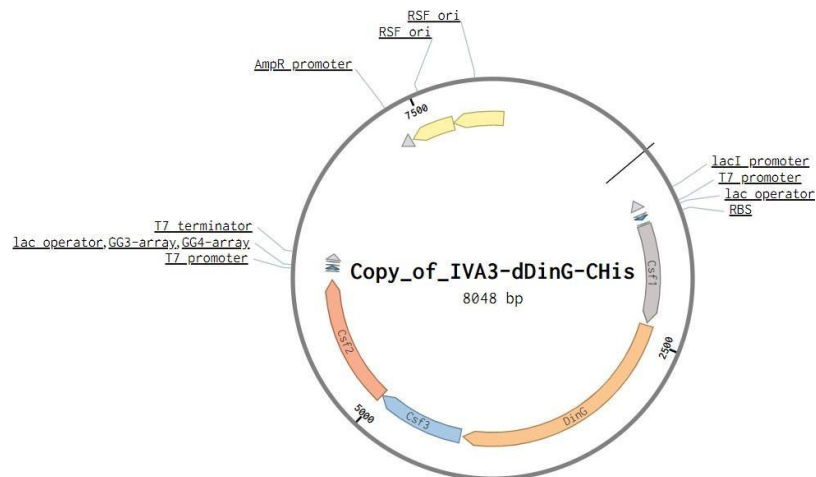


Рисунок 3.3.2 Загальний вигляд сконструйованої експресійної плазмиди, що не несе Cas6e

Також було створено плазмиду що не має С-кінцевої полігістидинової мітки, для перевірки наявності впливу полігістидинової мітки на активність системи CRISPR-Cas IV типу в клітинах.

3.4 Аналіз активності систем CRISPR-Cas IV типу

Plasmid curing – це процес усунення таких кодованих плазмідами функцій, як стійкість до антибіотиків, вірулентність, розкладання ароматичних сполук тощо в бактеріях. [55]

У цьому експерименті було створено метод, заснований на методі plasmid curing, для виявлення та кількісного аналізу активності варіантів системи типу IV, з кінцевою метою використання цього методу для визначення толерантності системи типу IV до додавання міток і видалення різноманітних білків.

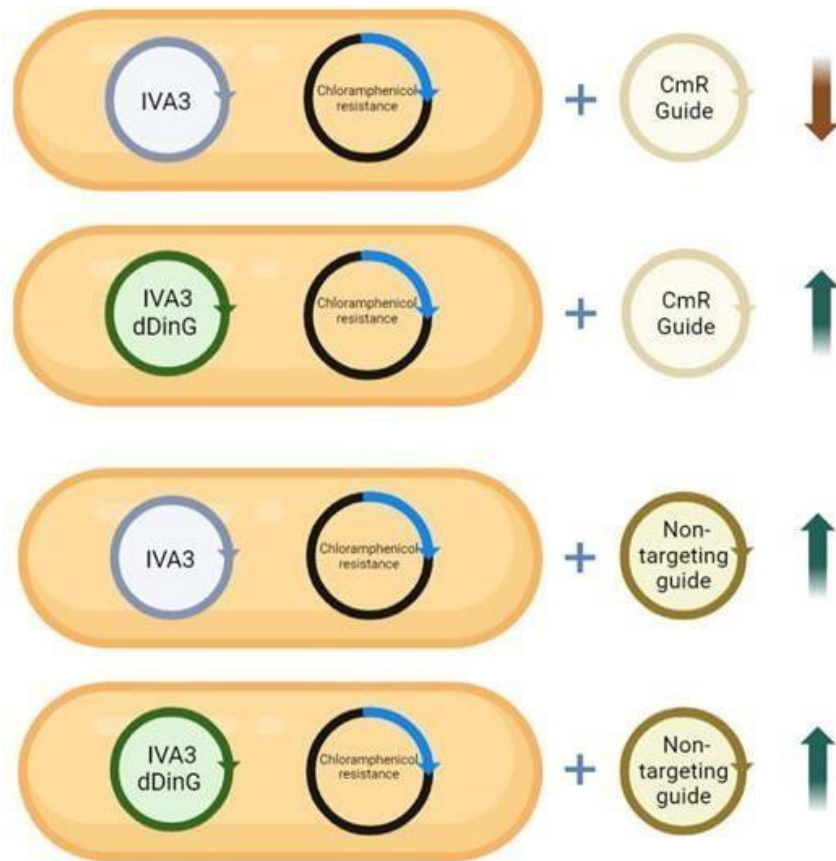


Рисунок 3.4.1 Дизайн експерименту.

Під час аналізу клітини *E. coli*, котрансформовані цільовими плазмідами, що несуть ген стійкості до хлорамфеніколу, і систему типу IV, що оцінюється, згодом трансформують направляючою плазмідною, що містить один із трьох спейсерів, комплементарних фрагментам стійкості до хлорамфеніколу, або ненацілену контрольну плазмідну та інокулюють у чашки із селективними середовищами, які містять хлорамфенікол та 0,05 мкл IPTG. Було виявлено, що IPTG спричиняє метаболічне навантаження на клітини, що перешкоджає їх росту. Завдяки негерметичному промотору T7 [56], транскрипція цільових білків відбувалася навіть за відсутності індуктора, отже в подальшому в селективне середовище додавалися лише антибіотики а IPTG не використовувався для активації експресії білкового комплексу.

Активність системи типу IV визначалась відповідно до кількості колоній, що утворювались в чашках Петрі із селективним середовищем після 12-годинної інкубації. Кількість колоній, значно нижча, ніж у контролі, свідчить про активність системи, що оцінюється. Кількість колоній, подібна до контрольної, показує, що система неактивна.

Кількість колонієутворюючих одиниць на нанограм трансформованої плазміди визначалась за кількістю колоній, що утворювались через 12 годин інкубації у найбільшому розведенні.

Для аналізу були встановлені позитивні та негативні контролі. Як позитивний контроль використовували систему IV типу дикого типу, що експресує всі необхідні білки.

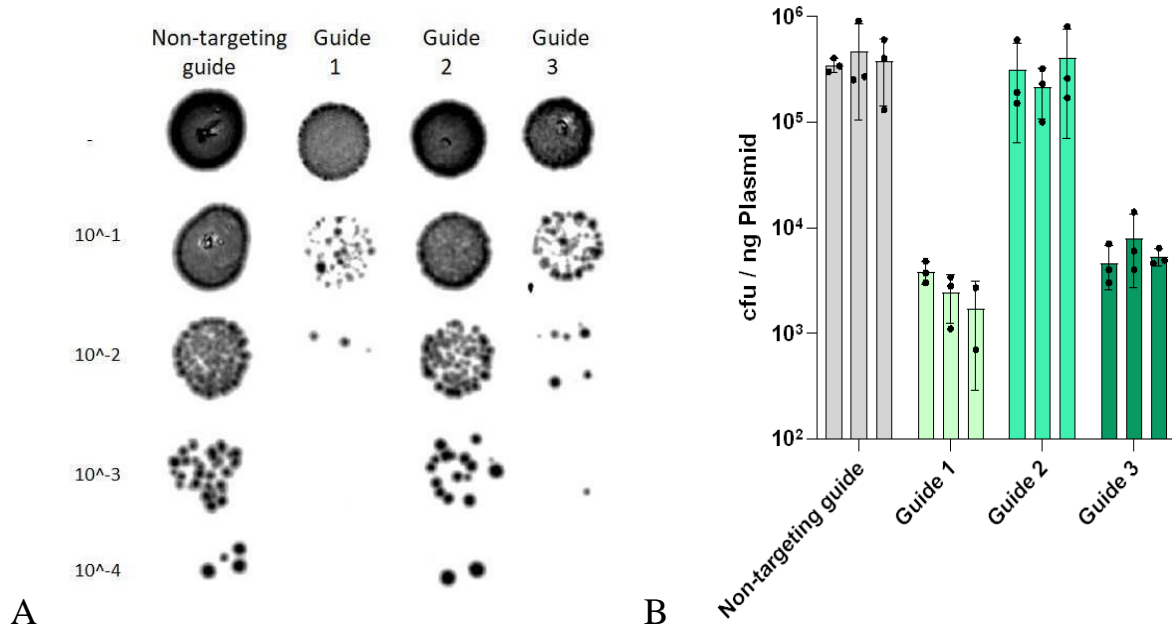


Рисунок 3.4.2. Результати аналізу системи CRISPR-Cas IV типу дикого типу. А. У клітинах після 12-годинної інкубації можна побачити, що напрямні 1 і 3 активні, тоді як напрямний 2 має ті самі результати, що й нецільовий контроль. В. Графік, який показує результати статистичного аналізу трьох технічних і трьох біологічних реплікатів, проведених для експерименту.

Як негативний контроль використовували систему типу IV, яка не експресує геліказу DinG.

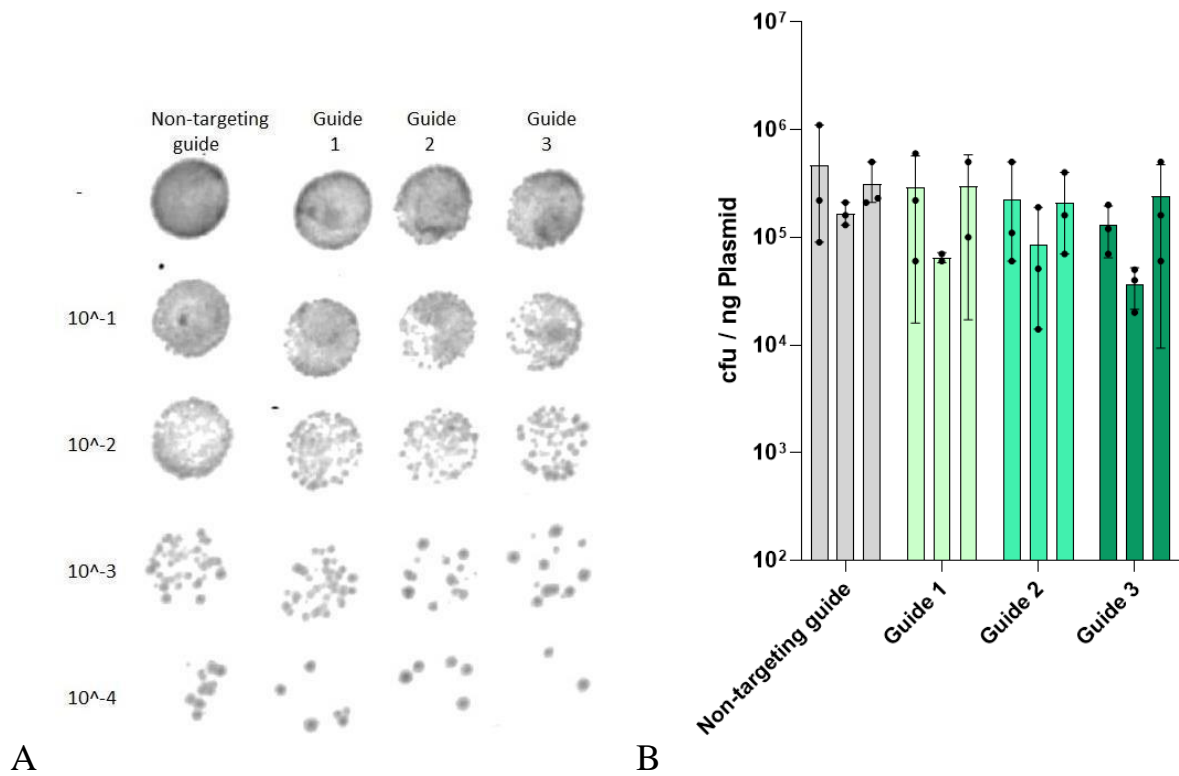


Рисунок 3.4.3. Результати аналізу системи CRISPR-Cas IV типу що не містить геліказу DinG. А. Клітини після 12 годин інкубації, В. Графік, який показує результати статистичного аналізу трьох технічних і трьох біологічних реплікатів, проведених для експерименту.

t-тест, проведений для оцінки значущості різниці між націленими напрямними та контролем, показав, що результати є статистично значущими. Було виявлено, що напрямні 1 і 3 демонструють значну, порівнянну активність, тоді як напрямний номер 2 показав результати, подібні до результатів контролю.

ВИСНОВКИ

В ході даного дослідження було додатково вивчено систему CRISPR-Cas IV типу, створено вектор для встановлення функціонування цієї системи в еукаріотичних клітинах. Гени CRISPR-Cas системи типу IV, оптимізовані для еукаріотичної експресії та містять послідовності NLS і послідовності саморозщеплюваних пептидів 2A, а також мітки, клоновані в плазміді, були отримані за допомогою таких методів, як дизайн плазмід в програмному забезпеченні Benchling, ПЛР та клонування Golden Gate.

Також було сконструйовано мінімальні системи CRISPR-Cas, розроблено метод визначення активності систем CRISPR-Cas IV типу.

В подальшому ми плануємо продовжити дослідження CRISPR-Cas системи IV типу, а саме проводити експресію білків системи в клітинах HEK293/T17 за допомогою сконструйованої під час дослідження плазмід. Експресія кожного гена буде виявлятися за допомогою вестерн-блоттингу в трансфікованій лінії клітин HEK293T. Також проводитиметься порівняння активності експериментального комплексу з добре охарактеризованим редактором Cas9 за допомогою RT-PCR.

ДЖЕРЕЛА

1. Makarova KS, Koonin EV. Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems. *Methods Mol Biol.* 2015;1311:47-75. doi: 10.1007/978-1-4939-2687-9_4. PMID: 25981466; PMCID: PMC5901762.
2. Kamruzzaman Muhammad, Iredell Jonathan R. CRISPR-Cas System in Antibiotic Resistance Plasmids in *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology* vol 10 2020 <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02934> doi: 10.3389/fmicb.2019.02934
3. Samuel H. Sternberg, Hagen Richter, Emmanuelle Charpentier, Udi Qimron, Adaptation in CRISPR-Cas Systems. *Molecular Cell*, Volume 61, Issue 6, 2016, Pages 797-808, ISSN 1097 2765, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.030>.
4. Adrian G Patterson, Mariya S Yevstigneyeva, Peter C Fineran, Regulation of CRISPR–Cas adaptive immune systems, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 37, 2017, Pages 1-7, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.02.004>.
5. Anaïs Le Rhun, Andrés Escalera-Maurer, Majda Bratovič & Emmanuelle Charpentier (2019) CRISPR-Cas in *Streptococcus pyogenes*, *RNA Biology*, 16:4, 380-389, DOI: 10.1080/15476286.2019.1582974
6. Koonin EV, Makarova KS. Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2019 May 13;374(1772):20180087. doi: 10.1098/rstb.2018.0087. PMID: 30905284; PMCID: PMC6452270.
7. Globyte, Viktorija, Lee, Seung Hwan, Bae, Taegeun, Kim, Jin-Soo, Joo, Chirlmin “CRISPR/Cas9 searches for a protospacer adjacent motif by lateral diffusion” *The EMBO Journal* vol. 38 is 4 SN 0261-4189 <https://doi.org/10.15252/embj.201899466>
8. Yan Zeng, Yang Cui, Yong Zhang, Yanruo Zhang, Meng Liang, Hui Chen, Jie Lan, Guangtao Song, Jizhong Lou, The initiation, propagation and dynamics of CRISPR-SpyCas9 R-loop complex, *Nucleic Acids Research*, Volume 46, Issue 1, 9 January 2018, Pages 350–361, <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1117>
9. Eugene V Koonin, Kira S Makarova, Feng Zhang, “Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems”, *Current Opinion in Microbiology*, Volume 37, 2017, Pages 67-78, ISSN 1369-5274, <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>.
10. Liu TY, Doudna JA. Chemistry of Class 1 CRISPR-Cas effectors: Binding, editing, and regulation. *J Biol Chem.* 2020 Oct 16;295(42):14473-14487. doi:

10.1074/jbc.REV120.007034. Epub 2020 Aug 14. PMID: 32817336; PMCID: PMC7573268.

11. Yanli Zheng, Jie Li, Baiyang Wang, Jiamei Han, Yile Hao, Shengchen Wang, Xiangdong Ma, Shihui Yang, Lixin Ma, Li Yi and Wenfang Peng “Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering”, *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 2020, vol. 8
12. Jackson RN, Lavin M, Carter J, Wiedenheft B. Fitting CRISPR-associated Cas3 into the helicase family tree. *Curr Opin Struct Biol.* 2014 Feb;24:106-14. doi: 10.1016/j.sbi.2014.01.001. Epub 2014 Jan 28. PMID: 24480304; PMCID: PMC3984625.
13. Pickar-Oliver, A., Black, J.B., Lewis, M.M. et al. Targeted transcriptional modulation with type I CRISPR–Cas systems in human cells. *Nat Biotechnol* 37, 1493–1501 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0235-7>
14. Ning Jia, Charlie Y. Mo, Chongyuan Wang, Edward T. Eng, Luciano A. Marraffini, Dinshaw J. Patel, “Type III-A CRISPR-Cas Csm Complexes: Assembly, Periodic RNA Cleavage, DNase Activity Regulation, and Autoimmunity”, *Molecular Cell*, Volume 73, Issue 2, 2019, Pages 264-277.e5, ISSN 1097-2765, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.007>.
15. Shmakov, S., Smargon, A., Scott, D. et al. Diversity and evolution of class 2 CRISPR–Cas systems. *Nat Rev Microbiol* 15, 169–182 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>
16. Hannah N. Taylor, Emily E. Warner, Matthew J. Armbrust, Valerie M. Crowley, Keith J. Olsen & Ryan N. Jackson (2019) Structural basis of Type IV CRISPR RNA biogenesis by a Cas6 endoribonuclease, *RNA Biology*, 16:10, 1438-1447, DOI: 10.1080/15476286.2019.1634965
17. Valerie M. Crowley, Adam Catching, Hannah N. Taylor, Adair L. Borges, Josie Metcalf, Joseph Bondy-Denomy, and Ryan N. Jackson “A Type IV-A CRISPR-Cas System in *Pseudomonas aeruginosa* Mediates RNA-Guided Plasmid Interference In Vivo” *The CRISPR Journal* 2019 2:6, 434-440
18. Koonin, Eugene V., Kira S. Makarova, and Feng Zhang. "Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems." *Current opinion in microbiology* 37 (2017): 67-78.
19. Taylor Hannah N., Laderman Eric, Armbrust Matt, Hallmark Thomson, Keiser Dylan, Bondy-Denomy Joseph, Jackson Ryan N. Positioning Diverse Type IV

20. Özcan, A., Pausch, P., Linden, A. et al. Type IV CRISPR RNA processing and effector complex formation in *Aromatoleum aromaticum*. *Nat Microbiol* 4, 89–96 (2019).
21. Bernheim, Aude, et al. "Atypical organizations and epistatic interactions of CRISPRs and cas clusters in genomes and their mobile genetic elements." *Nucleic acids research* 48.2 (2020): 748-760.
22. Pinilla-Redondo, Rafael, et al. "Type IV CRISPR–Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids." *Nucleic acids research* 48.4 (2020): 2000-2012.
23. Makarova, Kira S., et al. "Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants." *Nature Reviews Microbiology* 18.2 (2020): 67-83.
24. Khan SH. Genome-Editing Technologies: Concept, Pros, and Cons of Various Genome-Editing Techniques and Bioethical Concerns for Clinical Application. *Mol Ther Nucleic Acids*. 2019 Jun 7;16:326-334. doi: 10.1016/j.omtn.2019.02.027. Epub 2019 Apr 3. PMID: 30965277; PMCID: PMC6454098.
25. Asmamaw M, Zawdie B. Mechanism and Applications of CRISPR/Cas-9-Mediated Genome Editing. *Biologics*. 2021 Aug 21;15:353-361. doi: 10.2147/BTT.S326422. PMID: 34456559; PMCID: PMC8388126.
26. Hakim Manghwar, Keith Lindsey, Xianlong Zhang, Shuangxia Jin, CRISPR/Cas System: Recent Advances and Future Prospects for Genome Editing, *Trends in Plant Science*, Volume 24, Issue 12, 2019, Pages 1102-1125, ISSN 1360-1385, <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2019.09.006>.
27. Adli M. The CRISPR tool kit for genome editing and beyond. *Nat Commun*. 2018 May 15;9(1):1911. doi: 10.1038/s41467-018-04252-2. PMID: 29765029; PMCID: PMC5953931.
28. Fellmann, C., Gowen, B., Lin, PC. et al. Cornerstones of CRISPR–Cas in drug discovery and therapy. *Nat Rev Drug Discov* 16, 89–100 (2017). <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.238>

29. Heidenreich, M., Zhang, F. Applications of CRISPR–Cas systems in neuroscience. *Nat Rev Neurosci* 17, 36–44 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrn.2015.2>
30. Zhang D, Zhang Z, Unver T, Zhang B. CRISPR/Cas: A powerful tool for gene function study and crop improvement. *J Adv Res.* 2020 Oct 21;29:207-221. doi: 10.1016/j.jare.2020.10.003. PMID: 33842017; PMCID: PMC8020163.
31. Wu X, Kriz AJ, Sharp PA. Target specificity of the CRISPR-Cas9 system. *Quant Biol.* 2014 Jun;2(2):59-70. doi: 10.1007/s40484-014-0030-x. PMID: 25722925; PMCID: PMC4338555.
32. Brezgin S, Kostyusheva A, Kostyushev D, Chulanov V. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 30;20(23):6041. doi: 10.3390/ijms20236041. PMID: 31801211; PMCID: PMC6929090.
33. Gangopadhyay SA, Cox KJ, Manna D, Lim D, Maji B, Zhou Q, Choudhary A. Precision Control of CRISPR-Cas9 Using Small Molecules and Light. *Biochemistry.* 2019 Jan 29;58(4):234-244. doi: 10.1021/acs.biochem.8b01202. Epub 2019 Jan 22. PMID: 30640437; PMCID: PMC6586488.
34. Goell JH, Hilton IB. CRISPR/Cas-Based Epigenome Editing: Advances, Applications, and Clinical Utility. *Trends Biotechnol.* 2021 Jul;39(7):678-691. doi: 10.1016/j.tibtech.2020.10.012. Epub 2021 May 7. PMID: 33972106.
35. Thakore PI, Black JB, Hilton IB, Gersbach CA. Editing the epigenome: technologies for programmable transcription and epigenetic modulation. *Nat Methods.* 2016 Feb;13(2):127-37. doi: 10.1038/nmeth.3733. PMID: 26820547; PMCID: PMC4922638.
36. Brezgin S, Kostyusheva A, Kostyushev D, Chulanov V. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications. *Int J Mol Sci.* 2019 Nov 30;20(23):6041. doi: 10.3390/ijms20236041. PMID: 31801211; PMCID: PMC6929090.
37. Casas-Mollano JA, Zinselmeier MH, Erickson SE, Smanski MJ. CRISPR-Cas Activators for Engineering Gene Expression in Higher Eukaryotes. *CRISPR J.* 2020 Oct;3(5):350-364. doi: 10.1089/crispr.2020.0064. PMID: 33095045; PMCID: PMC7580621.
38. Larson MH, Gilbert LA, Wang X, Lim WA, Weissman JS, Qi LS. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression. *Nat Protoc.* 2013 Nov;8(11):2180-96. doi: 10.1038/nprot.2013.132. Epub 2013 Oct 17. PMID: 24136345; PMCID: PMC3922765.

39. Anton T, Bultmann S. Site-specific recruitment of epigenetic factors with a modular CRISPR/Cas system. *Nucleus*. 2017 May 4;8(3):279-286. doi: 10.1080/19491034.2017.1292194. Epub 2017 Feb 23. PMID: 28448738; PMCID: PMC5499900.
40. Enríquez P. CRISPR-Mediated Epigenome Editing. *Yale J Biol Med*. 2016 Dec 23;89(4):471-486. PMID: 28018139; PMCID: PMC5168826.
41. Ding L, Schmitt LT, Brux M, Sürün D, Augsburg M, Lansing F, Mircetic J, Theis M, Buchholz F. DNA methylation-independent long-term epigenetic silencing with dCRISPR/Cas9 fusion proteins. *Life Sci Alliance*. 2022 Mar 14;5(6):e202101321. doi: 10.26508/lsa.202101321. PMID: 35288457; PMCID: PMC8921183.
42. Lara Marrone, Paolo M. Marchi & Mimoun Azzouz (2022) Circumventing the packaging limit of AAV-mediated gene replacement therapy for neurological disorders, *Expert Opinion on Biological Therapy*, 22:9, 1163-1176, DOI: 10.1080/14712598.2022.2012148
43. Matthew Nitzahn, Gabriella Allegri, Suhail Khoja, Brian Truong, Georgios Makris, Johannes Häberle, Gerald S. Lipshutz, Split AAV-Mediated Gene Therapy Restores Ureagenesis in a Murine Model of Carbamoyl Phosphate Synthetase 1 Deficiency, *Molecular Therapy*, Volume 28, Issue 7, 2020, Pages 1717-1730, ISSN 1525-0016, <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2020.04.011>.
44. pX330-U6-Chimeric_BB-CBh-hSpCas9 was a gift from Feng Zhang (Addgene plasmid # 42230 ; <http://n2t.net/addgene:42230> ; RRID:Addgene_42230)
45. Lee ME, DeLoache WC, Cervantes B, Dueber JE. A Highly Characterized Yeast Toolkit for Modular, Multipart Assembly. *ACS Synth Biol*. 2015 Sep 18;4(9):975-86. doi: 10.1021/sb500366v. Epub 2015 May 1. PMID: 25871405.
46. Marillonnet, S., & Grütznér, R. (2020). Synthetic DNA assembly using golden gate cloning and the hierarchical modular cloning pipeline. *Current Protocols in Molecular Biology*, 130, e115. doi: 10.1002/cpmb.115
47. F. Greber, Harumi Kasamatsu, Nuclear targeting of SV40 and adenovirus, *Trends in Cell Biology*, Volume 6, Issue 5, 1996, Pages 189-195, ISSN 0962-8924, [https://doi.org/10.1016/0962-8924\(96\)10016-7](https://doi.org/10.1016/0962-8924(96)10016-7).
48. A. Einhauer, A. Jungbauer, The FLAG™ peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins, *Journal of Biochemical and Biophysical*

Methods, Volume 49, Issues 1–3, 2001, Pages 455-465, ISSN 0165-022X, [https://doi.org/10.1016/S0165-022X\(01\)00213-5](https://doi.org/10.1016/S0165-022X(01)00213-5).

49. Liu, Z., Chen, O., Wall, J.B.J. et al. Systematic comparison of 2A peptides for cloning multi-genes in a polycistronic vector. *Sci Rep* 7, 2193 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02460-2>

50. Kandaswamy R, McQuillin A, Sharp SI, et al. Genetic Association, Mutation Screening, and Functional Analysis of a Kozak Sequence Variant in the Metabotropic Glutamate Receptor 3 Gene in Bipolar Disorder. *JAMA Psychiatry*. 2013;70(6):591–598. doi:10.1001/jamapsychiatry.2013.38

51. T.G. Mamedov, E. Pienaar, S.E. Whitney, J.R. TerMaat, G. Carvill, R. Goliath, A. Subramanian, H.J. Viljoen, A fundamental study of the PCR amplification of GC-rich DNA templates, *Computational Biology and Chemistry*, Volume 32, Issue 6, 2008, Pages 452-457, ISSN 1476-9271, <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2008.07.021>.

52. Pley, H., Flaherty, K. & McKay, D. Three-dimensional structure of a hammerhead ribozyme. *Nature* 372, 68–74 (1994). <https://doi.org/10.1038/372068a0>

53. J.T. Trevors, Plasmid curing in bacteria, *FEMS Microbiology Reviews*, Volume 1, Issue 3-4, April 1986, Pages 149–157, <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01189.x>

54. Mertens, N., Remaut, E. & Fiers, W. Tight Transcriptional Control Mechanism Ensures Stable High-Level Expression from T7 Promoter-Based Expression Plasmids. *Nat Biotechnol* 13, 175–179 (1995). <https://doi.org/10.1038/nbt0295-175>