

Міністерство освіти і науки України  
Національний університет «Києво-Могилянська академія»

Факультет природничих наук

Кафедра біології

**Кваліфікаційна робота**  
освітній ступінь - бакалавр

на тему «**СТВОРЕННЯ БІБЛІОТЕКИ гРНК, ЩО ЗАДІЯНІ У  
АКТИВАЦІЇ ЕКСПРЕСІЇ ГЕНІВ КАРДІОГЕНЕЗУ ЛЮДИНИ CRISPRa  
СИСТЕМОЮ**»

Виконала: студентка 4-го року навчання  
спеціальність 091 — біологія  
**Скляренко Юлія Валеріївна**

Керівники:

Півень Оксана Олександрівна, д.б.н.,  
провідний науковий співробітник відділу  
генетики людини  
Інституту молекулярної біології і  
генетики НАНУ

Наваліхіна А.Г., асистент кафедри біології  
НаУКМА

Рецензент Досенко Віктор Євгенович,  
д.м.н., професор, завідувач відділу  
загальної та молекулярної патофізіології  
Інституту фізіології ім. О.О.Богомольця  
НАН України

Кваліфікаційну роботу захищено  
з оцінкою \_\_\_\_\_

Секретар ЕК \_\_\_\_\_

Пасічник Т.В.

«\_\_\_\_» червня 2020 року

Київ – 2020

## ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ.....	4
ВСТУП .....	5
РОЗДІЛ 1 .....	7
ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .....	7
1.1. CRISPR-Cas система - сучасна платформа для розвитку синтетичної біології .....	7
1.1.1. Відкриття CRISPR у бактерій та архей. ....	7
1.1.2. Сучасна класифікація систем CRISPR/Cas: типи Cas білків та підтипи CRISPR, загальний молекулярний механізм роботи системи.....	10
1.2. Варіанти CRISPR системи для активації експресії генів, що створені на основі мутованого Cas9: будова, переваги, механізми дії та застосування у активації експресії генів .....	15
1.2.1. CRISPR/Cas9 система II типу: основний інструмент для редагування геномів. ....	15
1.2.2. CRISPRa, як модифікація системи CRISPR/Cas9. ....	17
1.3. Перепрограмування клітин - перспективна стратегія регенеративної медицини .....	21
РОЗДІЛ 2 .....	28
ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	28
2.1. Характеристика об'єкту дослідження .....	28
2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі .....	28
2.2.5. Обладнання та витратні матеріали. ....	30
2.3. Біологічні об'єкти, які були використанні у дослідженні.....	30
2.5. Клонування спейсерних послідовностей онРНК .....	32
2.5.1. Розведення ліофілізованих одноланцюгових олігонуклеотидів та приготування робочих розчинів. ....	32
2.5.2. Фосфорилування дволанцюгової послідовності онРНК. ....	32
2.5.3. Розрізання плазмідного вектору Cas9sgRNA за сайтами рестрикції. ....	33
2.5.4. Гель-електрофорез для перевірки лінеаризації вектору Cas9sgRNA, його елюція та очищення. ....	34
2.5.5. Вставка спейсерної послідовності онРНК до плазмідного вектору Cas9sgRNA. ....	35

2.6. Трансформація компетентних клітин <i>E. coli</i> плазмідним вектором Cas9gRNA зі спейсерною послідовністю онРНК .....	35
2.6.1. Приготування компетентних клітин.....	35
2.6.2. Приготування хімічно компетентних клітин <i>E. Coli</i> XL10-Gold та Top10.....	36
2.6.4. Трансформація компетентних клітин методом теплового шоку. ....	38
2.7. Виділення плазмідної ДНК, аналіз отриманої конструкції з вбудованими послідовностями онРНК .....	38
2.7.1. Виділення плазмідної ДНК. ....	39
2.7.2. Аналізуючий рестрикційний аналіз виділеної плазмідної ДНК та гель-електрофорез отриманих зразків.....	39
2.7.3. Визначення нуклеотидних послідовностей. ....	40
РОЗДІЛ 3 .....	41
РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ.....	41
3.1. Біонформатичний аналіз кандидатів спейсерних послідовностей онРНК, що можуть бути використані для активації експресії генів кардіогенезу людини.....	41
3.2. Вставка спейсерних послідовностей онРНК у вектор експресії Cas9sgRNA .....	46
3.2.1. Трансформація клітин <i>E.coli</i> векторною конструкцією зі вставкою протоспейсерної послідовності онРНК до гену Tbx5.....	46
УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ.....	50
ВИСНОВКИ.....	54
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	55
ДОДАТКИ.....	61

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

гРНК	–	гайдова РНК (single guided RNA, sgRNA)
ДЛР	–	дволанцюговий розрив
кДНК	–	комплементарна ДНК
крРНК	–	CRISPR РНК (CRISPR RNA, crRNA)
міРНК	–	мікро РНК
онРНК	–	одиночна направляюча РНК (single guided RNA, sgRNA)
п.н.	–	пар нуклеотидів
пре-крРНК	–	прекурсорна CRISPR РНК (precursor CRISPR RNA, pre - crRNA)
тракрРНК	–	транс-активуюча крРНК (trans-activating crRNA, tracrRNA)
Cas	–	білки, асоційовані з CRISPR (CRISPR-associated proteins)
CRISPR	–	короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats)
CRISPRi	–	CRISPR інтерференція (CRISPR interference)
CRISPRa	–	CRISPR активація (CRISPR activation)
dCas9	–	Cas9, позбавлений нуклеазної активності (dead Cas9)
GMT	–	комбінація транскрипційних факторів Gata4, Mef2c та Tbx5
iPSCs	–	індуковані плюрипотентні стовбурові клітини (induced Pluripotent Stem Cells, iPSCs)
PAM	–	послідовність, прилегла до протоспейсеру (Protospacer Adjacent Motif, PAM)
SAM	–	синергічний медіатор активації (Synergistic Activation Mediator, SAM)
TSS	–	сайт старту транскрипції (Transcription Start Site, TSS)
VPR	–	генетично поєднані між собою домени активації VP64, p65, Rta
<i>E.</i>	–	<i>Escherichia</i>
<i>H.</i>	–	<i>Haloferax</i>

## ВСТУП

Поширеність патологій серцево-судинної системи, висока летальність та інвалідизація працездатної частини населення, що спричиняє ця група захворювань, спонукає вчених до постійного пошуку нових, ефективних методів регенерації пошкоджених тканин серця за умов *in vivo* та *in vitro* [1]. Загальна ситуація тяжкості протікання захворювань серця погіршується і особливостями кардіоміоцитів, а саме низькою здатністю серцевих клітин до самовідновлення. Найбільш поширеним серцево-судинним захворюванням є інфаркт міокарда, внаслідок якого відбувається фіброзне заміщення функціональних кардіоміоцитів на кардіальні фібробласти в зоні ураження серця [2]. Така заміна робочих клітин серця на клітини сполучної тканини, врешті решт, негативно впливає на гемодинамічні показники органу, що був уражений.

Серед багатьох, створених на сьогоднішній день, медикаментозних терапевтичних підходів та сучасних методів клітинної терапії – жоден не є досконалим. Тож, все більшу увагу вчених та медиків привертають альтернативні стратегії регенерації міокарду, що створюються на ґрунті методів та можливостей клітинної біології. Для отримання кардіоміоцитів *de novo*, наразі існує декілька стратегій, серед яких: індукція плюрипотентних стовбурових клітин з наступним перепрограмуванням в кардіоміоцити та пряма клітинна трансдиференціація [3]. Пряме перепрограмування рубцевої фіброзної тканини в кардіоміоцити, безпосередньо в зоні інфаркту є перспективною стратегією регенерації серцево - судинної системи яка дозволяє уникнути деяких побічних ефектів, що мають місце при застосуванні стовбурових клітин, а саме: аритмії, пошкодження міокарда, інфекцій або імунологічних реакцій несумісності [4].

Протягом останніх десятиліть було розроблено декілька методів трансдиференціації. Одні з них використовують: модифікації експресії факторів транскрипції чи регуляторних міРНК, інші – CRISPR послідовності з

модифікованим білком dCas9 – для генетичного та епігенетичного перепрограмування клітин. Система CRISPR активації (CRISPRa), є модифікацією CRISPR/Cas9 системи, вона є ще одним новітнім підходом для прямого перепрограмування фібробластів у кардіоміоцити. Система здійснює перепрограмування через активацію експресії власних генів клітини – кардіальних транскрипційних факторів. Застосування CRISPRa системи дає змогу досягти бажаного ефекту без внесення екзогенного генетичного матеріалу та без внесення змін у первинну структуру ДНК, що робить їх досить перспективними та потенційно безпечними для клінічного застосування.

З огляду на вищевикладене, метою роботи були підбір, валідація та створення бібліотеки одиночних направляючих РНК, що задіяні у активації експресії основних генів кардіогенезу людини CRISPRa системою.

Відповідно до мети були поставлені наступні завдання:

- 1) на підставі узагальнення літературних даних вибрати композиції кардіальних генів, активації яких достатньо для перепрограмування фібробластів у кардіоміоцити;
- 2) провести біоінформатичний аналіз послідовностей генів кардіогенезу людини та підібрати комплементарні, до їхніх промоторних ділянок послідовності одиночних направляючих РНК;
- 3) методами біоінформатичного аналізу перевірити потенційну ефективність та специфічність зв'язування відібраних направляючих послідовностей з цільовими ділянками генів-мішеней;
- 4) вбудувати синтезовані олігонуклеотидні послідовності онРНК у вектор експресії;
- 5) проаналізувати ефективність інсерції дослідних послідовностей онРНК;
- 6) створити бібліотеки індивідуальних онРНК для подальшого перепрограмування фібробластів у кардіоміоцити шляхом активації експресії генів кардіогенезу людини з використанням CRISPRa системи.

## РОЗДІЛ 1

### ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

#### 1.1. CRISPR-Cas система - сучасна платформа для розвитку синтетичної біології

**1.1.1. Відкриття CRISPR у бактерій та архей.** Послідовності CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat, CRISPR – короткі паліндромні повтори, регулярно розташовані групами) разом з білками Cas (CRISPR-associated proteins – білки, асоційовані з CRISPR) є адаптивною антивірусною імунною системою, яка присутня у більшості архей та бактерій, що функціонує за принципом самозабезпечення [5-7].

Повтори CRISPR були вперше виявлені Ishino et al. в 1987 році випадково, при визначенні послідовностей генів, що кодують ізозим лужної фосфатази в геномі *Escherichia coli* [8]. У архей, CRISPR повтори вперше були ідентифіковані в 1993 році, коли Mojica et al. [9] досліджували вплив солоності на ріст *Haloferax medmediatei*, та помітили послідовність ДНК у їхньому геномі, яка містила регулярно розташовані повтори. Знайдені повторювані послідовності в геномах *H. medmediatei* та *E.coli* подібними не були. Аналізи послідовностей ДНК багатьох видів архей та бактерій показали наявність цих незвичайних повторюваних структур у багатьох прокариотів – приблизно у 48% бактерій та 90% архей [8,10,11]. Грампозитивні та грамнегативні бактерії, у яких були ідентифіковані CRISPR повтори наведені у табл.1.1 [12,13].

Таблиця 1.1

Перелік прокариотичних організмів, в геномі яких присутні CRISPR  
повтори

Група мікроорганізмів	Види
Грампозитивні бактерії	<i>Enterococcus spp.</i>
	<i>Streptococcus thermophilus</i>

Продовження табл.1.1

	<i>Streptococcus pneumoniae</i>
	<i>Streptococcus pyogenes</i>
	<i>Clostridium difficile</i>
	<i>Lactobacillus buchneri</i>
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>
	<i>Listeria monocytogenes</i>
	<i>Corynebacterium diphtheria</i>
Грамнегативні бактерії	<i>Campylobacter spp.</i>
	<i>Yersinia spp.</i>
	<i>Escherichia coli</i>
	<i>Salmonella enterica</i>
	<i>Shigella</i>
	<i>Klebsiella pneumonia</i>
Археї	<i>Haloferax medmediatei</i>
	<i>Metallosphaera sedula</i>
	<i>Aciduliprofundum boonei</i>
	<i>Methanocaldococcus spp.</i>
	<i>Methanopyrus kandleri sp.</i>
	<i>Mathanothermococcus okinawensis</i>
	<i>Thermococcus barophilus</i>
	<i>Thermococcus gammatolerans</i>

Функції CRISPR повторів залишалися невідомими протягом 20 років після їхнього відкриття. Протягом цього часу, регулярним повторюваним послідовностям було присвоєно декілька назв: «багаторазові прямі повтори», «короткі регулярно розташовані повтори» та «великі скупчення тандемних повторів»[8]. У 2002 році номенклатура геномних локусів, які складаються з повторюваних масивів, була уніфікована авторами Jansen et al. як CRISPR - Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats [8].



Ключове розуміння можливої ролі коротких паліндромних повторів було отримано у 2005 році, завдяки спостереженням, що багато спейсерних послідовностей в рамках CRISPR масиву є вірусного або плазмідного походження [9]. Коли стало відомо, що локуси CRISPR транскрибуються, а гени Cas, які є асоційованими з CRISPR і кодують білки з передбачуваними нуклеазними та хеліказними активностями, було запропоновано, що CRISPR/Cas – є адаптивною активною імунною системою прокариотів проти вірусної реплікації та кон'югативних елементів. В якості «пам'яті» про минулі вторгнення чужорідної нуклеїнової кислоти виступають антисенсові CRISPR РНК (крРНК), які є орієнтирами в комплексі з білками Cas [6,8]. У 2011 році Makarova et al. [14] запропонували першу класифікацію системи CRISPR/Cas, що ґрунтувалась на філогенії та наявності певних білків Cas. У 2012 році, завдяки співпраці Charpentier та Doudna [7], було досягнуто спрощення системи CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* шляхом заміни тракрРНК та крРНК на синтетичну єдину гайдову або направляючу РНК (ґРНК, single guide RNA), щоб орієнтувати Cas9 до цільової послідовності ДНК та здійснити її розщеплення [7]. Нарешті, у 2013 році років було показано, що молекулярні механізми CRISPR/Cas9 системи (тип II, *Streptococcus pyogenes*) можуть бути «запрограмовані» для утворення дволанцюгових розривів молекули ДНК (ДЛР) та застосовані для редагування геному. Окрім «молекулярних ножиць», на ґрунті мутованої Cas9, що втратила свою нуклеазну активність (dCas9), були створені інструменти для спрямованої зміни транскрипції генів [5]. Іронічно, що хоча системи CRISPR/Cas були адаптовані в якості технології редагування геному, самі по собі, короткі регулярно розташовані паліндромні повтори у створених молекулярних інструментах - відсутні. Для розпізнавання та націлювання на бажану нуклеотидну послідовність використовують одноланцюгові направляючі РНК у комплексі з нуклеазами, як, наприклад, Cas9 [15]. До того ж, хоч CRISPR/Cas системи сприймаються як інструменти редагування геному, білки Cas, з нуклеазними активностями, просто розрізають ДНК, а

фактичне редагування відбувається завдяки ендогенним клітинним шляхам репарації [6]. Наукова спільнота швидко та широко сприйняла цю технологію для осмисленої та раціональної модифікації геномів.

**1.1.2. Сучасна класифікація систем CRISPR/Cas: типи Cas білків та підтипи CRISPR, загальний молекулярний механізм роботи системи.** CRISPR/Cas системи, які наразі є одними з основних інструментів генної інженерії нового покоління, в природі функціонують в якості адаптивних імунних механізмів прокаріотів. Загальний механізм імунної відповіді прокаріотів за допомогою CRISPR/Cas систем представлений на рис. 1.1 та складається з трьох основних етапів [10,11]:

1) адаптації або інтеграції спейсерної (CRISPR) послідовності в геном бактерії;

2) експресії або процесингу первинних транскриптів CRISPR локусу (пре-крРНК) та «дозрівання» крРНК, які фактично є спейсерними послідовностями, що відповідають 5' та 3' фрагментам CRISPR повторів;

3) інтерференції ДНК або приєднання комплексу крРНК з Cas білком/ами до комплементарних протоспейсерам послідовностям.

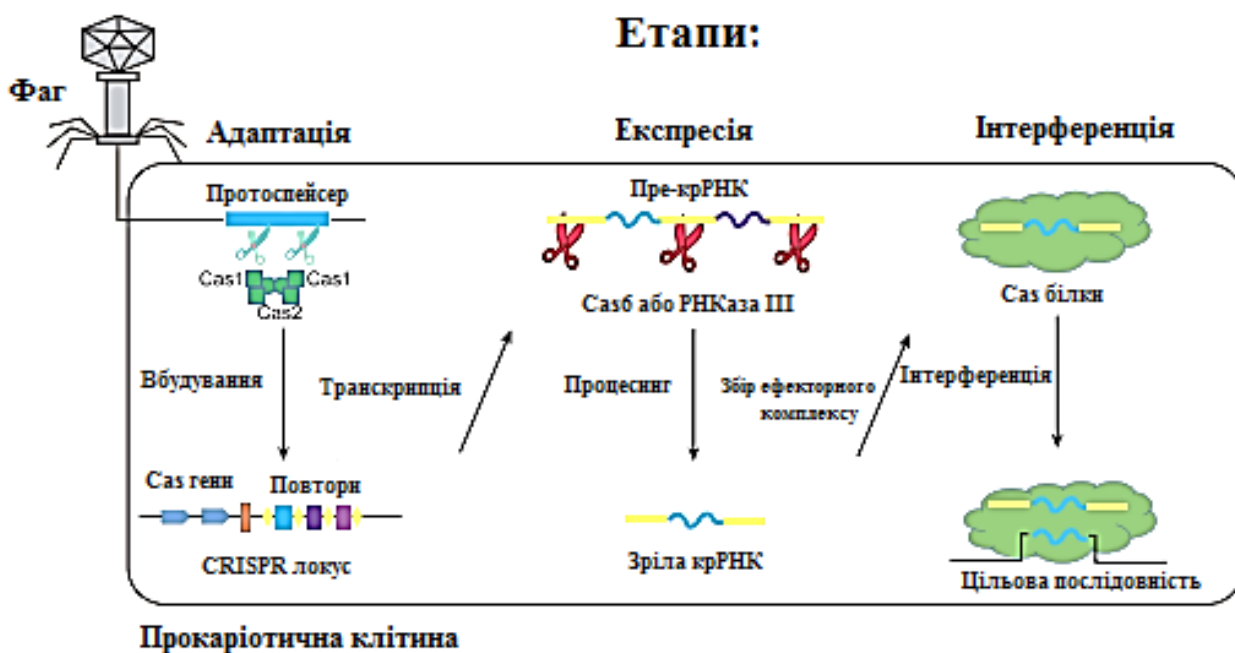


Рис.1.1. Загальний механізм імунної відповіді прокаріотичної клітини за допомогою CRISPR/Cas системи. Адаптовано з [17].

На етапі адаптації комплекс білків Cas1 та Cas2 зв'язується з ДНК, найчастіше після розпізнавання певної, чітко визначеної, короткої, суміжної зі спейсером послідовності PAM (protospacer-adjacent motif – послідовність, прилегла до протоспейсеру), і вирізає частину цільової ДНК, яка на цьому етапі називається протоспейсером. Після подвоєння повтору на 5'-кінці CRISPR масиву, адаптивний комплекс із білків Cas «вбудовує» протоспейсерну ДНК до решти повторюваних послідовностей, де вона вже стає спейсером. Деякі системи CRISPR/Cas використовують альтернативний механізм адаптації, а саме – «захоплення» спейсера з послідовності РНК, шляхом зворотної транскрипції за допомогою зворотної транскриптази, яку кодує CRISPR/Cas локус [15].

На етапі експресії, послідовності CRISPR, як правило, транскрибуються одним транскриптом – пре-CRISPR РНК (пре-крРНК), яка модифікується та «дозріває» до функціональних CRISPR РНК (крРНК), кожен з яких, є комплементарною копією спейсерних CRISPR масивів з фланкованими послідовностями з кожного боку. У різних варіантах CRISPR/Cas систем, процесинг пре-крРНК та її дозрівання до крРНК, опосередковується певною субодиницею мультидоменного Cas білку, або РНКазами клітини господаря, що не пов'язані з Cas [15].

На етапі інтерференції, крРНК, яка, як правило, залишається у зв'язку з білковим комплексом, за участі якого відбувалось її дозрівання, виступає направляючою послідовністю для розпізнавання протоспейсера (або схожої послідовності) в геномі вірусу або плазміди, які раніше вторгалися в прокаріотичну клітину. Послідовність ДНК чужорідного геному, яка була розпізнана направляючою крРНК, розщеплюється та інактивується нуклеазою (або кількома нуклеазами) Cas, яка або вже є частиною ефекторного комплексу або була залучена на етапі інтерференції [15].

Подібно до інших природних захисних механізмів, археальним та бактеріальним CRISPR/Cas системам притаманне неабияке розмаїття варіацій білків Cas, композицій генів та спейсерів, з яких складається CRISPR локус.

Через величезну різноманітність CRISPR/Cas систем за вищеперерахованими критеріями, їхня класифікація є проблематичною. Тому, для систематизації був запропонований підхід, який враховує специфічні для окремих типів і підтипів систем гени та їхню організацію у CRISPR локусах, подібність будови та функції білків Cas1 - Cas13, філогенію Cas1 – оскільки він є консервативним білком для більшості CRISPR/Cas систем адаптивної імунної відповіді [11,14,18]. Комбіноване застосування названих характеристик призвело до діючої класифікації 2020 року Makarova et al., яка поділяє системи CRISPR/Cas на два класи, шість типів та 33 підтипи [11].

Системам першого класу властиві ефекторні модулі, що складаються з декількох білків Cas, які, в свою чергу, утворюють комплекси, що зв'язують крРНК (наприклад, комплекс Cascade (CRISPR-associated complex for antiviral defense), у системах I типу), та за допомогою додаткових білків Cas, опосередковують попередній процесинг крРНК та інтерференцію [11,18].

CRISPR/Cas системи другого класу, навпаки, функціонують завдяки єдиному, крРНК зв'язувальному, багатодоменному білку : Cas9 в системах II типу, Cas12 - в системі V типу та Cas13, що відповідно є ефектором у системах VI типу. Названі білки залучені до всіх процесів та дій на етапі інтерференції, а в деяких випадках, також залучені до процесу дозрівання пре-крРНК. Вони поодиноці є функціонально аналогічними усьому ефекторному комплексу класу 1 [11,18].

Перший клас охоплює:

1) тип I – найбільш поширений та диверсифікований тип системи CRISPR/Cas;

2) тип III – який є різноманітним за його варіаціями та представлений у великої кількості видів архей, у бактерій зустрічається рідко;

3) тип IV – порівняно рідкісний тип, який складається рудиментарних локусів CRISPR/Cas; у систем цього типу відсутня ефекторна нуклеаза та модуль адаптації [16].

До систем другого класу належать:

- 1) II тип, до якого відносять системи, найбільш використовувані в генній інженерії;
- 2) V тип, ефекторний білок якого, розщеплює одразу два ланцюги ДНК;
- 3) VI тип, унікальність якого в тому, що ефекторні домени білку Cas13 проявляють неспецифічну РНКазну активність [6,11,14,18].

На ґрунті відмінностей між білками Cas1 – Cas13, які складають модулі адаптації та ефектори систем двох класів, відбувається підрозділення систем CRISPR/Cas на типи та підтипи. В останні роки було отримано багато інформації про структурні та функціональні особливості білків Cas, що дозволяє розділити їх на чотири функціональні групи (модулі): адаптації (надбання нового спейсера), експресії (процесинг крРНК та зв'язування з мішенню), інтерференції (розщеплення цільової послідовності ДНК або РНК), допоміжний модуль (регуляторні та інші функції, пов'язані з CRISPR) (Рис. 1.2) [11,14].

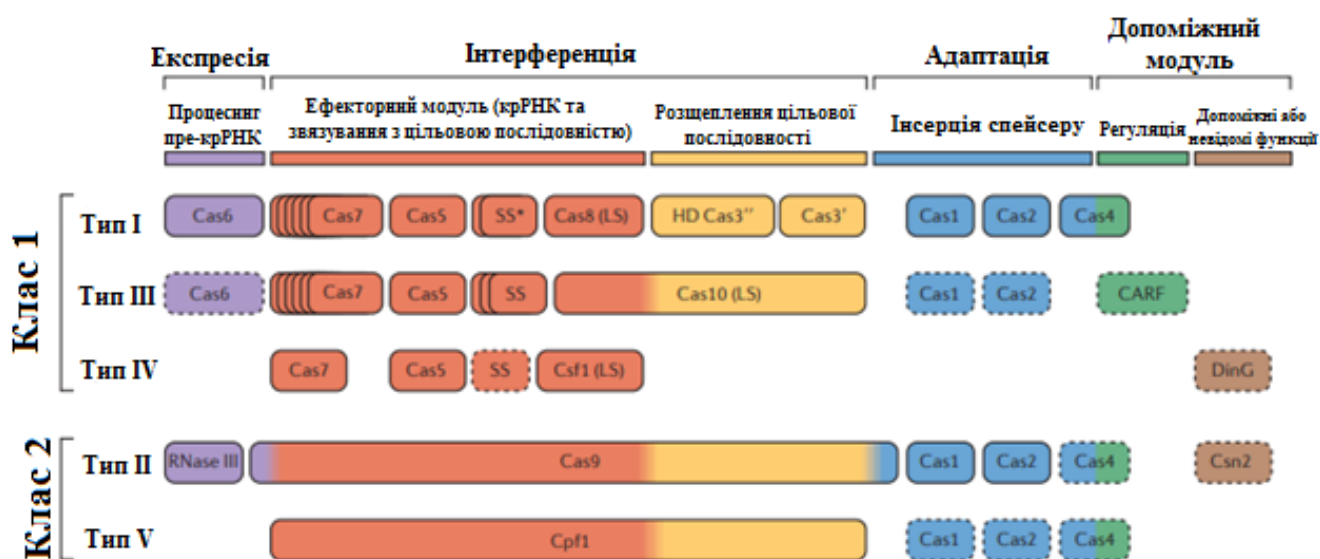


Рис. 1.2. Функціональна класифікація Cas білків. Адаптовано з [11].

До модуля адаптації належать: інтеграза Cas1, структурна субодиниця адаптаційного комплексу - Cas2, нуклеаза Cas4, Cas9, білок Csn2 [11].

Модулі експресії та інтерференції представлені ефекторними мультисубодиничними CRISPR РНК (крРНК) комплексами, або, в системах типу II - одним великим білком Cas9. Даний модуль відповідає за попередній процесинг крРНК, яка зв'язується з мультидоменним крРНК-ефекторним

комплексом або з Cas9, внаслідок чого відбуваються видозміни та дозрівання пре-крРНК до функціонально активної крРНК. Етап каталізується РНК-ендонуклеазою Cas6 – в системах I і III типу. У системах II типу процесинг крРНК відбувається за альтернативним механізмом, який включає бактеріальну РНКазу III і трансактивуючу CRISPR РНК (тракрРНК), тоді як у багатьох системах V типу та у всіх системах VI типу - великий ефекторний білок Cas містить каталітичний центр, що відповідає за процесинг крРНК [11,17].

Інтерференційний або ефекторний модуль бере участь у розпізнаванні мішені та розщепленні нуклеїнової кислоти. У системах CRISPR/Cas класу 1 модуль ефектора складається з декількох білків Cas – а саме Cas3 (іноді злитий з Cas2), Cas5, Cas8, Cas10 та Cas11 в різних комбінаціях, залежно від типу та підтипу системи. У системах другого класу, ефекторний модуль представлений одним білком - Cas9, Cas12 або Cas13. Цільове зв'язування ефекторних білків з ДНК опосередковується утворенням комплементарних зв'язків між спейсерною частиною крРНК та послідовністю-мішенню. Розщеплення таргетної послідовності каталізується нуклеазою Cas3 в системах I типу, спільною дією ферментної частини білків Cas7 та Cas10 в системах III типу або Cas9 в системах типу II [11].

Допоміжний модуль складається з комбінації різних білків та доменів, які (за винятком Cas4), поширені набагато менше, ніж основні білки системи CRISPR/Cas. Компоненти допоміжного модуля включають:

- набір білків, що містять CARF (CRISPR-associated Rossmann fold) домен, який, як припускають, регулює активність CRISPR-Cas системи у багатьох системах I та III типу;

- АТФазу Csn2, що є важливою для інтеграції спейсерів, можливо, запобігає розриву дволанцюгової хромосомної ДНК [11].

## **1.2. Варіанти CRISPR системи для активації експресії генів, що створені на основі мутованого Cas9: будова, переваги, механізми дії та застосування у активації експресії генів**

**1.2.1. CRISPR/Cas9 система II типу: основний інструмент для редагування геномів.** Система CRISPR/Cas типу II є найбільш дослідженою та широко використовуваною системою в генній інженерії. Її основним ефекторним компонентом є ендонуклеаза Cas9 (SpCas9), ідентифікована у *Streptococcus pyogenes* [17,19,20]. Загальний принцип РНК-опосередкованого імунного захисту в ендогенній CRISPR/Cas9 системі наступний: зріла крРНК об'єднується з тракрРНК (невеликою РНК, яка є комплементарною послідовностям CRISPR), утворюючи комплекс направляючої РНК тракрРНК : крРНК, яка спрямовує білок Cas9 з ендонуклеазною активністю до цільового сайту зі специфічною послідовністю. Cas9 – це велика, багатофункціональна ендонуклеаза розміром 160 кДа (1368 амінокислоти). Вона містить два різні нуклеазні домени, які відповідають за дволанцюгове розщеплення ДНК в області 3 п.о. вище ланцюгом від PAM послідовності. Домен HNH відповідає за розщеплення ланцюга, на якому міститься цільова послідовність, тоді як RuvC-подібний домен відповідає за розрізання нецільового ланцюг ДНК. Таким чином, після приєднання CRISPR/Cas9 системи до цільової послідовності, вона здійснює специфічні розрізи в ДНК, яка була ідентифікована завдяки комплементарній взаємодії частини направляючого комплексу, а саме - крРНК з цільовим сайтом, як зображено на рис. 1.2.

Механізми адаптивної імунної відповіді бактерій були адаптовані для створення нових підходів генної інженерії [5,21]. Редагування геному з використанням молекулярного механізму дії CRISPR/Cas9 системи, спирається на утворенні дволанцюгових розривів ендонуклеазою Cas9 та залежить від подальшого процесу репарації ДНК. Розриви в ланцюгах

запускають процес відновлення ДНК у клітині, яке може відбуватися двома шляхами :

1) за принципом негомологічного об'єднання кінців розрізаних ланцюгів, що передбачає утворення невеликих вставок та делецій в цільових сайтах. Внаслідок такої репарації можуть відбуватися пошкодження або вимикання функцій генів.

2) шляхом прямого гомологічного відновлення. Наслідком такої репарації може бути виправлення наявних мутації в генах чи певних регуляторних елементах, коли присутня шаблонна ДНК [22].

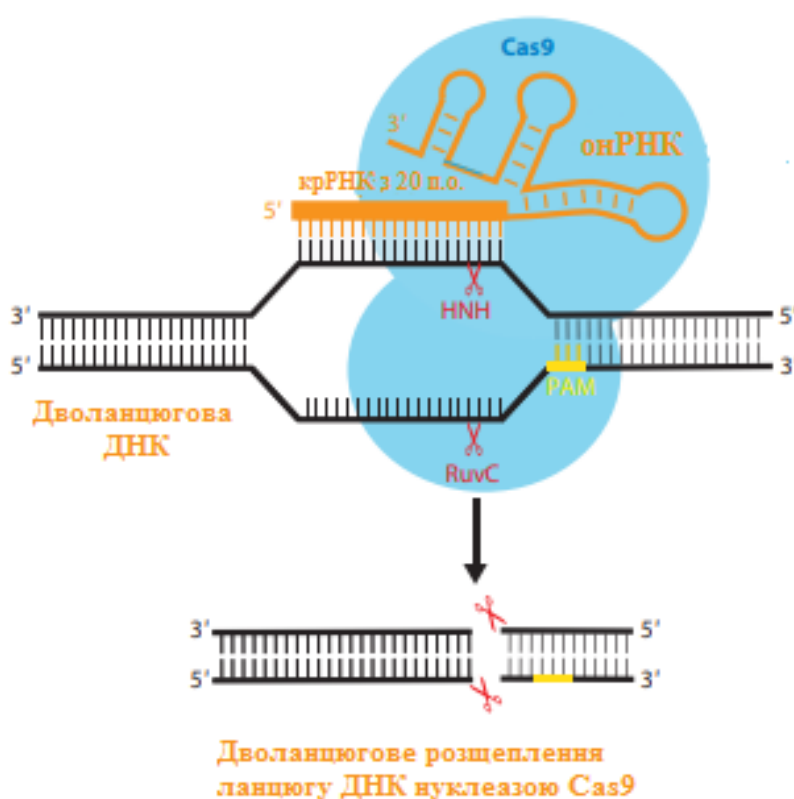


Рис.1.2. Загальний принцип дії CRISPR/Cas9 системи. Адаптовано з [22].

Для редагування геному найпростішою та найпоширенішою CRISPR/Cas9 системою, у клітини організму мають бути введені конструкти з послідовностями ДНК, що кодують нуклеазу Cas9 та одиночну химерну гайдову або направляючу РНК (онРНК, sgRNA – single guided RNA), оскільки Cas9 є РНК спрямованою ендонуклеазою. Одноланцюгова направляюча РНК є специфічною і комплементарною відповідному локусу-мішені ДНК [7,15]. У 2012 році Jinek et al. була розроблена синтетична онРНК, яка містить усі



необхідні компоненти для спрямування Cas9 до цільового сайту: крРНК та тракрРНК послідовності. Cas9 нуклеаза розпізнає прототоспейсерні або подібні до них послідовності, комплементарні онРНК розміром 18-24 п.о. Для розпізнання та зв'язування з цільовим мотивом ДНК, Cas9 потребує лише короткої (2-4 п.о.) послідовності PAM поряд із сайтом – мішенню [23]. PAM послідовності, які розпізнаються CRISPR/Cas9 системами різних мікроорганізмів – відрізняються; всі ідентифіковані наразі форми PAM повторів наведені в табл. 1.2, де N - позначає кожен нуклеотид, R - пурини А або Г, М - нуклеотид А або Ц, W - слабкі зв'язки А або Т [18].

Таблиця 1.2

Типи PAM послідовностей, які розпізнаються Cas9 ендонуклеазами різних прокаріотичних організмів

Організм	Типи PAM послідовностей
<i>Streptococcus pyogenes</i> (SpCas9)	5'-NGG-3'
<i>Streptococcus thermophiles</i> (St1Cas9)	5'-NGGNG-3' або 5' -NNAGAAW-3'
<i>Staphylococcus aureus</i> (SaCas9)	5' -NNGRRT-3' або 5'-NNGRR (N) -3'
<i>Neisseria meningitidis</i> (NmCas9)	5' -NNNRRT-3' або 5'-NNNNGMTT-3'
<i>Francisella novivida</i> (FnCpf1)	5'-NGG-3'

Таким чином, для того, щоб спрямувати нуклеазу до конкретної геномної ділянки інтересу розміром 22-29 п.о., використовуючи, наприклад, Cas9 від *Streptococcus pyogenes*, в якості мішеней необхідно вибирати тільки послідовності, які відповідають формі 5'-N<sub>20</sub>-NGG-3', де інженерно сконструйована онРНК - 5' - N<sub>20</sub>, а PAM – це послідовність типу 5' - NGG. Варто зауважити, що в людському геномі такі послідовності зустрічаються майже кожні 8-12 нуклеотидів [24].

**1.2.2. CRISPRa, як модифікація системи CRISPR/Cas9.** CRISPR/Cas9 система, окрім редагування геному, має потенціал використання для регуляції ендогенної експресії генів та маркування специфічних хромосомних ділянок у живих клітинах організмів [24]. Для перетворення Cas9 з молекулярних ДНК-

ножиць в активатор генів, необхідно позбутися її нуклеазної активності. Шляхом введення мутацій в домени RuvC та HNH, нещодавно було створено декілька варіантів Cas9. Один з них - нуль - нуклеаза (dCas9), фермент, що втратив свою ендонуклеазну активність, але зберіг здатність взаємодіяти з ДНК. Таким чином, стає можливим прикріплення ефektorів транскрипції безпосередньо до dCas9, що фактично перетворює цей комплекс - в легко програмований штучний фактор транскрипції. Створена у такий спосіб система, у поєднанні з мішень-специфічною онРНК, може слугувати в якості інструменту для клітинного програмування на рівні транскрипції генів без зміни первинної послідовності ДНК [12,15].

Система CRISPR-опосередкованої активації генів, називається скорочено CRISPRa, утворюється злиттям dCas9 і білками – активаторами транскрипції: з VP64 – який представляє собою чотири копії 16 білка вірусу простого герпесу, або з р65 субодиницею ядерного фактора NF-кВ [24]. В залежності від того, який компонент системи CRISPR/dCas9 злитий з активаторами транскрипції, існує щонайменше три типи систем CRISPR активації :

- 1) комбінація dCas9 з білком – активатором транскрипції;
- 2) конструкція з одиночної направляючої РНК, в сполученні з білком – активатором транскрипції;
- 3) комбінована CRISPRa система, коли і білок dCas9 і онРНК кон'юговані з білками – активаторами транскрипції.

Найбільш поширеним та застосовуваним типом систем CRISPR активації є конструкт dCas9 з білками – активаторами транскрипції (рис. 1.3 ) [20].

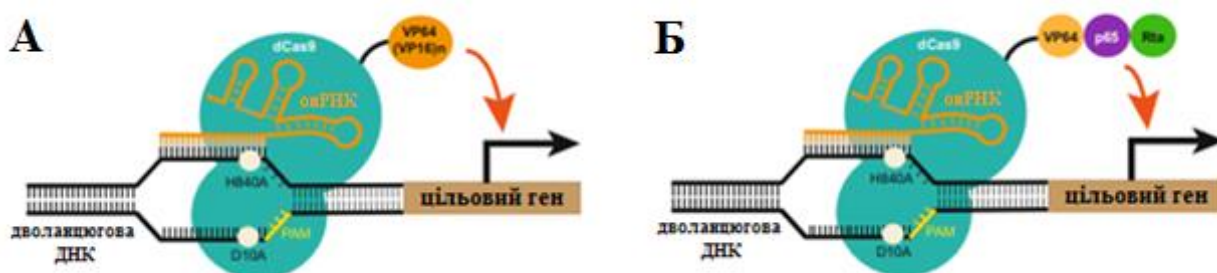


Рис.1.3. Приклади систем CRISPR активації на основі dCas9 з активаторами

транскрипції : А) система dCas9 – VP64, Б) система dCas9 – VPR. Адаптовано з [20].

Однією з перших, у 2013 році було створено dCas9 – VP64 систему CRISPR активації, і вона є системою першого покоління, тоді як наступні, більш вдосконалені версії, вважаються системами активації другого покоління [25]. Для створення такої системи, послідовності, що кодують білок dCas9 «зшивають» з С - кінцем домену трансактивації VP64, який представляє собою чотири копії 16 білку вірусу простого герпесу. За таких умов, dCas9 здатна активувати як репортерні, так і ендогенні гени за допомогою однієї онРНК, коли система доставлена та експресується в клітинах ссавців [20]. Авторами Perez - Pinera et al. [25] також було показано, що можливо досягти синергічної активації широкого спектру генів інтересу, використовуючи одразу декілька онРНК та збільшуючи кількість повторюваних доменів VP16 : dCas9 – VP96, VP64 – dCas9 – VP64, dCas9 – VP160 та dCas9 – VP192 [19,23]. А Dominguez et al. [24] окрім перепрограмування соматичних клітин в індуковані плюрипотентні стовбурові клітини, продемонстрували можливість перепрограмування фібробластів в скелетні міоцити за допомогою інструменту CRISPRa, із двома злитими доменами трансактивації VP64, які фланкують dCas9. Систему було використано для індукції транскрипції *Myod1* в мишачих ембріональних фібробластах, що спричинило їхнє диференціювання у скелетні міоцити. Також авторами [24] було досягнуто активації транскрипції *Myod1* людини, однак рівні експресії гену були набагато нижчими, ніж для *Myod1* миші, чого було недостатньо для перепрограмування фібробластів людини на скелетні міоцити. Незважаючи на вищесказане, отримані авторами результати, є досить успішними і підтверджують перспективність використання CRISPRa для прямого перепрограмування клітин. Окрім того, Black et al. продемонстрували безпосереднє перепрограмування культури мишиних ембріональних фібробластів на індуковані функціональні нейронні клітини, використовуючи

VP64 – dCas9 – VP64 - опосередковану активацію генів, що кодують нейрональні мишині транскрипційні фактори *Brn2*, *Ascl1* та *Myt11* [20,21].

Інша стратегія CRISPR – залежної активації генів, була розроблена Chavez et al. [26], в якій використовується кілька різних активаторів для синергічного посилення експресії цільових генів. Авторами створена dCas9 – VPR CRISPRa система, яку складають dCas9 сполучений з трьома білками-активаторами транскрипції, що об'єднані в наступному тандемі: VP64, P65 субодиниця ядерного фактора NF- $\kappa$ B (p65AD) та R трансактиватор вірусу Епштейна – Барра (Rta) [20,26]. Ці три активатори генетично злиті у визначеному порядку - для посилення ефекторів. Система dCas9 - VPR успішно пройшла апробацію та вже застосовувалась в культурі клітин людини, миші, *Drosophila melanogaster* та *Saccharomyces cerevisiae*. Крім того, у порівнянні з dCas9 – VP64, описана система продемонструвала підвищену ендогенну експресію генів (у 5-320 разів). Варто зауважити, що такого ефекту було досягнуто з використанням 3 - 4 різних онРНК, комплементарних до одного гену [20]. Однією з переваг використання системи з ефекторами транскрипції VPR на основі dCas9 - є легкість в одночасній роботі з багатьма локусними послідовностями, при цьому активуючи лише цільові гени, завдяки сконструйованій одиночній направляючій РНК. Загальноприйняті методи, для забезпечення експресії генів, передбачають використання векторів надекспресії кДНК або бібліотек кДНК. Однак клонування великих послідовностей кДНК у вірусні вектори та одночасне маніпулювання декількома ізоформами генів – важка процедура. До того ж, конструкції кДНК не часто здатні охопити повноту транскриптів ізоформ та не впливають на їх ендогенну регуляцію. Таким чином, система CRISPRa стала ідеальною технологією геномної регуляції, що забезпечує специфіку, зручність, надійність та масштабованість для активації генів [20,21,24,29,30].

### 1.3. Перепрограмування клітин - перспективна стратегія регенеративної медицини

Технології клітинного перепрограмування створюють великий потенціал для відновлення та регенерації пошкоджених тканин, що могли бути втрачені внаслідок захворювань або травм [29,30]. За останні роки клітинне перепрограмування стало можливим завдяки досягненням генної інженерії, внаслідок чого, клітинна ДНК та її експресія може бути модифікована, завдяки таким механізмам, як трансгени, нуклеази цинкових пальців (ZFN), ефекторним активатор-подібним транскрипційним нуклеазам (TALEN) та CRISPR/Cas9 системі [3,30]. Типове клітинне перепрограмування передбачає повернення кінцево-диференційованої клітини до індукованого плюрипотентного стану (іПСК) і потім її специфікування до бажаного типу. Доставка Oct4, Sox2, Klf4, с-мус факторів транскрипції, відкритих Yamanaka et al. у 2006 році, була виконана за допомогою ретровірусної трансдукції [27,31], внаслідок чого, соматичні клітини перетворювались в стовбурово-подібні, особливостями яких є здатність нескінченно розмножуватися та диференціюватися на більшість типів клітин організму [3,6]. Ця робота поклала початок цілому напрямку клітинної біології – перепрограмуванню клітин, і створила перспективне підґрунтя для розвитку регенеративної медицини. Однак, основними недоліками використання іПСК є тривалий час їхнього отримання та висока собівартість процесу, перепрограмування можливе тільки *in vitro*, схильність до формування тератом та пухлин у випадку неповного диференціювання іПСК [32]. Крім того, через складність протоколів та ряду етапів індукування клітин до плюрипотентного стану, ефективність, з якою формується кінцевий тип клітин, може бути низькою, та й перед тим, як ці клітини можуть бути клінічно використані, необхідно їх перевірити на безпечність для пацієнта, оскільки перепрограмування екзогенними транскрипційними факторами, зазвичай, проводиться із використанням вірусних систем доставки [31,32].

З часу першої публікації групою Yamanaka et al., було розроблено чимало модифікацій та змін у векторах експресії факторів перепрограмування, окрім того, були розроблені і альтернативні способи доставки, намагаючись підвищити ефективність перепрограмування та мінімізувати векторні послідовності, що інтегруються в геном іПСК [3,32]. Усі відомі наразі методи перепрограмування та системи доставки транскрипційних факторів з їх перевагами та недоліками наведені в табл. 1.3 додатку А.

Досягнення в галузі перепрограмування дозволяють прямо перетворювати один соматичний тип клітин в інший використовуючи при цьому чітко визначені фактори транскрипції [3]. Концепція прямого перепрограмування або трансдиференціації - є цікавою та актуальною для регенеративної медицини та тканинної інженерії, оскільки виключає ризик імунного відторгнення перепрограмованих клітин після трансплантації та не вимагає поділу клітин, а отже, знижує ризик мутацій та утворення пухлин. До того ж, процес трансдиференціювання можливо проводити *in vivo* та за коротші проміжки часу, оскільки плюрипотентний стан клітин оминається, що є ще однією перевагою використання цього методу в чутливих до часу клінічних умовах [32]. Дослідження показують [3,30,32], що фібробласти можуть бути прямо перепрограмовані на клітини таких ліній, як нейрони, гепатоцити та кардіоміоцити шляхом ектопічної експресії множинних, лініє-специфічних факторів транскрипції, мікро РНК (міРНК) та з використанням екзогенних низькомолекулярних сполук.

Нещодавно описані стратегії прямого перепрограмування, мають на меті безпосередньо змінювати фенотип одного зрілого типу клітин на інший, на відміну від підходу перепрограмування клітин через індукований плюрипотентний стовбуровий стан. Прототип такої стратегії був описаний в 1987 році, продемонструвавши, трансфекцію фібробластів кДНК, що кодує MyoD - головний регулятор формування скелетних м'язів, здатний перетворювати мишачі фібробласти безпосередньо в клітини скелетної мускулатури. Тим не менш, розробка подібної стратегії трансдиференціації

для кардіоміоцитів здавалася малоймовірною протягом багатьох років, оскільки єдиного головного регуляторного гена у клітинах серцевої лінії не існує [8,9].

Пряме перепрограмування фібробластів у клітини, подібні до кардіоміоцитів, вперше було продемонстроване у 2010 році Ieda et al.[2,34], яке відбулося завдяки надмірній експресії у мишачих фібробластах трьох, важливих для серцевого розвитку, факторів транскрипції: Gata4, Mef2C та Tbx5 (GMT). GMT – основні транскрипційні фактори (ТФ), експресія яких є достатньою для індукції перетворення фібробластів у кардіоміоцитоподібні клітини без переходу до стану клітини-попередника [2,4].

TBX5 – транскрипційний фактор родини T-box, який є важливим для ранніх етапів серцевого розвитку, спрямовує формування первинного серця через координовану взаємодію з іншими транскрипційними факторами. Одна з таких взаємодій - з GATA4, членом транскрипційних факторів родини цинкових пальців GATA, який модифікує структуру хроматину, дозволяючи іншим транскрипційним факторам, таким як NKX2–5, зв'язуватися зі своїми мішенями та повністю активувати транскрипцію серцевих генів. MEF2C - фактор посилення транскрипції родини MADS box, є важливим для формування вторинного серцевого поля завдяки його взаємодії з іншими кардіальними транскрипційними факторами [1,4,35].

Після встановлення GMT як основних ТФ, необхідних для прямого перепрограмування соматичних клітин в серцеві, дослідження зосередились на підвищенні ефективності перепрограмування, оскільки самих лише GMT було недостатньо для перетворення людських фібробластів в кардіоміоцитоподібні клітини [1,32].

Одним з перших факторів транскрипції, який група вчених Olson et al. [9] додали до «коктейлю» GMT, був HAND2 – ТФ з родини bHLH. Під час розвитку серця, HAND2 відповідає за формування камер шлуночків, завдяки взаємодії з GATA4 та NKX2- 5. В спробах підвищити транскрипційну активність GMT, трансактиваційний домен білка MyoD1 зшили з кожним із ТФ : Gata4,

Mef2C, HAND2 та Tbx5. Використання зазначеної комбінації транскрипційних факторів призвело до більш ніж 50-кратного підвищення ефективності серцевого перепрограмування, в порівнянні з використанням тільки GMT, та сприяло утворенню індукованих кардіоміоцитів з вираженою експресією відповідних серцевих маркерів, взаємодії з кальцієм та спонтанного скорочення клітин [1,2].

Незважаючи на успіхи перепрограмування мишачих фібробластів, для перепрограмування соматичних клітин людини однієї експресії транскрипційних факторів – недостатньо. Зокрема, дослідження останніх років [3,4,32] повідомляють про альтернативні методики прямого перепрограмування та використання комбінацій цих методів, включаючи трансдиференціацію епігенетичними регуляторами, ДНК-зв'язувальними факторами транскрипції, транскрипційними коактиваторами, міРНК та низькомолекулярними сполуками.

Повідомляється [1,2,4], що комбінації міРНК можуть безпосередньо перетворювати фібробласти в індуковані кардіоміоцити. міРНК відіграють важливу роль у становленні долі клітин та розвитку ембріонального серця, регулюючи численні гени, пов'язані із сигнальними шляхами, факторами транскрипції та епігенетичними регуляторами. Jayawardena et al. [1] продемонстрували, що комбінація м'язоспецифічних міРНК (miR-1, miR-133, miR-208 та miR-499) може бути використана для успішного створення функціональних кардіоміоцитоподібних клітин. Olson et al. повторили вищезазначену методику перепрограмування та не отримали подібного ефекту. Проте, успішного результату перепрограмування було досягнуто при додаванні міРНК до «коктейлю» транскрипційних факторів [2].

Muraoka et al. [36] встановили, що використання miR-133 разом із GMT, покращує кардіальне перепрограмування, оскільки, miR-133, безпосередньо зв'язується зі *Snail*, який є головним регулятором епітеліально-мезенхімального переходу, а також скочує час, необхідний для індукції скорочення клітин.



Іншим альтернативним підходом до прямого перепрограмування є застосування низькомолекулярних сполук [30,37]. Ding et al. [37] повідомляють, що певні екзогенні невеликі молекули сприяють процесу трансдиференціації фіброblastів у кардіоміоцити. Авторами було продемонстровано, що вплив дев'яти низькомолекулярних сполук (9C: CHIR99021, A83-01, VX01294, AS8351, SC1, Y27632, OAC2, SU16F та JNJ10198409) на людські соматичні клітини та термінально диференційовані серцеві фіброblastи, призводить до їхнього перепрограмування в кардіоміоцитоподібні клітини, що нагадують нативні людські серцеві клітини [1,37].

Оптимізація «коктейлів» транскрипційних факторів та модифікація сигнальних шляхів - є іншими потенційними стратегіями підвищення ефективності перепрограмування та дозрівання клітин [1,37]. Було виявлено [36], що епігенетичні та молекулярно біологічні особливості фіброblastів, як типу клітин є бар'єром для ефективного кардіального перепрограмування. Тому, Ifkovits et al. [38] продемонстрували, що інгібування профіброblastних TGF- $\beta$  й Wnt та Rho-кіназного (ROCK) сигнальних шляхів сприяє підвищенню ефективності трансдиференціації та дозрівання клітин на 60%. До того ж, активація Akt - сигнального шляху, підсилює утворення зрілих індукованих кардіоміоцитів [12].

Після експериментів із перепрограмуванням мишиних фіброblastів, Nam et al. та Wada et al. [2] у 2013 році повідомили, що використання комбінації транскрипційних факторів GATA4, MEF2C, HAND2, TBX5, MESP1, MYOCD (міокардин) та міРНК miR-1, разом із miR-133, призводили до активації експресії серцевих маркерів та сприяли зміні клітинної морфології людських фіброblastів з веретеноподібної форми на витягнуту паличкоподібну. Спонтанні коливання  $Ca_2^+$  також були виявлені. Крім того, додавання ZFPM2 до «коктелю» вищеназваних ТФ, у результаті підсилювало кардіальні характеристики у фенотипі перепрограмованих людських клітин, включаючи глобальну експресію серцевих генів [2,4].

Як вже було зазначено, в останні роки вченими було розроблено декілька методів трансдиференціації: починаючи від надмірної експресії факторів транскрипції вірусними векторами до малих молекул, пулів міРНК та CRISPR послідовностей з модифікованим білком dCas9 - для генетичного та епігенетичного перепрограмування [30]. Наразі, найбільш поширеною методикою надекспресії факторів транскрипції та міРНК, є використання лентивірусних систем доставки, які інтегрують в геном клітини. Проте, таке перепрограмування може призвести до інсерційного мутагенезу [30], тому, для клінічних застосувань, ведеться пошук альтернативних систем та методів. Однією з «більш безпечних» систем експресії є - доставка потрібних для перепрограмування серцевих факторів з використанням неінтеграційних векторів вірусу Сендай, які вже були успішно протестовані на мишиних моделях інфаркту міокарда. Також повідомляється [30], про застосування генних носіїв на основі наночастинок для перетворення фібробластів у кардіоміоцити *in vivo*. Проте, названі підходи не характеризуються високою ефективністю перепрограмування та безпечністю їх застосування в клінічній практиці є сумнівною [37].

Тому, із розвитком CRISPR - технології і створенням систем для активації генної експресії, у руках вчених з'явилася ще одна опція для активації генів та прямого перепрограмування клітин. До того ж, технології репрограмування клітин за допомогою системи CRISPRa, дають змогу досягти бажаного ефекту без внесення екзогенних транскрипційних факторів та без внесення змін у структуру ДНК, що робить їх досить перспективними та потенційно безпечними для клінічного застосування. *In vivo*, CRISPR/Cas система використовується для модифікації функцій генів соматичних клітин, шляхом доставки та експресії білку Cas9 та онРНК в потрібній популяції клітин [30,39].

Chakraborty et al. [40] у 2014 продемонстрували пряму конверсію первинних мишачих ембріональних фібробластів в скелетні міоцити, використовуючи CRISPRa систему - VP64 – dCas9 – VP64, яка, завдяки

напрявляючій РНК, була орієнтована на ендogenousний ген *MyoD1*. Застосовуючи ту ж CRISPR VP64 – dCas9 – VP64 систему, Black et al. здійснили пряме перепрограмування мишиних фібробластів на індуковані нейронні клітини шляхом цілеспрямованої, мультиплексної активації ендogenousних генів нейrogenними факторами транскрипції *Brn2*, *Ascl1* та *Myt11* [28,40]. Існують також підтвердження про перепрограмування світлочутливих паличок в колбочки, завдяки активації відповідних транскрипційних факторів CRISPRa системою [30].

Для розробки стратегії прямого перепрограмування фібробластів в індуковані плюрипотентні клітини, заснованої виключно на CRISPRa системі з активатором dCas9 – VPR, авторами Weltner et al. [41], було оптимізовано промоторне націлювання найбільш ефективних онРНК на канонічні фактори перепрограмування OCT4, MYC, KLF4, SOX2, LIN28A та NANOG, які потім об'єднувались у єдину плазмиду для трансфекції фібробластної лінії клітин крайньої плоти людини.

А у 2020 році, Wang et al. [42], продемонстрували пряме перепрограмування клітинної лінії серцевих фібробластів в індуковані клітини-попередники серця *in vitro*, використовуючи модифіковану CRISPR dCas9 – VPR систему, активуючи при цьому ендogenousні серцеві фактори GATA4, HAND2, MEF2C і TBX5.

Підсумовуючи свій огляд експериментальних робіт, варто зауважити, що CRISPRa система є перспективним підходом для прямого перепрограмування диференційованих клітин як *in vivo*, так і *in vitro*, та, при належному дослідженні, цілком може стати додатковим методом терапії при низці захворювань людини. Зокрема, така стратегія є привабливою для терапії серцево-судинних захворювань, а саме фіброзів серця, що виникають після інфаркту, при гіпертрофії та вікових змінах міокарду. На нашу думку, застосування CRISPRa у форматі «in the body» для перепрограмування фібробластів у кардіоміоцити у зоні ураження серця, дасть змогу покращити функціонування міокарду та якість життя пацієнтів після інфаркту.

## РОЗДІЛ 2

### ОБ'ЄКТ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

#### 2.1. Характеристика об'єкту дослідження

Об'єктом дослідження були послідовності основних генів кардіогенезу людини *GATA4*, *MyoD1*, *Tbx5*, *Mef2c* та *HAND2* у межах -200 п.о. – +1 п.о. вище сайту старту транскрипції, та специфічні до них одиночні направляючі РНК.

#### 2.2. Реактиви, розчини, середовища та обладнання, що були використані в роботі

**2.2.1. Реактиви.** У роботі було використано наступні реактиви: NaCl (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), KCl (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна) MgSO<sub>4</sub> (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), CaCl<sub>2</sub> (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), MgCl<sub>2</sub> (х.ч., ООО Хімлаборреактив, Україна), канаміцин сульфат (ч.д.а., Sigma-Aldrich, США), тетрациклін гідрохлорид (ч.д.а., Merck, Німеччина), стрептоміцин сульфат (ч.д.а., Merck, Німеччина), глюкоза (ч.д.а., Sigma-Aldrich, США), бактотриптон (ООО Біокомпас-С, Росія), дріжджовий екстракт (ООО Фармактив, Україна), гліцерин (Реахим, Росія), бакто-агар (Difko Laboratories, США), Na<sub>2</sub>EDTA (ос.ч.,Sigma-Aldrich, США), етидій бромід (ос.ч., Sigma-Aldrich, США).

**2.2.2. Розчини.** У роботі було використано такі розчини:

- 10 % гліцерол;
- 100 мМ CaCl<sub>2</sub>;
- 100 мМ MgCl<sub>2</sub>;
- 85 мМ CaCl<sub>2</sub> + 15% гліцерол;
- буфер TAE (40 мМ Tris, 20 мМ оцтова кислота, 1 мМ EDTA);
- буфери з набору Monarch Plasmid Miniprep Kit (точний склад буферів є власністю компанії - виробника):

1. Plasmid Resuspension Buffer (B1): ресуспендуючий буфер на основі Tris (трис(гідроксиметил)амінометан);
2. Plasmid Lysis Buffer (B2): лізуючий буфер на основі NaOH та ДСН (натрію додецилсульфат);
3. Plasmid Neutralization Buffer (B3): нейтралізуючий буфер на основі гуанідин гідрохлориду, містить РНКазу;
4. Plasmid Wash Buffer 1: буфер для відмивання 1 на основі гуанідину та ізопропанолу;
5. Plasmid Wash Buffer 2: буфер для відмивання 2 на основі етанолу;
6. DNA Elution Buffer: 10 мМ Tris, 0.1 мМ ЕДТА, рН 8.5.

### **2.2.3. Живильні середовища.** В роботі використовували такі середовища:

- середовище LB (Lysogeny broth medium) (Sigma-Aldrich, США).
- середовище S.O.C. такого складу (г/л) : 20 г/л бактотриптон, 5 г/л дріжджового екстракту, 0,5 г/л NaCl, 0,186 г/л KCl, 10 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10 мМ MgSO<sub>4</sub> та 20 мМ глюкози.

### **2.2.4. Комерційні набори, ферменти та плазміди.** У роботі були використані такі ферменти, буфери, ферменти та плазміди:

- ферменти: ендонуклеаза рестрикції BpiI (BbsI) (ThermoFisher Scientific, США), T4 полінуклеотид кіназа (ThermoFisher Scientific, США), T4 ДНК - лігаза (ThermoFisher Scientific, США);
- буфери: 10 x Buffer G (ThermoFisher Scientific, США), 10 x T4 ligase buffer (ThermoFisher Scientific, США), 10x Reaction Buffer A (ThermoFisher Scientific, США), 5 x Loading Buffer з бромфеноловим синім (ThermoFisher Scientific, США);
- комерційні набори: набір для виділення плазмідної ДНК Monarch Plasmid Miniprep (New England Biolabs, США), набір для елюції ДНК з гелю GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США), маркер мас GeneRuler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, США);

- плазмідні вектори: вектори Cas9sgRNA (Addgene # 68463) [43], SP - dCas9 - VPR (Addgene # 63798) [26].

**2.2.5. Обладнання та витратні матеріали.** У роботі було використано таке лабораторне обладнання та приладдя: центрифуга MiniSpin (Eppendorf, Німеччина), центрифуга Marathon Micro A (Fisher Scientific, США), камера для горизонтального електрофорезу (Clever, США), спектрофотометр NanoDrop (Bio-Rad, США), водяна баня (BIOSAN, Литва), фотоколориметр (КФК-2), система документування гелю ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad, США), клітинний електропоратор MicroPulser™ (Bio-Rad, США), автоматичні піпетки (0,1 мкл - 2 мкл Сарр, Данія; 2 – 20 мкл DLAB, США; 20 – 200 мкл DLAB, США, 200 – 1000 мкл DLAB, США), термостат ТС-80М-2 (АО “Медлабортехніка”, Росія), ваги з точністю до 0,1 мг (Kern, Німеччина), холодильники і морозильник до - 80°C, рН-метр.

У дослідженнях було використано такі витратні матеріали: мікроцентрифужні пробірки об’ємом 1,5 мл та 0,2 мл (EximLab, Україна), наконечники для автоматичних піпеток (ООО "Паритет", Україна), пластикові флакони об’ємом 50 мл (ООО "FALCON", Україна).

### 2.3. Біологічні об’єкти, які були використанні у дослідженні

Під час виконання роботи використовувались музейні штами мікроорганізмів Інституту молекулярної біології та генетики, а саме *E. coli* Top10 та *E. coli* XL10-Gold, закуплені в комерційній фірмі Thermo Fisher Scientific, США.

Генотип *E. coli* штаму Top10: F-*mcrA* Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*Δ*M15*Δ*lacX74 recA1 araD139*Δ(*araleu*)7697 *galU galK rpsL*(StrR) *en dA1 nupG*.

Генотип *E. coli* штаму XL10-Gold: *TetrD(mcrA)183 D(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr) Amy Camr]*.

#### **2.4. Біонформатичний аналіз потенційних кандидатів спейсерних послідовностей онРНК для активації експресії генів кардіогенезу людини**

Основними генами кардіогенезу людини є *GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *MEF2C* і *Hand2* та, згідно з літературними даними [2,4], активація експресії цих генів призводить до ефективного перепрограмування фібробластів у кардіоміоцити.

Перший етап біоінформатичного аналізу проводили із застосуванням інструменту CRISPR-ERA [44], за допомогою якого перевіряли наявність послідовностей типу NGG PAM на сенсовій та антисенсовій ДНК генів інтересу (*GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *MEF2C*, *Hand2*). Взагалі, система може бути направлена на будь-яку бажану послідовність, адже мотив NGG зустрічається в геномі кожні 8-12 п. н. [45]. При підборі та дизайні онРНК керувались наступними правилами:

1) для забезпечення правильної ініціації транскрипції РНК-полімеразою III, усі послідовності онРНК мають починатися із динуклеотидної послідовності GG;

2) для підвищення ефективності активації цільових генів, протоспейсери підбирали у межах від -200 п.о. до +1 п.о. перед сайтом старту транскрипції (ССТ) [46]. Як нещодавно було показано Konermann et al. [47], цей параметр є дуже важливим для забезпечення ефективної активації транскрипції гену - мішені;

Наступним кроком є вибір унікальної, тобто такої, що зустрічається лише один раз на геном, послідовності ДНК із численної кількості підібраних програмою, до якої в подальшому буде синтезовано комплементарну онРНК. Тому, після ідентифікації програмою CRISPR-ERA цільових сайтів онРНК, для передбачення ефективності та специфічності відібраних послідовностей в

межах геному людини використовували інструмент CCTop-CRISPR/Cas9 [48] – для «відсіювання» усіх послідовностей онРНК, що матимуть більш ніж один передбачуваний сайт зв'язування та матимуть «off-target» ефект [26,46]. У результаті цього були відібрані лише специфічні РНК, які мають не більше одного сайту зв'язування.

Крім того, застосовували інструмент NCBI blast [49], щоб перевірити наявність лише однієї мішені типу 5'-NNNNN NNBBB BBBB BBBB NGG-3' у межах геному людини, де В – фактичні пари основ в цільовому сайті геному.

## **2.5. Клонування спейсерних послідовностей онРНК**

Всі відібрані за допомогою біоінформатичного аналізу цільові послідовності онРНК були синтезовані компанією «Syntol», Росія.

Для створення дволанцюгової направляючої послідовності до цільових сайтів генів кардіогенезу людини, з отриманими 5' ланцюгом онРНК та 3' ланцюгом онРНК, було проведено ряд підготовчих етапів за стандартними протоколами [50].

**2.5.1. Розведення ліофілізованих одноланцюгових олігонуклеотидів та приготування робочих розчинів.** Для створення стокових розчинів олігонуклеотидних послідовностей, ліофілізований вміст мікроцентрифужних пробірок розчиняли в воді, очищеній від нуклеаз, до досягнення стокової концентрації 100 пмоль/мкл.

Для отримання робочого розчину концентрацією 10 пмоль/мкл, стокові розчини олігонуклеотидів розвели в 10 разів очищеною від нуклеаз водою.

**2.5.2. Фосфорилування дволанцюгової послідовності онРНК.** Сплавлення одноланцюгових послідовностей олігонуклеотидів здійснювали за температури 95°C протягом 5 хв. Склад реакційної суміші був таким:



10 x T4 полінуклеотидкіназний буфер (PNK)	2 мкл
5' ланцюг онРНК (10пкмоль/мкл)	8 мкл
3' ланцюг онРНК (10пкмоль/мкл)	8 мкл
Загальний об'єм	18мкл

Реакцію фосфорилування проводили за кімнатної температури протягом 60 хв. Склад реакційної суміші для реакції фосфорилування:

T4 полінуклеотидкіназа (PNK)	1 мкл
T4 PNK буфер А	2,1 мкл
АТФ (10мМ розчин)	2,4 мкл
Сплавлені олігонуклеотиди	18 мкл
Загальний об'єм	23,5 мкл

**2.5.3. Розрізання плазмідного вектору Cas9sgRNA за сайтами рестрикції.** Реакцію рестрикції плазмідного вектору Cas9sgRNA проводили за допомогою ендонуклеази рестрикції BpiI (BbsI). Вектор Cas9sgRNA має два сайти рестрикції BbsI, що розташовані поруч, для вставки послідовності онРНК, а також онРНК-каркас (gRNA-scaffold), який розпізнається системою dCas9 - VPR (рис.2.1 А, Б) [43]. На місце фрагменту, що вирізається, відбувається вставка потрібної послідовності онРНК.

Реакцію рестрикції проводили відповідно до рекомендацій виробника, протягом 2 годин при 37°C та, для припинення реакції, суміш на інкубували протягом 20 хв при 65°C. Компоненти, необхідні для реакції:

BbsI рестриктаза	1 мкл
Вектор Cas9sgRNA	2 мкг
10x GB буфер	4 мкл
ddH <sub>2</sub> O	До 40 мкл

А.

5'G A A G A C N2↓3'  
 3'C T T C T G N6↑5'

Б.

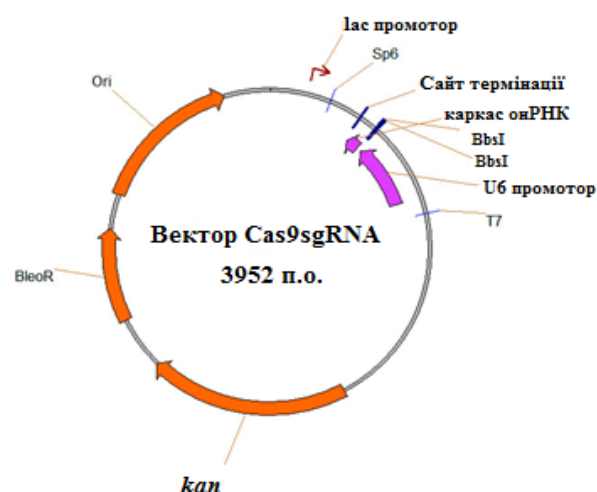


Рис. 2.1. Сайт розпізнавання ендонуклеази рестрикції *BspI* (*BbsI*) та генетична карта вектору *Cas9sgRNA*.

А. Сайт розпізнавання і місця розщеплення молекули ДНК рестриктазою *BspI* (*BbsI*) позначені ↓,↑.

Б. Генетична карта вектору *Cas9sgRNA*, де онРНК- каркас позначено стрілкою навпроти двох сайтів розпізнавання *BspI* (*BbsI*). Адаптовано [43].

**2.5.4. Гель-електрофорез для перевірки лінеаризації вектору *Cas9sgRNA*, його елюція та очищення.** Для очищення лінеаризованої плазміди від можливих залишків ендонуклеази рестрикції проводили гель-електрофорез в 1% агарозному гелі на буфері TAE. На доріжки гелю наносили: молекулярний маркер мас діапазоном 250–10000 п.о., нативний вектор *Cas9sgRNA* та лінеаризований *Cas9sgRNA*. До зразків додавали 5 x Loading Buffer з бромфеноловим синім для візуалізації фронту міграції ДНК в гелі. Використовували бромистий етидій для фарбування ДНК в агарозному гелі. Візуалізацію розділення плазмідної ДНК проводили в УФ – світлі, застосовуючи прилад для документування гелю ChemiDoc XRS.

Виділення та очищення лінеаризованого вектору проводили використовуючи набір для елюції ДНК з гелю GeneJET Gel Extraction Kit (Thermo Scientific, США), згідно з рекомендаціями виробника. Для цього, зважували фрагменти вирізаного гелю з вектором в мікроцентрифужних пробірках, куди додавали Binding buffer в об'ємі 1:3 (маса гелю : об'єм

буферу). Суміш інкубували на водяній бані за температури 55 °С протягом 10 хв до повного розчинення гелю. Тоді, отриманий розчин, переносили у колонку GeneJet та центрифугували 2 хв при 1600 x g. Рідину, що пройшла крізь колонку зливали. В центр колонки додавали 300 мкл Wash Buffer, центрифугували 1 хв, рідину зливали. Колонку переносили в нову мікроцентрифужну пробірку, до якої додавали 30 мкл буферу для елюції, центрифугували 1 хв. За допомогою спектрофотометру NanoDrop визначали концентрацію плазмідної ДНК та ступінь її чистоти. Виділену плазмідну ДНК заморожували та зберігали за –20°C.

**2.5.5. Вставка спейсерної послідовності онРНК до плазмідного вектору Cas9sgRNA.** Реакцію лігування дволанцюгової спейсерної послідовності онРНК проводили з попередньо лінеаризованим, розрізаним за сайтом рестрикції BbsI та з відомою концентрацією вектором Cas9sgRNA (Addgene # 68463) [43] протягом 1 години за кімнатної температури або 10 хв за температури 65 °С. Для вставки цільової послідовності онРНК в плазмідну використовували наступні компоненти:

10x T4 лігазний буфер	1 мкл
Фосфорильовані олігонуклеотиди	1 мкл
Вектор Cas9 sgRNA	20 нг
T4 ДНК лігаза	1 мкл
ddH <sub>2</sub> O	до 10 мкл

**2.6. Трансформація компетентних клітин *E. coli* плазмідним вектором Cas9sgRNA зі спейсерною послідовністю онРНК**

**2.6.1. Приготування компетентних клітин *E. coli* XL10-Gold та *E. coli* Top10 для електропорації.** Для приготування компетентних клітин для електротрансформації, окремі одиночні колонії *E. coli* штамів XL10-Gold та Top10 музейних зразків окремо нарощували протягом ночі при 37°C в 2 мл

середовища LB з додаванням тетрацикліну (1 мкл/мл) та стрептоміцину (1 мкл/мл) відповідно. Нарощування культури проводилось на терморегульованій установці при 37 °C за умов інтенсивної аерації не менше, ніж 12 годин. Отриманий посівний матеріал переносили в окремі флакони з 200 мл свіжого середовища LB без антибіотиків, та культивували мікроорганізми при 37 °C та за постійної аерації кілька годин до досягнення оптимальної оптичної густини ( $OD_{600}=0,5-0,7$ ) бактеріальної суспензії, яка була виміряна за допомогою фотоколориметра (КФК-2). Після чого, суспензії культивованих мікроорганізмів охолоджували на льоду 20 хвилин та всі наступні етапи проводились за температури 0-4°C.

Охолоджені бактеріальні суспензії переносили в рівних кількостях в завчасно охолоджені пластикові стерильні флакони об'ємом 50 мл та центрифугували протягом 15 хв із прискоренням 4000 x g за температури 4°C. Супернатант обережно зливали. Осаджені клітини обережно ресуспендували в 50 мл холодного 10 % розчину гліцеролу. Наступні етапи центрифугування (15 хв, 4000 x g, 4°C) та ресуспендування бактеріальних клітин проводили тричі, поступово зменшуючи об'єм 10 % холодного розчину гліцеролу : 50 мл - > 25 мл - > 4 мл - > 1 мл. Після цього, аліквотили отриману суспензію компетентних клітин по 50 мкл в 1,5 мл центрифужні пробірки та надалі зберігали за температури - 80°C.

**2.6.2. Приготування хімічно компетентних клітин *E. Coli* XL10-Gold та Top10.** Для приготування хімічно компетентних клітин для трансформації, окремі одиночні колонії *E. coli* штамів XL10-Gold та Top10 музейних зразків окремо нарощували протягом ночі при 37°C в 2 мл середовища LB з додаванням тетрацикліну (1 мкл/мл) та стрептоміцину (1 мкл/мл) відповідно. Нарощування культури проводилось на терморегульованій установці при 37 °C за умов інтенсивної аерації не менше, ніж 12 годин. Отриманий посівний матеріал переносили в окремі флакони з 200 мл свіжого середовища LB без антибіотиків, та культивували мікроорганізми при 37 °C та за постійної аерації кілька годин до досягнення оптимальної оптичної густини ( $OD_{600}=3,35 - 4,0$ )

бактеріальної суспензії, яка була виміряна за допомогою фотоколориметра (КФК-2). Після чого, суспензії культивованих мікроорганізмів охолоджували на льоду 20 хвилин та всі наступні етапи проводились за температури 0-4°C.

В попередньо охолоджені на льоду флакони об'ємом 50 мл, в рівних кількостях (по 50 мл) аліквотили охолоджені бактеріальні суспензії *E. coli* штамів XL10-Gold та Top10, після чого клітини осаджували центрифугуванням (3000 x g, 4°C, 15 хв) та відбирали надосадову рідину. Осаджені клітини ресуспендували в 10 мл охолодженого, 100 мМ розчину MgCl<sub>2</sub> та об'єднували бактеріальні суспензії з двох флаконів в один. Ресуспендовані клітини центрифугували протягом 15 хв із прискоренням 2000 x g за температури 4°C та обережно зливали супернатант. Після чого, осаджені клітини промивали та ресуспендували в 20 мл холодного, 100 мМ розчину CaCl<sub>2</sub> та додатково витримували на льоду протягом 20 хв. Суспензію центрифугували (2000g, 4°C, 15 хв), зливали надосадову рідину. Осад з клітин м'яко ресуспендували в 5 мл холодної dd H<sub>2</sub>O та 5 мл холодного 85 мМ розчину CaCl<sub>2</sub> з 15% вмістом гліцеролу. Востаннє, бактеріальну суспензію центрифугували протягом 15 хв із прискоренням 1000 x g за температури 4°C та обережно зливали супернатант. Осаджені клітини ресуспендували в 1 мл холодного 85 мМ розчину CaCl<sub>2</sub> з 15% вмістом гліцеролу, після чого, отриману суспензію компетентних бактеріальних клітин аліквотили по 50 мкл в 1,5 мл центрифужні пробірки та надалі зберігали за температури - 80°C.

### **2.6.3. Трансформація компетентних клітин методом електропорації.**

Одним із методів трансформації компетентних клітин *E. coli* є електропорація. Компетентні клітини, що зберігалися за температури -80°C, розморожували на льоду при 4°C. Після чого, до 40 мкл суспензії клітин додавали 5 мкл (20 нг) плазмідної ДНК, обережно перемішували та інкубували на льоду 1 хв. Далі, суміш клітин з плазмідною ДНК переносили до попередньо охолодженої спеціальної кювети для електропорації, яку вставляли в камеру пристрою MicroPulser. Електротрансформацію проводили в режимі «Eс1» приладу. Негайно після проходження електричного імпульсу через кювету з клітинами

до них додавали 300 мкл рідкого живильного середовища S.O.C. та переносили в скляні пробірки об'ємом 10 мл. Наступним етапом було культивування суспензії трансформованих клітин на терморегульованій установці за умов інтенсивної аерації та 37°C протягом 1 години. За асептичних умов проводили висів нарощеної культури клітин на щільне живильне середовище LB з канаміцином та культивували протягом ночі (не менше 12 годин) при 37°C.

#### **2.6.4. Трансформація компетентних клітин методом теплового шоку.**

Іншим методом трансформації компетентних клітин *E.coli* є трансформація методом теплового шоку. Для цього, компетентні клітини *E.coli*, що зберігалися за -80°C, розморожували за температури 4°C. Для селекції трансформантів, що несуть плазмиду Cas9-gRNA зі вставкою, використовували середовище LB, до складу якого також входив антибіотик канаміцин, концентрацією 50 мкг/мл.

До 50 мкл суспензії хімічно компетентних клітин додавали 5 мкл плазмідної ДНК та обережно перемішували. Далі, інкубували суміш компетентних клітин з плазмідною ДНК на льоду протягом 30 хв. Наступним етапом був тепловий шок, для створення якого, чого мікроцентрифужну пробірку з сумішшю компетентних клітин та плазмідної ДНК витримували за 42°C, протягом 40 с. Після чого, пробірки з клітинами інкубували на льоду 1 хв та, по закінченню часу інкубування, додавали 200 мкл рідкого живильного середовища LB. Трансформовані клітини культивували у терморегульованій установці за умов інтенсивної аерації та за 37 °C протягом години, після чого їх висівали LB з канаміцином та культивували протягом ночі (не менше 12 годин) у термостаті при 37°C.

#### **2.7. Виділення плазмідної ДНК, аналіз отриманої конструкції з вбудованими послідовностями онРНК**

**2.7.1. Виділення плазмідної ДНК.** Після позитивної селекції клітин на селективному середовищі з канаміцином, добирали одиночні колонії трансформантів. Клітини висіювали в 2 мл рідкого живильного середовища з додаванням канаміцину (1 мкг/мл). Культуру нарощували протягом ночі в 2 мл рідкого живильного середовища LB на терморегульованій установці за умов інтенсивної аерації при 37 °С.

Плазмідну ДНК виділяли із використанням набору для виділення плазмідної ДНК Monarch Plasmid Miniprep згідно з рекомендаціями виробника. Для цього, 1,5 мл нарощеної бактеріальної суспензії осаджували центрифугуванням в мікроцентрифужній пробірці (тут, і на наступних етапах, прискорення центрифуги = 10 000 x g, центрифугування за кімнатної температури). Осад ресуспендували в 200 мкл Resuspension Buffer (B1). Після чого, додавали 200 мкл Plasmid Lysis Buffer (B2), обережно перемішували розчин та інкубували за кімнатної температури 2 хв. Після інкубації, додавали 400 мкл Plasmid Neutralization Buffer (B3), обережно перемішували розчин та інкубували 2 хв за кімнатної температури. Клітинний лізат центрифугували 5 хв. Обережно переносили надосадову рідину в колонки, центрифугували 1 хв. Рідину, що пройшла крізь колонку зливали. В центр колонки додавали 200 мкл Plasmid Wash Buffer 1 та центрифугували 1 хв. Рідину, що пройшла через колонку виливали, а до колонки додавали 400 мкл Plasmid Wash Buffer 2 та центрифугували 1 хв. Колонки переносили в чисті центрифужні пробірки, додавали 30 мкл буферу для елюції, інкубували 1 хв, після чого центрифугували 1 хв. За допомогою спектрофотометру NanoDrop визначали концентрацію та чистоту виділеної плазмідної ДНК.

**2.7.2. Аналізуючий рестрикційний аналіз виділеної плазмідної ДНК та гель-електрофорез отриманих зразків.** Для перевірки наявності вбудованої вставки в вектор для клонування онРНК - Cas9gRNA проводили аналізуючий рестрикційний аналіз. Суть аналізуючого рестрикційного аналізу полягає в наступному: якщо інсерція спейсерної послідовності, в розрізаний за сайтами рестрикції вектор, не відбулася – то вторинна взаємодія порожнього

вектору з BspI ендонуклеазою рестрикції призведе до гідролізу вектору. Якщо ж вставка онРНК відбулася – то вектор залишиться цілим і за молекулярною масою від нативного - Cas9gRNA відрізнятися майже не буде.

Склад реакційної суміші:

BbsI рестриктаза	0,25 мкл
Вектор зі вставкою	0,5 мкг
10X GB буфер	1 мкл
ddH <sub>2</sub> O	До 10мкл

Реакцію проводили протягом 2 годин за 37 °С, інактивували фермент інкубацією за температури 65°С протягом 20 хв.

Аналіз продуктів рестрикційного аналізу здійснювали за допомогою електрофоретичного розділення в 1% агарозному гелі. Для кращого розуміння, поруч із продуктами рестрикції, на доріжки гелю наносили молекулярний маркер мас діапазоном 250–10000 п.о., нативний вектор Cas9sgRNA та лінеаризований Cas9sgRNA. До зразків додавали 5 x Loading Buffer з бромфеноловим синім для візуалізації фронту міграції ДНК в гелі. Використовували бромистий етидій для фарбування ДНК в агарозному гелі. Візуалізацію розділення плазмідної ДНК проводили в УФ – світлі, застосовуючи прилад для документування гелю ChemiDoc XRS.

**2.7.3. Визначення нуклеотидних послідовностей.** Визначення нуклеотидних послідовностей сконструйованих рекомбінантних плазмід проводили за допомогою набору для секвенування (BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit) та прямого праймера T7 - ТААТАСГАСТСАСТАТАGГG до плазмідного вектора згідно з інструкцією виробника на автоматичному ДНК аналізаторі «Genetic Analyser 3130» (Applied Biosystems, США). Послідовності аналізували за допомогою програмного забезпечення «Sequencing Analysis» (Applied Biosystems, США) та за допомогою сервісу BLASTN (NCBI)[49].



## РОЗДІЛ 3

### РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХНЄ ОБГОВОРЕННЯ

#### **3.1. Біоінформатичний аналіз кандидатів спейсерних послідовностей онРНК, що можуть бути використані для активації експресії генів кардіогенезу людини**

Першим етапом створення бібліотеки онРНК, що можуть бути використанні для активації генів кардіогенезу людини із застосуванням CRISPRa системи, був біоінформатичний аналіз послідовностей генів *GATA4*, *MyoD1*, *Tbx5*, *MEF2C*, *Hand2*. На цьому етапі було підібрано специфічні одиночні направляючі РНК до вищезазначених генів. Із використанням інструменту CRISPR-ERA [44,45], було проаналізовано масив даних біоінформатичного пошуку та відібрано послідовності типу NGG – PAM, розміром 20-25 п.о. у сенсовій та антисенсовій послідовностях ДНК, серед послідовностей, що кодують гени-мішені. У результаті було створено окремий список кандидатів онРНК до цільових генів: *MyoD* – 283 кандидати, *Tbx5* – 540 кандидатів, *HAND2* – 257 кандидатів, *GATA* – 357 кандидатів, *Mef2C* – 383 кандидати.

Для досягнення ефективної активації цільових генів, за допомогою сервісу BLASTN (NCBI) [49] знаходили послідовності їх ДНК в межах - 200 п.о. до + 1 п.о. перед сайтом старту транскрипції (CCT). Тоді, всі послідовності кандидати онРНК аналізували і відбирали тільки ті, що починаються з динуклеотидної послідовності GG та володіють найвищою специфічністю зв'язування із промоторними ділянками генів. На наступному етапі біоінформатичного аналізу за допомогою інструменту CCTop - CRISPR/Cas9 [48] відкидали всі одиночні направляючі РНК, що мають більш ніж один специфічний сайт зв'язування для зниження вірогідності «off-target» ефекту та підвищення ефективності роботи CRISPR/Cas9 системи. Крім того, серед вже відібраних послідовностей-кандидатів вибирали тільки

ті, для яких у геномі людини існує одна або не більше двох мішеней типу 5' - NNNNN NNBBB BBBB BBBB NGG - 3. Для цього було використано інструмент NCBI blast [49]. Усі послідовності, що не підходили за вказаними параметрами – відкидались і не враховувались при подальшій роботі.

В результаті проведеного біоінформатичного аналізу було підібрано по 4 найбільш перспективні та специфічні одиночні направляючі РНК для кожного із генів-мішеней для подальшого синтезу та інсерції у вектор експресії Cas9sgRNA.

Відібрані послідовності, комплементарні до гену *Hand2* локалізуються на 4й хромосомі геному людини та займають позиції в промоторній ділянці гену: 174451395 для онРНК HAND2/1, 174451422 – для HAND2/2, 174451520 – для HAND2/3 та 174451398 – для HAND2/4. HAND2/1 та HAND2/3 комплементарні сенсовому ланцюгу, а HAND2/2 та HAND2/4 – антисенсовому. Створені послідовності знаходяться на різній відстані від сайту старту транскрипції : HAND2/1 віддалений від ССТ на -17 п.н., HAND2/2 на -44 п.н., HAND2/3 на -142 п.н., HAND2/4 на - 20 п.н.

Чотири послідовності, комплементарні гену *Mef2c* локалізуються на 5 хромосомі геному людини. Дві послідовності - MEF2C/1 та MEF2C/2 комплементарні антисенсовій послідовності ДНК, відповідно, MEF2C/3 та MEF2C/4 – сенсовій. Послідовності комплементарні промоторній ділянці гена із позиціями нуклеотидів : MEF2C/1 – 88179328, MEF2C/2 – 88179374, MEF2C/3 – 88179511, MEF2C/4 – 88179512. Положення онРНК від ССТ : - 45 для MEF2C/1, -91 для MEF2C/2, -228 для MEF2C/3 та -229 для MEF2C/4.

Послідовності онРНК, що активують експресію кардіального гену *MyoD1*, який локалізований на 11 хромосомі геному людини, комплементарні сенсовому ланцюгу ДНК (MYOD1/1 і MYOD1/3) та антисенсовому (MYOD1/2 та MYOD1/4 ). Зв'язуються з його промоторною ділянкою в позиції нуклеотидів 17741009 для MYOD1/1, 17741077 для MYOD1/2, 17741055 для MYOD1/3 та 17740921 MYOD1/4. Відстані від сайту старту транскрипції варіюють : -100 (MYOD1/1), -32 (MYOD1/2), -54 (MYOD1/3), -188 (MYOD1/4).

Чотири послідовності, комплементарні гену *Tbx5* локалізуються на 12 хромосомі. Дві послідовності - ТВХ5/1 та ТВХ5/2 комплементарні антисенсовій послідовності ДНК, ТВХ5/3 та ТВХ5/4 – сенсовій. Послідовності зв'язуються з промоторною ділянкою гена із позиціями нуклеотидів : ТВХ5/1 – 114844196, ТВХ5/2 – 114846277, ТВХ5/3 – 114846314, ТВХ5/4 – 114846466. Положення онРНК від ССТ : -228 для ТВХ5/1, -30 для ТВХ5/2, -67 для ТВХ5/3 та -219 для ТВХ5/4.

Створені послідовності онРНК для гену *GATA4* є комплементарними антисенсовій та сенсовій послідовностям ДНК - *GATA4/3* і *GATA4/4* та *GATA4/1* і *GATA4/2* відповідно. *GATA4* розташований на 8 хромосомі геному людини. Позиції нуклеотидів направляючих РНК у промоторній ділянці кардіального гену наступні : *GATA4/1* – 11561651, *GATA4/2* – 11561459, *GATA4/3* – 11561669 та *GATA4/4* – 11561459. Створені онРНК зв'язуються з *GATA4* на різній відстані від сайту старту транскрипції : *GATA4/1* віддалений від ССТ на -65 п.н., *GATA4/2* на -257 п.н., *GATA4/3* на -47 п.н., *GATA4/4* на -257 п.н.

Тож, було створено послідовності унікальних та перспективних онРНК для цільової активації п'яти генів кардіогенезу людини : *GATA4*, *MyoD1*, *Tbx5*, *Mef2c* і *Hand2*. Розташування послідовностей, до яких комплементарні розроблені онРНК у генах кардіальних транскрипційних факторів наведені на рис. 3.1. Послідовності відібраних нами направляючих РНК наведено в табл. 3.1.

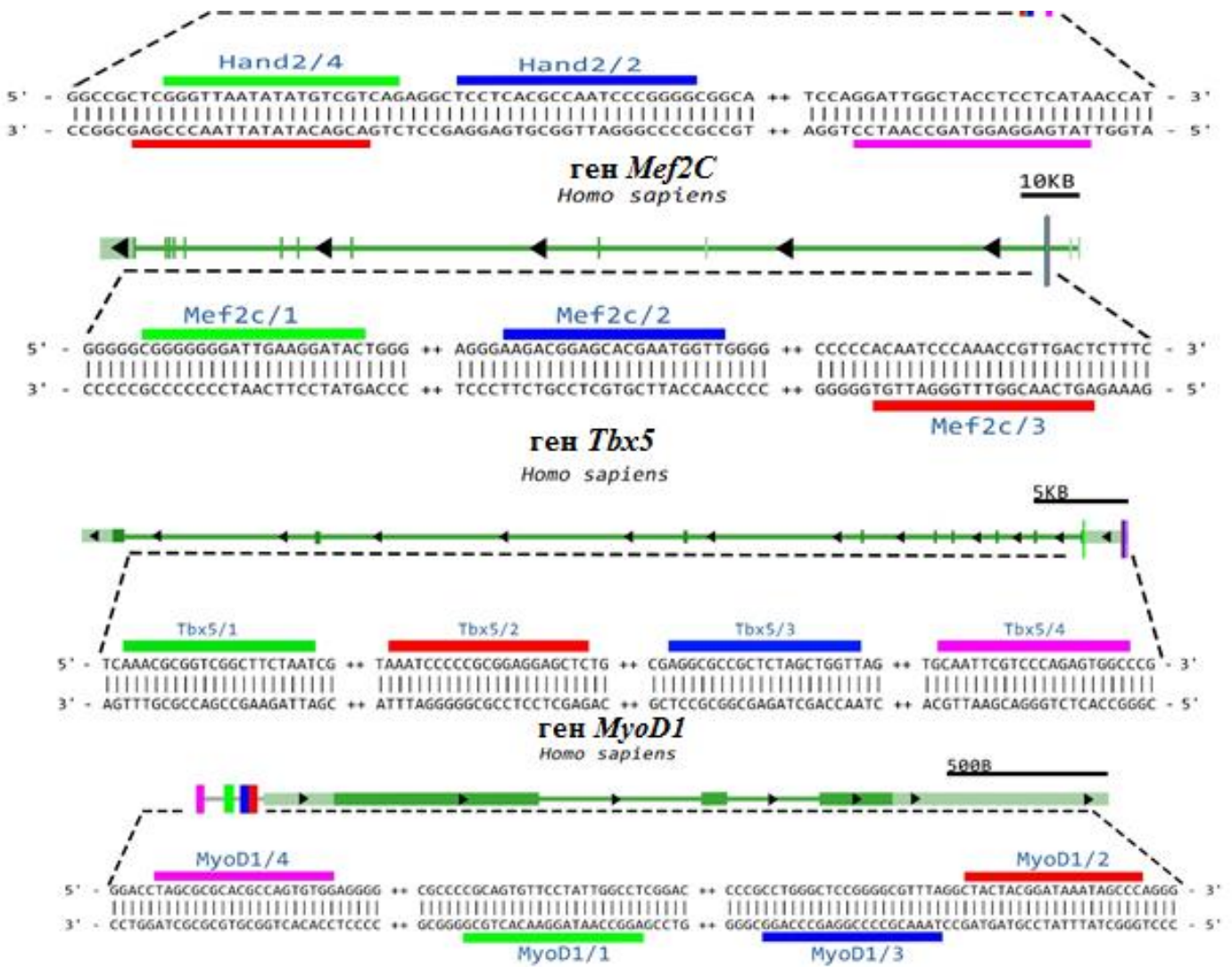


Рис.3.1. Положення онРНК на карті генів кардіогенезу людини. Кольорами підкреслені послідовності, що кодують напрямляючі РНК.

Таблиця 3.1

Олігонуклеотидні послідовності онРНК, розроблені для активації експресії генів кардіогенезу людини

онРНК		Послідовність (5' → 3')	Ланцюг	Відстань до ССТ	Локалізація	
					Хромосома	Положення
<i>HAND2/1</i>	F	<u>CACCGACGACATATATTAACCCGAG</u>	+	-17	4	174451395
	R	<u>AAACSTCGGGTTAATATATGTCGTC</u>				
<i>HAND2/2</i>	F	<u>CACCGTCTCACGCCAATCCCGGGG</u>	-	-44	4	174451422
	R	<u>AAACCCCGGGATTGGCGTGAGGAC</u>				
<i>HAND2/3</i>	F	<u>CACCGTATGAGGAGGTAGCCAATCC</u>	+	-142	4	174451520
	R	<u>AAACGGATTGGCTACSTCCTCATAC</u>				
<i>HAND2/4</i>	F	<u>CACCGGGTTAATATATGTCGTCAG</u>	-	-20	4	174451398

Продовження табл.3.1

	R	<u>AAACCTGACGACATATATTAACCC</u>				
<i>MEF2C/1</i>	F	<u>CACCGCGGGGGGATTGAAGGATAC</u>	-	-45	5	88179328
	R	<u>AAACGTATCCTTCAATCCCCCGC</u>				
<i>MEF2C/2</i>	F	<u>CACCGAAGACGGAGCACGAATGGTT</u>	-	-91	5	88179374
	R	<u>AAACAACCATTTCGTGCTCCGTCTTC</u>				
<i>MEF2C/3</i>	F	<u>CACCGAGTCAACGGTTTGGGATTGT</u>	+	-228	5	88179511
	R	<u>AAACACAATCCCAAACCGTTGACTC</u>				
<i>MEF2C/4</i>	F	<u>CACCGGAGTCAACGGTTTGGGATTG</u>	+	-229	5	88179512
	R	<u>AAACCAATCCCAAACCGTTGACTCC</u>				
<i>MYOD1/1</i>	F	<u>CACCGAGGCCAATAGGAACACTGCG</u>	+	-100	11	17741009
	R	<u>AAACCGCAGTGTTCTATTGGCCTC</u>				
<i>MYOD1/2</i>	F	<u>CACCGCTACTACGGATAAATAGCCC</u>	-	-32	11	17741077
	R	<u>AAACGGGCTATTTATCCGTAGTAGC</u>				
<i>MYOD1/3</i>	F	<u>CACCGTAAACGCCCCGGAGCCCAGG</u>	+	-54	11	17741055
	R	<u>AAACCCTGGGCTCCGGGGCGTTAC</u>				
<i>MYOD1/4</i>	F	<u>CACCGTAGCGCGCACGCCAGTGTG</u>	-	-188	11	17740921
	R	<u>AAACCCACACTGGCGTGCGCGCTAC</u>				
<i>TBX5/1</i>	F	<u>CACCGAAACGCGGTCGGCTTCTAAT</u>	-	-228	12	114844196
	R	<u>AAACATTAGAAGCCGACCGCGTTTC</u>				
<i>TBX5/2</i>	F	<u>CACCGAATCCCCCGCGGAGGAGCTC</u>	-	-30	12	114846277
	R	<u>AAACGAGTCTCCTCCGCGGGGATTC</u>				
<i>TBX5/3</i>	F	<u>CACCGAGGCGCCGCTCTAGCTGGTT</u>	-	-67	12	114846314
	R	<u>AAACAA.CCAGCTAGAGCGGCGCCTC</u>				
<i>TBX5/4</i>	F	<u>CACCGCAATTCGTCCCAGAGTGGCC</u>	-	-219	12	114846466
	R	<u>AAACGGCCACTCTGGGACGAATTGC</u>				
<i>GATA4/1</i>	F	<u>CACCGCACAGGCCAGTCAGCGCCCT</u>	-	-65	8	11561651
	R	<u>AAACAGGGCGCTGACTGGCCTGTGC</u>				
<i>GATA4/2</i>	F	<u>CACCGAACCCAATCGACCTCCGGCT</u>	-	-257	8	11561459
	R	<u>AAACAGCCGGAGGTCGATTGGGTTTC</u>				
<i>GATA4/3</i>	F	<u>CACCGCTAGGGCCGAGTTGCTGGGC</u>	-	-47	8	11561669
	R	<u>AAACGCCAGCAACTCGGCCTAGC</u>				
<i>GATA4/4</i>	F	<u>CACCGAACCCAATCGACCTCCGGCT</u>	-	-257	8	11561459
	R	<u>AAACAGCCGGAGGTCGATTGGGTTTC</u>				

Примітка. F – ланцюг, що кодує онРНК (forward – прямий), R – ланцюг, що комплементарний кодуючому (reverse - зворотній). Підкреслені нуклеотиди утворюють «липкі кінці», які необхідні для лігування із лінійним вектором Cas9sgRNA.

## 3.2. Вставка спейсерних послідовностей онРНК у вектор експресії Cas9sgRNA

У результаті проведеного біоінформатичного аналізу, було створено колекцію послідовностей олігонуклеотидів одиночних направляючих РНК, які були замовлені для синтезу в комерційній фірмі «Syntol». Отримані нами одноланцюгові олігонуклеотиди були підготовлені до подальшого вбудування у вектор Cas9sgRNA. Сплавлені та фосфорильовані дволанцюгові спейсерні послідовності одиночних направляючих РНК до генів *GATA4*, *MyoD1*, *Tbx5*, *Mef2c* та *Hand2* були вставлені у порожній, завчасно лінеаризований вектор Cas9sgRNA за допомогою реакції лігування (див. підрозділ 2.5.7). В результаті було отримано колекцію конструкцій зі вставками онРНК, якими трансформували компетентні клітини *E. coli* штамів XL-10 Gold та Top 10 двома методами – електропорацією та теплового шоку для визначення найбільш ефективної стратегії.

### 3.2.1. Трансформація клітин *E.coli* векторною конструкцією зі вставкою протоспейсерної послідовності онРНК до гену *Tbx5*.

Трансформування клітин векторними конструкціями зі вставками спейсерних послідовностей онРНК до генів проводити поступово – створюючи бібліотеки конструкцій, до кожного з генів по черзі. Першим проводили трансформування електрокомпетентних клітин клітин *E.coli* штаму Top 10 методом електропорації з лігуваннями направляючих послідовностей (ТВХ5/1, ТВХ5/2, ТВХ5/3, ТВХ5/4) до гену *Tbx5*. Суспензію трансформованих клітин конструкціями Cas9sgRNA/Tbx5/1,2,3,4 було висіяно на чашки Петрі з щільним живильним середовищем LB, до складу якого входив антибіотик канаміцин (50 мкг/мл), забезпечуючи позитивний відбір тільки колоній трансформантів, за рахунок наявності у них гену *kan*. Було висіяно також контрольні зразки клітин для перевірки ефективності лігування: перший контроль – клітини *E. coli* штаму Top 10, трансформовані лінеаризованим вектором, другий – компетентні бактеріальні клітини *E. Coli* Top 10, без додавання до них плазмідної ДНК. На наступний день проводили аналіз трансформантів.

Було виявлено від 10 до 30 колоній, успішно трансформованих конструкціями Cas9sgRNA/Tbx5/1, Cas9sgRNA/Tbx5/2, Cas9sgRNA/Tbx5/3, Cas9sgRNA/Tbx5/4.

Для напрацювання та подальшого виділення плазмідної ДНК зі вставками до гену *Tbx5*, було взято по дві колонії-трансформанти. Відбрані трансформанти були культивовані в окремих, для кожної колонії, пробірках з рідким живильним середовищем LB з канаміцином (1 мкл/мл).

На наступний день виділили 8 зразків плазмідної ДНК (див. підрозділ 2.7), визначили їхню концентрацію та параметри чистоти. Результати наведені в табл. 3.2.

Таблиця 3.2

Характеристики виділених зразків пДНК з кострукціями онРНК до гену *Tbx5*

Вектор зі вставкою онРНК до гену <i>Tbx5</i> ( <sub>1</sub> та <sub>2</sub> – означає колонію)	Концентрація ДНК, нг/мкл	Параметри чистоти плазмідної ДНК за довжини хвиль:	
		260/280 нм	260/230 нм
Tbx5/1 <sub>1</sub>	199,1	1,92	2,19
Tbx5/1 <sub>2</sub>	206,8	1,92	2,20
Tbx5/2 <sub>1</sub>	20,3	1,84	0,93
Tbx5/2 <sub>2</sub>	151,7	1,91	2,20
Tbx5/3 <sub>1</sub>	3,2	2,16	0,45
Tbx5/3 <sub>2</sub>	2,9	2,28	0,50
Tbx5/4 <sub>1</sub>	158,5	1,90	2,25
Tbx5/4 <sub>2</sub>	201,5	1,89	2,03

Проаналізувавши результати виділення пДНК, їхні концентрації та параметри чистоти, було зроблено висновки, зразки Tbx5/3/1, Tbx5/3/2 та Tbx5/2/1 не є придатними для подальшої роботи. Зразки утилізували, оскільки їх концентрації їхніх пДНК є низькими: 3,2 нг/мкл - Tbx5/3/1, 2,9 нг/мкл - Tbx5/3/2 та 20 нг/мкл - Tbx5/2/1. Крім того, вони є забрудненими білками та фенолом, про що свідчать значення параметрів чистоти, визначені за

допомогою спектрофотометру NanoDrop за довжини хвиль 260/230 нм та 260/280 нм відповідно.

Для того, щоб переконатися, що вставка лігваного нами фрагменту відбулась, було проведено додатковий аналізуючий рестрикційний аналіз (див. підрозділ 2.7.2 ) із використанням рестриктази *VriI* для зразків з високою концентрацією пДНК Tbx5/1/1 (199,1 нг/мкл), Tbx5/1/2 (206,8 нг/мкл), Tbx5/2/2 (151,7 нг/мкл), Tbx5/4/1 (158,5 нг/мкл), Tbx5/4/2 ( 201,5 нг/мкл).

За допомогою електрофоретичного розділення проаналізували результати рестрикційного аналізу. З'ясували, що тільки Tbx5/1 послідовність протоспейсерної онРНК була успішно вставлена в плазмідний вектор Cas9sgRNA, оскільки він не піддався гідролізу рестриктазою *VriI* (*BbsI*) та молекулярною масою від нативного Cas9gRNA не відрізняється (Рис 3.2). При електрофоретичному розділенні, зразки Cas9sgRNA, Cas9 - Tbx5/1/1/ *BbsI* та Cas9-Tbx5/1/2/ *BbsI* зупинились на рівні розділення маркера молекулярних мас , що дорівнює 2,5 kb. Хоча, розмір вектору Cas9sgRNA – 3952 п.о., коли вона перебуває суперзакрученому, цілісному стані, то проходить через агарозний гель швидше, ніж коли ланцюги пДНК зазнають розриву, або в нашому випадку – розрізання рестриктазою. Отримана рекомбінантна плазміда була відібрана нами для подальшого секвенування.

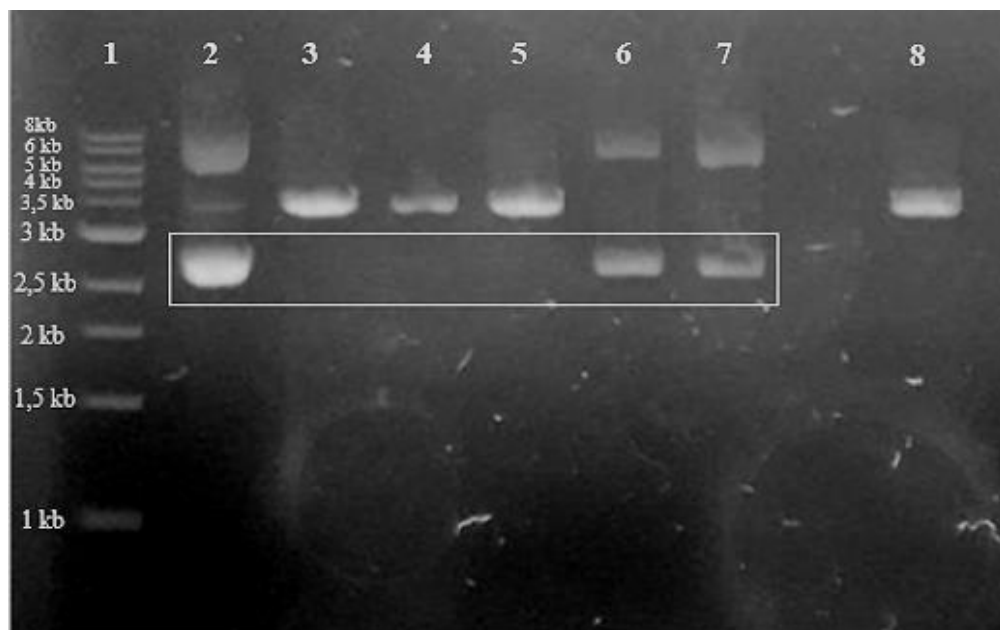




Рис.3.2. Електрофореграма, отримана при розділенні інтактного вектора Cas9sgRNA та продуктів рестрикції серії рекомбінантних векторів із онПНК до гена *Tbx5*. 1 – маркер молекулярних мас GeneRuler 1kb DNA Ladder, 2 – інтактний вектор Cas9sgRNA; 3 – Cas9 -Tbx5/2/2/BbsI; 4 - Cas9-Tbx5/4/1/BbsI; 5 – Cas9-Tbx5/4/2/ BbsI; 6 – Cas9-Tbx5/1/1/ BbsI; 7 – Cas9-Tbx5/1/2/ BbsI; 8 – Cas9sgRNA / BbsI.

## УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ

Серцево-судинні захворювання є основною причиною смертності в світі [32], а обмежені регенеративні властивості кардіоміоцитів є основним бар'єром для відновлення серцевої тканини. Після інфаркту міокарда міофібробласти є домінуючим типом клітин в інфарктній зоні [2]. Тому, застосування саме прямого перепрограмування термінально-диференційованих міофібробластів в кардіоміоцитоподібні клітини, є перспективною стратегією одночасного зменшення рубцевої фіброзної тканини та примноження функціональних кардіоміоцитів у зоні ураження.

На відміну від реалій України, пряме кардіоміогенне перепрограмування, є хоч і відносно новою стратегією регенерації серця, проте розвивається досить активно. У країнах ЄС та США є багато науково-дослідних груп на чолі зі Сриваставою (Srivastava) (США) [51], Шенг Дінг (Sheng Ding) (США) [52], Олсоном (Olson) (США)[53] і Дзау (Dzau) (США)[54], які працюють в цій галузі, тому кількість експериментальних робіт присвячених цій проблематиці стрімко зростає. Однак, переважна більшість цих робіт зосереджена на перепрограмуванні фібробластів у кардіоміоцити із застосуванням екзогенних кардіальних транскрипційних факторів, гени яких доставляються у клітини із використанням вірусних векторів на основі геномів ленті- адено- чи ретровірусів.

Узагальнюючи наявний масив експериментальних робіт, можна зазначити про посилений інтерес науковців до застосування системи CRISPRa для перепрограмування клітин та зміни їхньої специфікації. Існують роботи, де за допомогою такого підходу отримано індуковані плюрипотентні стовбурові клітини людини [41,55], індуковані кардіальні попередники клітин людини [42]. Проте, наразі не існує оприлюднених даних про застосування CRISPRa системи у поєднанні з не-вірусними системами доставки для кардіоміогенного перепрограмування фібробластів. Тому, результатом запропонованої тут роботи є створення нової технології прямого

перепрограмування фіброblastів в кардіоміоцити із застосуванням CRISPRa компаунду, який буде перспективним самостійним чи додатковим інструментом при терапії післяінфарктних станів та при регенерації міокарду. CRISPRa компаунд складатиметься із комплексу плазмід, що експресують злитий білок dCas9 з активаторами транскрипції VPR - це і забезпечуватиме активацію генів-мішеней у фіброblastах, а відібрані нами індивідуальні одноланцюгові направляючі РНК до кожного із основних кардіальних генів, забезпечуватимуть прицільність та точність роботи самої системи Cas9-VPR.

Підбір та створення бібліотеки одноланцюгових направляючих РНК для активації експресії генів кардіогенезу людини CRISPRa системою були основною метою цієї роботи. Відповідно до поставленої мети був виконаний ряд завдань, серед яких – біоінформатичний аналіз послідовностей серцевих генів *GATA4*, *MyoD1*, *Tbx5*, *MEF2C*, *Hand2* та підбір унікальних онРНК для розпізнавання промотерних ділянок генів-мішеней у межах від -200 п.о. до +1 п.о. перед сайтом старту транскрипції (ССТ). Під час біоінформатичного пошуку та створення онРНК для проведення есперименту потрібно врахувати низку основних положень та правил.

Найперше, на що звертається увага при дизайні одиночних направляючих РНК є те, яка нуклеаза використовуватиметься для системи CRISPR активації, оскільки нуклеази різних типів та від різних мікроорганізмів впізнають неоднакові типи РАМ повторів. Найбільш часто використовуваною нуклеазою CRISPR систем є ендонуклеаза типу II (SpCas9), яка розпізнає 5'-NGG-3' РАМ послідовність. Іншою, нуклеазою, що користується популярністю, є ендонуклеаза типу Cas12a (Cpf1), яка розпізнає 5'-TTTV-3' РАМ послідовність [45,56].

По-друге, важливо розуміти, що дизайн одиночних направляючих РНК має залежати від призначення їх застосування. Наприклад, якщо онРНК підбираються для спрямування CRISPR/Cas системи для нокауту певних генів або для редагування геному шляхом негомологічного об'єднання ланцюгів ДНК, то такі направляючі послідовності кардинально відрізнятимуться від

тих, створених для активації або репресії транскрипції генів CRISPRa або CRISPRi системами. Наприклад, при нокаутуванні генів, направляючі РНК мають бути абсолютно специфічними до таргетного гену і не обов'язково в якійсь конкретній його ділянці, оскільки метою є пошкодження функції гена як такого. До того ж, обов'язковим є елімінування позатаргетних мішеней для цих онРНК на інших генах [57].

Більше того, використовуючи CRISPRa або CRISPRi системи, віддаленість комплементарної взаємодії онРНК щодо сайту старту транскрипції є важливим аспектом. Так, було показано [57], що максимальна активація транскрипції CRISPRa системою досягається тоді, коли онРНК спрямовують інструмент CRISPR/Cas до послідовностей в межах - 400 – - 50 п.о. вище ССТ.

А ефективність репресії CRISPRi системою є найбільшою, коли онРНК орієнтується на послідовності в межах + 50 – + 300 п.о. від сайту старту транскрипції [57].

Також, рекомендується підбирати одразу декілька онРНК до однієї мішені. Так, Farzadfard et al., застосовуючи dCas9-VP64 систему CRISPR активації та спрямовуючи її на промоторні діянки геному *Saccharomyces cerevisiae*, повідомили про синергетичний вплив на регуляцію транскрипції при використанні декількох онРНК та досягли підвищення активності (до 70 разів) репортерних генів [58].

Зрештою, довжина онРНК є вирішальним фактором для забезпечення цільової специфічності взаємодії CRISPRa системи. Відомо, що 17 п.н. є мінімальним розміром направляючої РНК для забезпечення дії системи. Тим часом, Kiani et al. [58], використовуючи опосередковану dCas-VP64 систему активації, підтвердили, що транскрипційна активність цільових генів, збільшується від 2- до 100- кратної активації, коли збільшували довжину направляючих РНК від 8 до 20 п.н. [58].

Проте, існує дві основні проблеми, які можуть стати на заваді ефективної активації експресії генів : потенційні позатаргетні ефекти та ефективність зв'язування направляючої послідовності з цільовою ділянкою [56].

Наразі існує чимало інструментів, для ефективного підбору онРНК, що дозволяють відкинути неспецифічні послідовності направляючих РНК, найбільш популярними є: CHOP-CHOP [59], sgRNAScorer [60], E-CRISP [61] та, власне CCTop - CRISPR/Cas9 [48], який був використаний нами при біоінформатичному аналізі. Однак, найбільш специфічна онРНК не обов'язково є найефективнішою [57]. Оскільки промоторні ділянки є невеликими за розміром послідовностями, то, часто інструменти для дизайну направляючих послідовностей не здатні підібрати великої кількості онРНК, які були б і специфічними і ефективними. Тому, як зазначається [57], іноді вибір на користь специфічних направляючих послідовностей може не дати бажаного результату в активації експресії генів-мішеней.

Загалом, в ході виконання експериментальної частини кваліфікаційної бакалаврської роботи, було відібрано унікальну колекцію онРНК, що ефективно зв'язуються із ділянками геному перед сайтом старту транскрипції кардіальних генів людини (*GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *Mef2c* і *HAND2*), та отримано дві перші плазмиди зі вставками послідовності онРНК до гену *Tbx5* - для бібліотеки одноланцюгових направляючих РНК, яка використовуватиметься для активації експресії генів кардіогенезу людини CRISPRa системою.

## ВИСНОВКИ

1. Проанізувавши низку літературних джерел, було з'ясовано, що основними генами – кардіогенезу людини є *GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *Mef2c* та *HAND2*.
2. Завдяки біоінформатичному аналізу створено перелік послідовностей кандидатів онРНК для основних кардіальних генів людини: *MyoD* - 283 кандидата, *Tbx5* - 540 кандидатів, *HAND2* - 257 кандидатів, *GATA* – 357 кандидатів, *Mef2C* – 383 кандидати.
3. Методами біоінформатичного аналізу перевірено ефективність та специфічність зв'язування відібраних направляючих послідовностей з цільовими промоторними ділянками генів-мішеней.
4. Підібрано по 4 одноланцюгові направляючі послідовності РНК, що потенційно ефективно зв'язуються із ділянками геному перед сайтом старту транскрипції генів кардіогенезу людини (*GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *Mef2c*, *HAND2*).
5. Проведено молекулярно-генетичне клонування послідовностей одноланцюгових направляючих РНК до генів *GATA4*, *MyoD*, *Tbx5*, *Mef2c*, *HAND2* та створено бібліотеку пДНК на основі вектора експресії Cas9sgRNA.
6. Отримано дві рекомбінантні конструкції на основі вектора Cas9sgRNA, із вставками послідовності *Tbx5/1* онРНК для активації ендогенної експресії гену *Tbx5*.

## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Sadahiro T. Direct Cardiac Reprogramming — Converting Cardiac Fibroblasts to Cardiomyocytes —. *Circ Reports*. 2019;1(12):564–7.
2. Chen Y, Yang Z, Zhao ZA, Shen Z. Direct reprogramming of fibroblasts into cardiomyocytes. *Stem Cell Res Ther*. 2017;8(1):1–8.
3. Cieślak-Pobuda A, Knoflach V, Ringh M V., Stark J, Likus W, Siemianowicz K, et al. Transdifferentiation and reprogramming: Overview of the processes, their similarities and differences. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2017;1864(7):1359–69.
4. Engel JL. Review Article Direct Cardiac Reprogramming: Progress and Promise. 2018;2018.
5. Harrison MM, Jenkins B V, Connor-giles KMO, Wildonger J. A CRISPR view of development. 2014;1859–72.
6. Ishino Y, Krupovic M, Forterre P. History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious. *J Bacteriol*. 2018;200(7):e00580-17.
7. Doudna JA, Charpentier E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* (80- ). 2014;346(6213).
8. Barrangou R, Horvath P. REVIEW ARTICLE A decade of discovery: CRISPR functions and applications. *Nat Publ Gr [Internet]*. 2017;2(June):1–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.92>
9. Han W, She Q. CRISPR History: Discovery, Characterization, and Prosperity [Internet]. Vol. 152, *Progress in Molecular Biology and Translational Science*. Elsevier Inc.; 2017. 1–21 p. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/bs.pmbts.2017.10.001>
10. Makarova KS, Wolf YI, Alkhnbashi OS, Costa F, Shah SA, Saunders SJ, et al. An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat Rev Microbiol*. 2015;13(11):722–36.
11. Makarova KS, Wolf YI, Iranzo J, Shmakov SA, Alkhnbashi OS, Brouns SJJ, et al. Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2

- and derived variants. *Nat Rev Microbiol*. 2020;18(2):67–83.
12. Karimi Z, Ahmadi A, Najafi A, Ranjbar R. Bacterial CRISPR Regions: General Features and their Potential for Epidemiological Molecular Typing Studies. *Open Microbiol J*. 2018;12(1):59–70.
  13. Gophna U, Brodt A. CRISPR/Cas systems in archaea: What array spacers can teach us about parasitism and gene exchange in the 3rd domain of life. *Mob Genet Elements*. 2012;2(1):63–4.
  14. Makarova KS, Wolf YI, Koonin E V. Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here? *Cris J*. 2018;1(5):325–36.
  15. Sander JD, Joung JK. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2014;32(4):347–50. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nbt.2842>
  16. Rath D, Rath D, Amlinger L, Rath A, Lundgren M. The CRISPR-Cas immune system : Biology , mechanisms and applications *Biochimie The CRISPR-Cas immune system : Biology , mechanisms and applications*. 2015;(April).
  17. Zhu Y, Huang Z. Recent advances in structural studies of the CRISPR-Cas-mediated genome editing tools. 2019;(November 2018):438–51.
  18. Arthur A, Johnson T, Rojo FP, Karl R, Nyman M, Theodore AA, et al. CRISPR-Cas systems : ushering in the new genome editing era. *Bioengineered* [Internet]. 2018;9(1):214–21. Available from: <https://doi.org/10.1080/21655979.2018.1470720>
  19. Raquel D, Rodríguez R, Solís RR, Alberto H, Saldaña B. Genome editing : A perspective on the application of CRISPR / Cas9 to study human diseases ( Review ). 2019;1559–74.
  20. Chen M, Qi LS. Repurposing CRISPR system for transcriptional activation. *Adv Exp Med Biol*. 2017;983:147–57.
  21. La Russa MF, Qi LS. The New State of the Art: Cas9 for Gene Activation and Repression. *Mol Cell Biol*. 2015;35(22):3800–9.
  22. Jiang F, Doudna JA. CRISPR – Cas9 Structures and Mechanisms. 2017;505–31.



23. Hoy MA. CRISPR-Cas Genome Editing: Another Revolution in Molecular Biology. *Insect Mol Genet*. 2019;345–61.
24. Dominguez AA, Lim WA, Qi LS. Beyond editing: Repurposing CRISPR-Cas9 for precision genome regulation and interrogation. *Nat Rev Mol Cell Biol* [Internet]. 2016;17(1):5–15. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nrm.2015.2>
25. Perez-Pinera P, Kocak DD, Vockley CM, Adler AF, Kabadi AM, Polstein LR, et al. RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors. *Nat Methods*. 2013;10(10):973–6.
26. Chavez A, Scheiman J, Vora S, Pruitt BW, Tuttle M, P R Iyer E, et al. Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming. *Nat Methods* [Internet]. 2015;12(4):326–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.3312>
27. Rawat N, Singh MK. Induced pluripotent stem cell: A headway in reprogramming with promising approach in regenerative biology. *Vet World*. 2017;10(6):640–9.
28. Fang L, El Wazan L, Tan C, Nguyen T, Hung SSC, Hewitt AW, et al. Potentials of cellular reprogramming as a novel strategy for neuroregeneration. *Front Cell Neurosci*. 2018;12(November):1–10.
29. Masip M, Veiga A, Belmonte JCI, Simón C. Reprogramming with defined factors: From induced pluripotency to induced transdifferentiation. *Mol Hum Reprod*. 2010;16(11):856–68.
30. Grath A, Dai G. Direct cell reprogramming for tissue engineering and regenerative medicine. *J Biol Eng*. 2019;13(1):1–15.
31. Patel M, Yang S. Advances in Reprogramming Somatic Cells to Induced Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Rev Reports*. 2010;6(3):367–80.
32. Kelaini S, Cochrane A, Margariti A. Direct reprogramming of adult cells: Avoiding the pluripotent state. *Stem Cells Cloning Adv Appl*. 2014;7(1):19–29.
33. E MBRYONIC S TEM C ELLS / I NDUCED P LURIPOTENT S TEM ( I PS ) C ELLS Concise Review : Reprogramming Strategies for Cardiovascular

- Regenerative Medicine : From Induced Pluripotent Stem Cells to Direct Reprogramming. 2014;448–57.
34. Santoro R, Perrucci GL, Gowran A, Pompilio G. Unchain My Heart: Integrins at the Basis of iPSC Cardiomyocyte Differentiation. *Stem Cells Int.* 2019;2019:1–20.
  35. Nguyen AH, Marsh P, Schmiess-Heine L, Burke PJ, Lee A, Lee J, et al. Cardiac tissue engineering: State-of-the-art methods and outlook. *J Biol Eng.* 2019;13(1):1–21.
  36. Muraoka N, Yamakawa H, Miyamoto K, Sadahiro T, Umei T, Isomi M, et al. MiR- 133 promotes cardiac reprogramming by directly repressing Snai1 and silencing fibroblast signatures. 2014;33(14):1565–81.
  37. Ofenbauer A, Tursun B. ScienceDirect Strategies for in vivo reprogramming. *Curr Opin Cell Biol* [Internet]. 2019;61:9–15. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2019.06.002>
  38. Ifkovits JL, Addis RC, Epstein JA, Gearhart JD. Inhibition of TGF $\beta$  signaling increases direct conversion of fibroblasts to induced cardiomyocytes. *PLoS One.* 2014;9(2).
  39. van Kampen SJ, van Rooij E. CRISPR Craze to Transform Cardiac Biology. *Trends Mol Med* [Internet]. 2019;25(9):791–802. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2019.06.008>
  40. Chakraborty S, Ji H, Kabadi AM, Gersbach CA, Christoforou N, Leong KW. A CRISPR/Cas9-based system for reprogramming cell lineage specification. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2014;3(6):940–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stemcr.2014.09.013>
  41. Weltner J, Balboa D, Katayama S, Bepalov M, Krjutškov K, Jouhilahti EM, et al. Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators. *Nat Commun.* 2018;9(1):1–12.
  42. Wang J, Jiang X, Zhao L, Zuo S, Chen X, Zhang L, et al. Lineage reprogramming of fibroblasts into induced cardiac progenitor cells by CRISPR/Cas9-based transcriptional activators. *Acta Pharm Sin B* [Internet].

- 2020;10(2):313–26. Available from:  
<https://doi.org/10.1016/j.apsb.2019.09.003>
43. Erin C. Dowd, M.D.a, Michael J. Frank, Ph.D.b, Anne Collins, Ph.D.c, James M. Gold, and Deanna M. Barch PD. 乳鼠心肌提取 HHS Public Access. *Physiol Behav.* 2017;176(12):139–48.
  44. <http://crispr-era.stanford.edu/>.
  45. Patrick HD, Eric LS, Zhang F. Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering Patrick. *Cell.* 2014;157(6):1262–78.
  46. Liu H, Wei Z, Dominguez A, Li Y, Wang X, Qi LS. CRISPR-ERA: A comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics.* 2015;31(22):3676–8.
  47. Konermann S, Brigham MD, Trevino AE, Joung J, Abudayyeh OO, Barcena C, et al. Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* [Internet]. 2015;517(7536):583–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/nature14136>
  48. Stemmer M, Thumberger T, Del Sol Keyer M, Wittbrodt J, Mateo JL. CCTop: An intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLoS One.* 2015;10(4):1–11
  49. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
  50. <https://www.addgene.org/protocols/>.
  51. Ieda M, Fu JD, Delgado-Olguin P, Vedantham V, Hayashi Y, Bruneau BG, et al. Direct reprogramming of fibroblasts into functional cardiomyocytes by defined factors. *Cell* [Internet]. 2010;142(3):375–86. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.07.002>
  52. Wang H, Cao N, Spencer CI, Nie B, Ma T, Xu T, et al. Small molecules enable cardiac reprogramming of mouse fibroblasts with a single factor, oct4. *Cell Rep* [Internet]. 2014;6(5):951–60. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2014.01.038>
  53. Nam YJ, Song K, Luo X, Daniel E, Lambeth K, West K, et al. Reprogramming of human fibroblasts toward a cardiac fate. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

- 2013;110(14):5588–93.
54. Ye T, Ravens S, Krebs AR, Tora L. Stem Cell Transcriptional Networks. *Methods Mol Biol* [Internet]. 2014;1150:141–52. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-0512-6>
  55. Yang J, Rajan SS, Friedrich MJ, Lan G, Zou X, Ponstingl H, et al. Genome-Scale CRISPRa Screen Identifies Novel Factors for Cellular Reprogramming. *Stem Cell Reports* [Internet]. 2019;12(4):757–71. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2019.02.010>
  56. Liu G, Zhang Y, Zhang T. Computational approaches for effective CRISPR guide RNA design and evaluation. *Comput Struct Biotechnol J* [Internet]. 2020;18:35–44. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.11.006>
  57. Vora S, Tuttle M, Cheng J, Church G. Next stop for the CRISPR revolution: RNA-guided epigenetic regulators. *FEBS J*. 2016;283:3181–93.
  58. Mohr SE, Hu Y, Ewen-campen B, Housden BE, Viswanatha R, Perrimon N. CRISPR guide RNA design for research applications. 2016;283:3232–8.
  59. <https://chopchop.cbu.uib.no/>.
  60. <https://sgrnascorer.cancer.gov/>.
  61. <http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>.

## ДОДАТКИ

Додаток А

Таблиця 1.3

Переваги та недоліки різних методів перепрограмування

Методи перепрограмування та способи доставки транскрипційних факторів	Переваги	Недоліки
Ретровірус	Висока ефективність перепрограмування	Ризики: - мутагенезу внаслідок вбудування вірусу в геном, - трансгенної реактивації залишкової експресії, - наявності вірусних частинок - дієві лише для клітин, що поділяються
Лентивірус	- висока ефективність перепрограмування - може бути використаний в клітинах, що поділяються і в тих, що не діляться	Ризики: - мутагенезу внаслідок вбудування вірусу в геном, - трансгенної реактивації залишкової експресії, - наявності вірусних частинок в перепрограмованих клітинах
Аденовірус	В геном клітини не інтегрує, або такий ризик незначний	- помірною ефективністю перепрограмування - необхідність повторних трансдукцій транскрипційними факторами

		- ризик наявності вірусних частинок в перепрограмованих клітинах
Вірус Сендай	- висока ефективність перепрограмування - не трансгенний, інтеграції в геном немає	Ризик наявності вірусних частинок в перепрограмованих клітинах
Звичайні та епісомальні плазміди	В геном не інтегрують	Дуже низька ефективність перепрограмування та необхідність повторних трансфекцій
Міні-кільцеві ДНК	- ефективність перепрограмування вища, ніж у звичайних плазмід - інтеграція в геном відсутня - відсутність вірусних частинок в клітині - бактеріальна основа відсутня	- низька ефективність перепрограмування - необхідність повторних трансфекцій
Транспозон piggyBac	- без вірусних частинок - теоретично можливо вирізати трансгени	- низька ефективність перепрограмування - додатковий етап вирізання транспозону - недосконалість вирізання та транспозиції - ризик індукованого мутагенезу, реактивації трансгенів та залишкової експресії - можливі взаємодії між piggyBac системою та ендогенними транспозонами
мРНК	- дуже висока ефективність перепрограмування - без вірусних компонентів	- необхідність повторних трансфекцій - висока собівартість

	- не трансгенні, інтеграція відсутня	
Білок	- не трансгенні, інтеграція відсутня - відсутність екзогенної нуклеїнової кислоти - без вірусних компонентів	Дуже низька ефективність
Низькомолекулярні сполуки	- не трансгенні - інтеграція відсутня - відсутність екзогенної нуклеїнової кислоти - без вірусних компонентів	- ще не були застосовані для перепрограмування людських клітин - помірна ефективність
Пряма трансфекція зрілими мікро РНК	- не трансгенні - інтеграція відсутня - без вірусних компонентів	Помірна ефективність
Лентивірусна доставка ДНК-кодуючих міРНК	Дуже висока ефективність	Ризики: - мутагенезу внаслідок вбудування вірусу в геном - трансгенної реактивації - залишкової експресії