

**МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ М.В.ЛОМОНОСОВА**

---

Биологический факультет  
Кафедра биоинженерии

**Разработка методов для характеристизации элементов  
логических генетических схем на основе системы  
CRISPR/dCas для регуляции работы генома**

Выпускная квалификационная работа бакалавра

Выполнила:

**Разинкова Анна Ильинична**

Научные руководители:

д.ф.-м.н, член-корр. РАН, профессор  
**Шайтан Алексей Константинович**

Аспирант 1г.о., м.н.с каф. биоинженерии  
**Мамаева Наида Юсуповна**

Москва, 2025

## Оглавление

<b>Список сокращений.....</b>	<b>3</b>
<b>1. Введение.....</b>	<b>3</b>
<b>2. Цели и задачи.....</b>	<b>4</b>
<b>3. Обзор литературы.....</b>	<b>4</b>
1. Понятие генетической схемы.....	4
2. Оптимизация культивирования клеток для измерения сигнала репортерной системы.....	5
3. Работа природных генетических схем на примере лактозного оперона прокариот.....	9
4. Разработка искусственных генетических схем.....	13
Элементы ген. схемы и их взаимодействия.....	13
5. Система CRISPR-Cas.....	16
6. Применение генетических схем.....	25
Устранение загрязнений.....	25
Диагностика и лечение заболеваний.....	26
Производство органического сырья.....	26
Разработка вычислительных систем на основе живых организмов	28
<b>4. Материалы и методы.....</b>	<b>29</b>
4.1 Плазмидная конструкция.....	29
4.2 Олигонуклеотиды.....	30
4.3 Проведение измерений в планшетном ридере.....	30
4.4 Приготовление сред.....	32
4.6 Трансформация клеток.....	33
4.7 Выделение плазмид из клеток.....	34
4.8 Проведение электрофореза в агарозном геле.....	35
4.9 Экстракция плазмида из геля.....	35
4.10 Клонирование методом GoldenGate.....	35
4.11 Расчёт количества клеток при известных значениях оптической плотности.....	35
<b>5. Результаты и обсуждение.....</b>	<b>37</b>
<b>6. Выводы.....</b>	<b>48</b>
<b>7. Список литературы.....</b>	<b>49</b>

## 1. Введение

По мере накопления знаний о метаболических путях различных организмов, а также об их механизмах и законах наследственности, у людей возникла потребность в практическом применении этих знаний. Поскольку устройство и функционирование метаболических путей регулируется генами разнообразных ферментов, транскрипционных факторов и др., то изменяя соответствующие гены, можно изменять существующие метаболические пути, добавлять новые, а также создавать совершенно новые организмы. Таким образом появилась концепция генетических сетей - взаимосвязанную систему генов, осуществляющую регуляцию определённых процессов или их частей. Следует отметить, что неофициально понятие генетической сети закрепилось за природными системами взаимодействующих генов, а за искусственно созданными - генетических схем. Конструируя и доставляя в клетки определённые генетические схемы, человек может получать организмы с заданными свойствами: определёнными метаболическими путями и биохимическими каскадами. Уже на сегодняшний день с помощью природных и синтетических генетических сетей решаются многие насущные проблемы человечества: детекция поллютантов в воде, переработка вторсырья, очистка почв и сточных вод, добыча металлов из руд, лечение заболеваний, массовое производство тех или иных белков, наработка векторов для исследовательских нужд и др. Однако синтетическая биология, занимающаяся в частности разработкой разнообразных генетических схем, сталкивается с некоторыми проблемами: метаболическая нагрузка, оказываемая генетическими сетями, взаимодействия с элементами генома клеток-хозяев [1], обеспечения взаимодействий между разными элементами синтетической генной сети [2] и др. Таким образом, имеется необходимость не только в реализации новых аспектов применения генетических сетей, но и в усовершенствовании методов

их конструирования, эксплуатации и функциональной оценки. Все эти аспекты синтетической биологии на сегодняшний день являются предметами исследований в научных сообществах разных стран.

## 2. Цели и задачи

Цель данной работы заключается в разработке и тестировании генетической схемы на основе системы CRISPR/dCas9 в клетках *E. coli*.

Задачи:

1. Выбор и оптимизация протокола для измерения эффективности работы генетических схем;
2. Дизайн и получение ДНК-конструкций, кодирующих логические генетические элементы;
3. Получение кривых роста и сигнала флуоресценции для разрабатываемой репортерной системы и генетической схемы различными методами;

### 3. Обзор литературы

#### 3.1 Понятие генетической схемы.

Генетическая схема представляет собой взаимосвязанную систему генов, осуществляющую регуляцию определённых процессов или их частей. Взаимодействия реализуются посредством взаимодействия продуктов генов друг с другом или с генами данной схемы. То же вполне корректно в отношении генетических сетей.

Различные генетические схемы являются одним из основных способов регуляции внутренних клеточных процессов, а также являются основой формирования поведения и реакций клеток на специфические внешние стимулы [3].

Генетические схемы достаточно широко распространены среди живых организмов и присутствуют как у прокариот, так и у эукариот, в том числе многоклеточных. Так, циркадные ритмы деления цианобактерий основаны на работе соответствующей генетической сети [4]. Также частично описана генетическая схема, обеспечивающая процесс формирования органов спороношения у протиста *Dictyostelium discoideum* [5]. Генетические схемы регулируют практически все процессы в живых организмах, начиная от дифференцировки клеток [6-7] и органогенеза [8] до формирования ответов на разнообразные изменения условий среды [9] и многих других процессов.

#### 3.2 Оптимизация культивирования клеток для измерения сигнала репортерной системы.

Культивирование микроорганизмов - одна из основных биоинженерных задач, так как позволяет обеспечивать лабораторию объектами, необходимыми для экспериментов. Модельные микроорганизмы (в данном случае - штаммы *Escherichia coli*) выращиваются на питательных средах. Питательные среды

должны отвечать потребностям микроорганизмов в питательных веществах, а иногда и в определённой структуре среды. Так, бактерии нуждаются в макроэлементах - углерод, азот, фосфор, кислород, водород, сера (компоненты белков, углеводов, жиров, нуклеиновых кислот), а также ионы калия, магния, натрия, кальция и железа, выполняющие разнообразные роли в метаболических процессах клеток. Среда также должна содержать микроэлементы - ионы хрома, кобальта, меди, молибдена, марганца, никеля, селена, вольфрама, ванадия, цинка (входят в состав ферментов и кофакторов). В качестве источников этих элементов добавляют их минеральные или органические соединения. Также (для ауксотрофных штаммов) необходимо добавлять в среду факторы роста (чаще всего витамины, азотистые основания и аминокислоты).

Все среды делят на:

- 1) Натуральные - содержат компоненты, выделенные из других организмов, и оттого имеют сложный непостоянный состав;
- 2) Синтетические - имеют известный и постоянный химический состав.

Также среды по агрегатному состоянию и текстуре можно разделить на:

- 1) Жидкие - раствор или суспензия веществ в воде;
- 2) Твёрдые - жидкое с добавлением отвердителя - агара, силикагеля и т.д.;
- 3) Сыпучие - органический или минеральный сыпучий наполнитель, пропитанный жидкостью средой.

При периодическом культивировании клетки помещают в закрытый сосуд определенного объема, содержащий питательную среду, и задают начальные условия - частоту перемешивания, температуру и наличие дополнительных веществ (например, токсинов при измерении их эффективности). Развитие культуры приводит к постепенной смене условий существования микроорганизмов: увеличивается плотность популяции, снижается концентрация питательных веществ и накапливаются продукты

обмена. Периодическую культуру можно рассматривать как замкнутую систему, которая проходит разные фазы своей жизни: каждая фаза характеризуется определенными физиологическими параметрами.

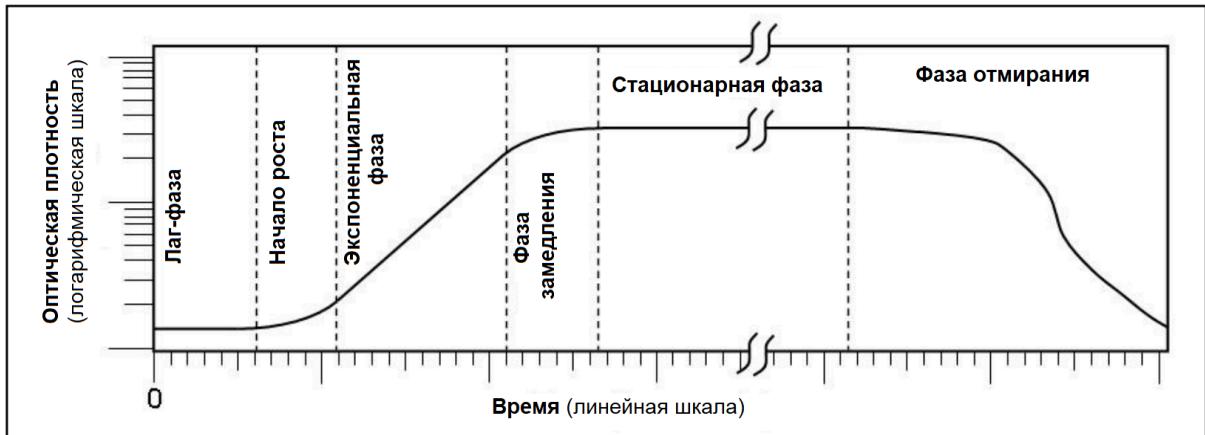
1) Лаг-фаза — это фаза «привыкания» клеток к среде, при этом происходит увеличение количества ДНК и РНК и индукция синтеза соответствующих ферментов. Лаг-фаза удлиняется, если брать старый посевной материал и переносить клетки в совершенно новую по составу среду. Лаг-фаза сокращается (или может совсем отсутствовать), если активные молодые клетки перенести в свежую среду того же состава и той же температуры. На средах, содержащих смесь субстратов, наблюдается диауксия, при которой после исчерпания одного субстрата культура переходит во вторую лаг-фазу для подготовки к потреблению другого субстрата.

2) Экспоненциальная фаза - клетки растут и делятся с максимальной скоростью, их рост не ограничен.

3) Фаза замедления роста - по мере исчерпания субстратов и накопления продуктов обмена скорость роста снижается.

4) Стационарная фаза - в течение которой процессы деления и отмирания клеток в популяции находятся в динамическом равновесии (уравновешены).

5) Фаза отмирания - число клеток в популяции постепенно снижается, так как исчерпание питательных веществ и накопление продуктов метаболизма достигают неких пороговых концентраций. Фаза отмирания обычно имеет логарифмический характер [10].



**Рис.1. Кривая роста бактериальной культуры [11 с изм.].**

3.3 Работа природных генетических схем на примере лактозного оперона прокариот.

Одной из наиболее детально изученных природных генетических схем является лактозный оперон бактерий [12]. Общеизвестная схема лактозного оперона у *E. coli* включает в себя кластер генов, которые индуцируемых и репрессируемых под действием субстрата. Ген lacI имеет свои промотор и терминатор. Конец района lacI непосредственно примыкает к промотору P<sub>lac</sub>, оператор O<sub>lac</sub> занимает первые 26 п.н. гена lacZ. После гена lacZ расположены гены lacY и lacA, а также общий терминатор транскрипции. Гены имеют следующие функции: продукт lacZ расщепляет бета-галактозид на составляющие его сахара, продукт гена lacY является бета-галактозид-пермеазой, он транспортирует бета-галактозид в клетку. Ген lacA кодирует белок трансацетилазу — фермент, переносящий ацетильную группу с ацетил-СоА на бета-галактозид. При этом транскрипция генов lacZ, lacY, lacA контролируется негативно: транскрипция их идет до тех пор, пока не выключается белком-репрессором (LacI - продуктом гена lacI). Сам ген lacI не входит в состав оперона, и конститтивно транскрибируется с собственного промотора, являясь, таким образом, транс-действующим белком. Мутации по lacI обусловливают конститтивную транскрипцию полигенной

последовательности из генов lacZ, lacY, lacA. LacI связывается с оператором Olac и таким образом стерически блокирует работу РНК-полимеразы, предотвращая инициацию транскрипции всего оперона. Белок LacI имеет два сайта связывания: один для индуктора, другой для оператора. Когда индуктор (лактоза) поступает в клетки и связывается со своим сайтом, это изменяет конформацию молекулы белка, в результате чего нарушается связывающая способность другого сайта. В результате репрессор становится не способным сдерживать транскрипцию и она начинается. Позитивная регуляция лактозного оперона осуществляется с помощью продуктов 2-х генов: cya, продуктом которого является аденилат-циклизаза, переводящую АМФ в его циклическую форму (цАМФ); и cap - его продуктом является белок CAP (catabolite activator protein). При усиленном расходовании АТФ клеткой повышается концентрация АМФ, а за счёт работы аденилатциклизазы – и цАМФ. CAP образует комплекс с цАМФ, и связывается со своим сайтом на промоторе lac-оперона, что приводит к увеличению аффинности РНК-полимеразы к промотору, а потому и усилию транскрипции [13].

Однако по мере дальнейшего изучения данной регуляторной системы выяснились дополнительные, хотя и не исчерпывающие, подробности её функционирования.

### ***Сайты связывания LacI (негативная регуляция)***

Имеются три сайта связывания LacI: оператор (Olac), нижележащий сайт (Olac2), и вышележащий сайт (Olac3) (в данном контексте выше- и нижележащий сайты соответствуют участкам ДНК, расположенным против и по направлению транскрипции относительно Olac). Olac2 и Olac3 необходимы для усиления оператор-репрессорного взаимодействия, являясь своеобразными энхансерными элементами. Несмотря на то, что Olac2 и Olac3 имеют меньшее средство к LacI (относительно оператора), они играют важную роль в ингибировании транскрипции: было показано, что у клеток, содержащих мутантные последовательности Olac2 и Olac3 транскрипция оперона шла

конститутивно [14]. Эксперименты с диметилсульфатными метками показали, что два дополнительных сайта, вероятно, формируют вместе с ингибиторным белком петлю на ДНК, способствующую лучшему закреплению ингибитора на операторе [15].

### ***CAP-сайты связывания (позитивная регуляция)***

CAP активирует транскрипцию lac-оперона в результате связывания с сайтом связывания, расположенным примерно на 61.5 п.н. выше места транскрипции [16-17]. Однако, было показано, что CAP также может связываться с участком оператора, расположенным между -1 и -11 п.н. [18], но с меньшей аффинностью, чем с сайтом. Данные относительно роли нижерасположенного сайта в регуляции транскрипции неоднозначны: по одним результатам, CAP при связывании с этим сайтом может ингибировать функцию промотора (избыток CAP снижает транскрипцию lac-оперона) [19]; тем не менее большая часть других исследований показывают, что мутации по этому сайту не оказывают влияния (либо влияние почти пренебрежимо мало) на активацию транскрипции CAP-белком [20-21]. Однако показано, что мутации по данному сайту связывания, повышающие его аффинность к CAP, позволяют CAP-белку втрое снижать уровень транскрипции lac [22]. Возможно, наличие второго сайта не имеет особого значения, поскольку связывающий мотив CAP-ДНК схож с таковым LacI-ДНК [23].

### ***Сайты связывания РНК-полимеразы***

Промотор lac-оперона был первой отсеквенированной последовательностью, узнаваемой РНК-полимеразой [16]. Все полигенные последовательности lac-оперона начинаются с одной и той же стартовой точки, хотя показано также наличие нескольких близкорасположенных сайтов - такой уровень неопределенности характерен для многих промоторов. Однако на настоящий момент известно, что существует как минимум 5 промотор-подобных последовательностей, перекрывающих уже изученный промотор (назовём его P1). Физиологическая функция этих пяти

последовательностей на данный момент неизвестна. Первые две последовательности расположены выше P1 (обозначим их P2 и P3), остальные три - ниже (обозначим их P-2A, P-HA и P+10A, соответственно). В экспериментах *in vitro*, РНК-полимераза связывается и инициирует транскрипцию со стартовой точки, расположенной на -22 п.н. (относительно стартовой точки P1) [24-25]. Эта область (P2) обладает наибольшей активностью *in vitro* при отсутствии CAP, а в присутствии CAP репрессирована. P2 и дополнительный промотор-подобный элемент (P3), кодирующий транскрипты с позиции -15 п.н., выражены как слабые промоторы *in vivo* при наличии мутаций по P1 [20]. P2 и P3 репрессируются CAP в экспериментах *in vivo* [20]. Возможно, что P2 (и предположительно, P3) могут играть роль в CAP-активации P1 [25-26]. Так, комплексы непродуктивной РНК-полимеразы и P2 блокировали доступ РНК-полимеразы к P1, тогда CAP блокирует связывание РНК-полимеразы и P2, косвенно активируя P1. Однако, такой механизм не может играть основную роль в активации P1 белком CAP: мутации, инактивирующие P2, не активируют P1 [27-28], тем более что были изолированы мутанты по CAP, подавляющие P2 и P3, но не способные активировать P1 [29]. У Lac<sup>+</sup> псевдоревертантов мутантных штаммов CAP<sup>-</sup>, а также у штаммов, мутантных по P1 (P1<sup>-</sup>), были активированы три нижележащих промоторных элемента [26; 30-31]. Замена гуанина в положении -2 на аденин (P-2A) активирует промотор, инициирующий транскрипцию на +11, а замена аденина на тимин в положении +1 (P+1T) активирует промотор со стартовым сайтом на +13. Наконец, замена цитозина на аденин в положении +10 (P+10A) активирует дополнительный промотор. При этом, поскольку P2 и P3 расположены выше, в данных экспериментах их активация не была отмечена, поскольку их транскрипты не нарабатывались [32]. Функция P2 и P3 в контексте штаммов дикого типа неизвестна. lac промотор (P1), как и прочие промоторы, расположен в А/Т-богатой последовательности, вероятно для облегчения локального плавления ДНК, необходимого для инициации

транскрипции. Промотор-специфичные последовательности также богаты А и Т, таким образом, наличие промотор-подобных последовательностей может оказаться случайным совпадением, обусловленным высоким содержанием А и Т возле основного промотора. Поскольку промоторы в основном расположены в А/Т-богатых участках последовательности, вероятно, и другие промоторы могут иметь в непосредственной близости промотор-подобные элементы (примеры - см. [33]). Также допускается, что такого рода скопления промотор-подобных участков возле промотора служит для более эффективного рекрутирования к нему РНК-полимеразы. Наконец, независимо от истинной функции этих элементов, они являются возможными местами возникновения в клетке новых промоторов (в результате мутаций) для lac-оперона, позволяющих разным штаммам по-разному реагировать на одни и те же сигналы.

Таким образом, природные генные сети представляют из себя довольно сложно устроенные системы, механистические детали работы которых до сих пор выяснены не полностью, хотя это, как правило, не мешает устанавливать соответствия между комбинациями регуляторных молекул и определёнными ответами системы на внешний стимул. Вероятно, большая часть генетических регуляторных систем имеет схожий с lac-опероном уровень сложности строения [12].

### 3.4 Разработка синтетических генетических схем

Генная схема, теоретически, может включать в себя неограниченное число генов и генетических конструкций. Однако, поскольку генетическая схема приносится в клетки (про- или эукариотические) извне, следует учитывать возможные ограничения, связанные с использованием определённых векторов и способов трансформации (трансфекции). Как правило, исследователи работают с генетическими схемами, используя прокариотические клетки, а именно *E. coli*. В большей части исследований генетические

конструкции находятся на одной плазмиде [34-38], реже - на двух и более [1]. Вероятно, это связано с трудностями трансформации бактериальных клеток несколькими плазмидами.

### 3.4.1 Элементы генетической схемы и их взаимодействия.

Для обеспечения правильной работы генетических схем на плазмиде очень важно правильно подобрать её составные части. Главными частями бактериальной плазмиды являются:

1) Ориджин (ORI) - последовательность, с которой начинается репликация плазмиды; место сборки реплисом. Обладает копийностью - характеристикой, отражающей количество копий плазмиды с данным ориджином в клетке [39]. Являются А-Т богатыми участками - для облегчения инициации репликации.

2) Промоторы - участки, с которых начинается транскрипция генов, находящихся между промотором и терминатором (в открытой рамке считывания, или ОРС). У бактерий состоит из нескольких элементов:

1. Элемент -10 (Прибнов-бокс) - расположен на 10 п.о. дальше места начала транскрипции, его консенсусная последовательность ТАТААТ.

2. Элемент -35 - имеет консенсусную последовательность TTGACA

Данные два элемента, как правило, разделены примерно 17 парами оснований. Следует также отметить, что природные промоторы, как правило, по последовательности не совпадают полностью с консенсусными [40], что влияет на силу промотора - частоту инициации транскрипции с данного промотора.

3) Сайты связывания рибосом - участок, состоящий из инициирующего кодона и последовательности Шайна-Дальгарно. Характеризуется силой - частотой инициации трансляции с данной последовательности на данной мРНК [41].

4) Репортерные гены - гены, использующиеся для разнообразных целей, зависящих от конкретного исследования, в том числе получение белка,

миРНК, сборка репортерной системы, возможность проведения сине-голубой селекции и т.д.

5) Терминаторы - нуклеотидная последовательность ДНК, на которой завершается транскрипция гена или оперона. Как правило, последовательность терминатора такова, что комплементарная ей последовательность в мРНК вызывает выход синтезированного транскрипта из транскрипционного комплекса. Эта последовательность в мРНК может сама по себе вызывать терминацию за счёт собственной вторичной структуры, а может привлекать особые белки — факторы терминации. Терминаторы также характеризуются силой - способностью терминировать синтез нукleinовой кислоты или белка.

У бактерий и фагов наблюдается  $\rho$ -зависимый механизм терминации.  $\rho$ -зависимые терминаторы функционируют посредством особого белка —  $\rho$ -фактора, который обладает РНК-хеликазной активностью и разрушает комплекс ДНК, мРНК и РНК-полимеразы.  $\rho$ -зависимые терминаторы встречаются у бактерий и фагов.  $\rho$ -зависимые терминаторы находятся ниже стоп-кодона, на котором завершается трансляция, и представляют собой неструктурированные, обогащённые цитозином последовательности в мРНК, известные как *rut*-сайты (от англ. *Rho utilization site*), после которых находятся точки остановки транскрипции (англ. *tsp* от *transcription stop point*). Консенсусная последовательность для *rut*-сайтов не установлена. *Rut*-сайт выступает в роли места посадки  $\rho$ -фактора на мРНК и его активатора. Активированный  $\rho$ -фактор начинает гидролизовать АТФ и за счёт энергии гидролиза движется вдоль мРНК, пока не столкнётся с РНК-полимеразой, остановившейся на *tsp*-сайте. Контакт между  $\rho$ -фактором и РНК-полимеразой стимулирует распад транскрипционного комплекса за счёт аллостерических эффектов  $\rho$ -фактора на РНК-полимеразу [42].

#### Взаимодействие ген. схемы и клетки.

При разработке генетических схем следует учитывать разнообразные факторы, влияющие на взаимодействие генетических схем с таковыми

клетки-хозяина. Так, хранение, передача дочерним клеткам и реализация информации (в ходе репликации, транскрипции и трансляции соответственно), кодируемой генетической схемой, требует затрат клеточных ресурсов и энергии, имеющиеся у клетки. В связи с этим ресурсы будут распределяться между метаболическими процессами, относящимися к функционированию собственных систем клетки и внедрённой плазиды. Следовательно, при определённых условиях реализация работы репортерной системы потребует такого количества ресурсов, что собственные процессы жизнедеятельности клетки будут в той или иной степени затруднены, а это, в свою очередь, проявляется в виде замедления темпов роста клеточных культур и нарушениях в работе внедрённой схемы. Данное явление характеризуется как повышенная метаболическая нагрузка системы на клетку и наблюдается при трансформации нескольких плазмид в одну клетку, использовании больших или высококопийных плазмид, а также большое количество белок-кодирующих генов, экспрессируемых в рамках репортерной системы. Этот эффект следует учитывать при разработке генетических схем с целью получения сигнала достаточной интенсивности при работе репортерной системы, а также для обеспечения сбалансированного потребления ресурсов при синтезах мРНК, плазмидной ДНК и белков, имеющих отношение к репортерной системе. Это позволяет снизить метаболическую нагрузку на клетки и оптимизировать работу генетической схемы. Достичь этого можно как с помощью подбора силы промоторов, сайтов связывания рибосом и других элементов, так и с помощью размещения определённых элементов ген. схем на плазмidaх разной копийности [43].

Значительный вклад вносит и изменчивость клеток в рамках одной культуры: даже при посеве на питательную среду одной колонии в конечной культуре могут образоваться группы клеток, в той или иной степени отличающиеся друг от друга (в том числе по “метаболическому статусу” работы репортерной системы). Для снижения изменчивости применяется перенос

клеток с одной жидкой среды на другую [43]. В результате переноса популяция клеток сокращается, предположительно, в результате резкого изменения состава среды, а также в результате центрифугирования.

### 3.5 Система CRISPR-Cas

Система CRISPR-Cas основана на прокариотическом механизме защиты от чужеродных генетических элементов, таких как вирусы и транспозоны. В основе данной системы лежит использование малых направляющих РНК (гРНК) в качестве интерферирующих агентов в отношении чужеродных мобильных генетических элементов (МГЭ). CRISPR-Cas состоит из CRISPR-локуса, в котором находятся короткие повторы, разделённые уникальными последовательностями (спейсерами), получаемыми из МГЭ (вирусов, транспозонов или плазмид). Локусу CRISPR предшествует АТ-богатая лидерная последовательность. Локус также фланкирован набором генов, кодирующих Cas белки. На настоящий момент, Cas-системы классифицируются на два класса, каждый, в свою очередь, разделён на типы и подтипы. Классификация осуществляется по принципу сходств и различий в Cas-белках, осуществляющих иммунный ответ путём разрезания чужеродных последовательностей. К первому классу (типы I, III и IV), относятся системы, в которых Cas является мультибелковым комплексом, в то время как ко второму классу (типы II, V и VI) – те, в которых эффекторная молекула включает один белок (Cas). Поскольку в системах CRISPR/Cas 2-го класса эффекторная единица состоит из всего одного белка, что значительно упрощает его наработку. Благодаря этому системы 2-го класса гораздо больше распространены в исследовательской деятельности, чем системы 1-го класса. Из всех систем класса 2 система типа II, к которой относится dCas9 белок, отличается наибольшей эффективностью, что делает её основной системой для проведения различных молекулярно-генетических процедур [44].

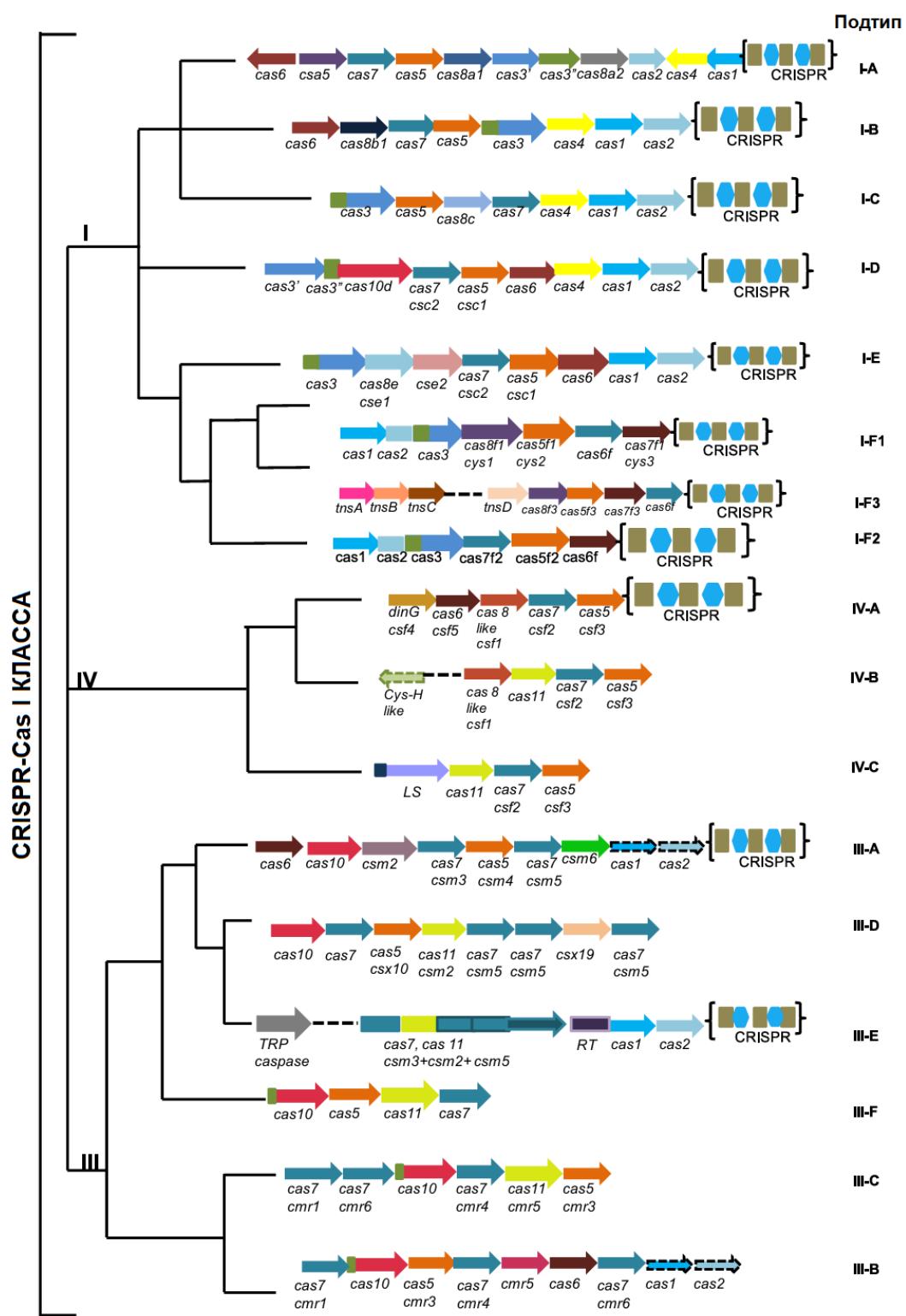
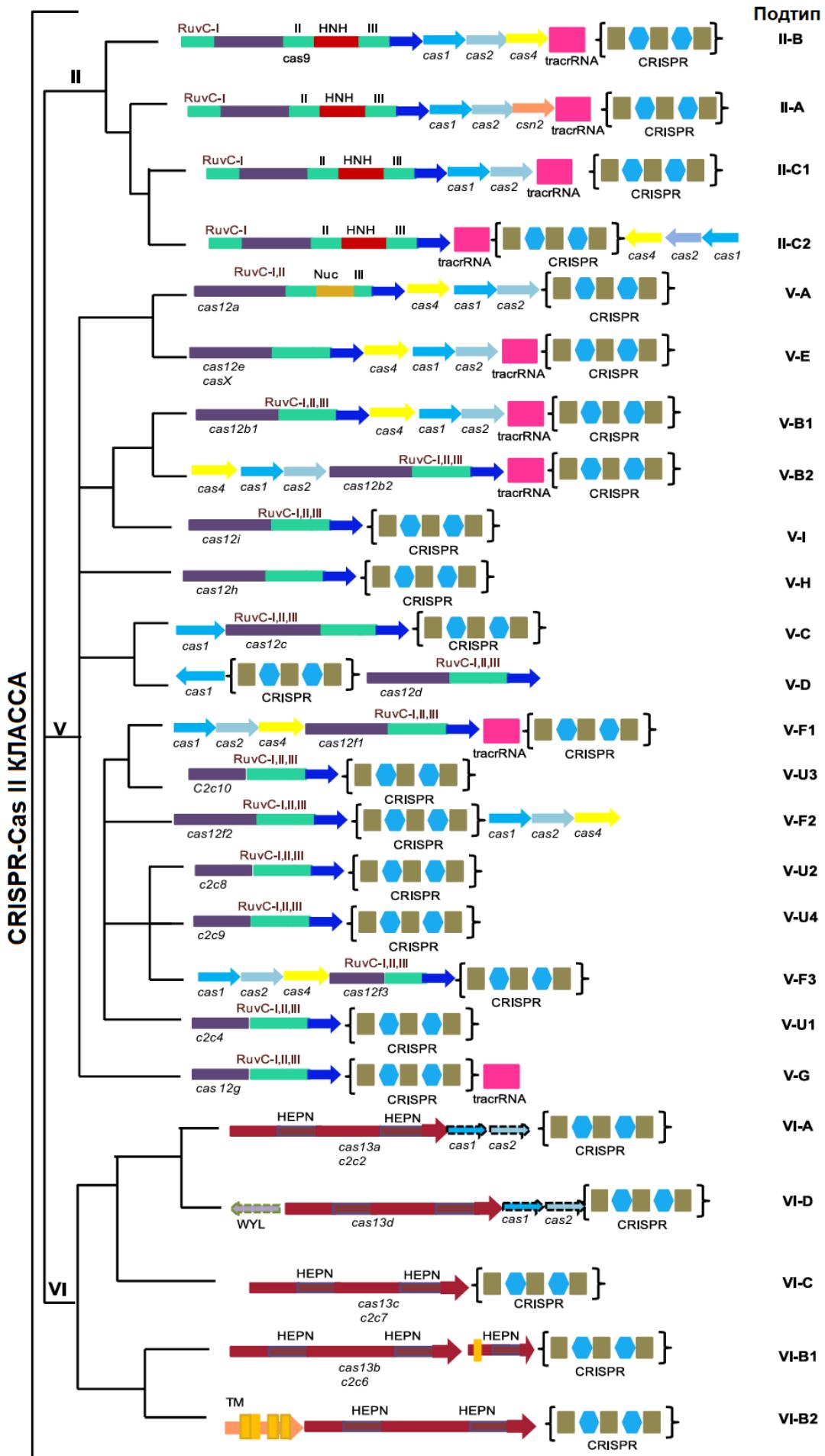


Рис.2. Классификация CRISPR-Cas систем I класса [45].



### ***Рис.3. Классификация CRISPR-Cas систем II класса [45].***

#### **Механизм действия системы CRISPR-Cas.**

Система CRISPR-Cas работает, специфично узнавая и расщепляя чужеродные ДНК или РНК. Защита клетки осуществляется в 3 этапа: (1) адаптация (или получение спайсера), (2) биогенез crРНК, (3) направленная интерференция. Во время адаптации определённая последовательность МГЭ, называемая протоспайсером, встраивается в CRISPR-кассету, таким образом становясь спайсером. Это событие позволяет клетке-хозяину запомнить генетический материал МГЭ, и адаптироваться к повторному попаданию данного патогена в клетку.

#### **Адаптация**

В получении спайсера участвуют белки Cas1 и Cas2, которые присутствуют в подавляющем большинстве типов CRISPR-Cas системы. Исключениями являются типы III-C, III-D и IV CRISPR-Cas системы, не содержащие гомологичных белков. Ко всему прочему, тип V-C состоит только из белка C2C3, предположительно являющегося эффектором, и гомолога Cas1. Несмотря на многочисленные исследования, проясняющие биохимические и генетические принципы CRISPR-Cas-опосредованного иммунитета, механизм выбора и процессинга спайсеров клеткой изучен не до конца. Что же касается встраивания спайсера, то Cas1 и Cas2 (в типе I-E бактерий *Escherichia coli*) образуют комплекс, способствующий интеграции новых спайсеров в CRISPR-кассету по принципу, схожему с таковым у транспозаз и интеграз. Новый спайсер обычно встраивается возле лидерной последовательности CRISPR-кассеты, что сопровождается дупликацией первого повтора кассеты. Принципы работы систем CRISPR-Cas являются лишь частично консервативными у разных прокариотических клеток, поскольку выявлены некоторые различия в требованиях к спайсерам у систем разных типов. В

наиболее изученной системе типа I, белков Cas1 и Cas2 достаточно для встраивания спайсера, однако в типе I-B для интеграции требуется также белок Cas4. Тип I-F CRISPR-Cas системы, обнаруженный у *Pseudomonas aeruginosa*, характеризуется тем, что молекулярная машина, осуществляющая интерференцию, также способствует получению новых спайсеров. Сходным образом, системе типа II-A требуются Csn2, Cas9 и tracrPHK (транс-активирующая CRISPR PHK) для встраивания. Несколько другой способ адаптации выявлен для Cas1 белка в типе III-B, - Cas1 соединён с обратной транскриптазой. Для этой же системы характерно получение спайсеров и из ДНК, и из РНК. Отбор последовательностей для интеграции в CRISPR локус не случаен. В типах I, II и V рядом с протоспайсером должен располагаться короткий мотив, называемый РАМ (protospacer adjacent motif – прилежащий к протоспайсеру мотив), необходимый для встраивания спайсера и осуществления интерференции. В типе II-A отбор спайсеров осуществляется с помощью РАМ-узнавающего домена белка Cas9. Предположительно, после отбора спайсера Cas9 рекрутирует Cas1, Cas2 и Csn2 для интеграции нового спайсера в кассету. Такой механизм встраивания может быть характерен для всех систем II-го типа, однако эта гипотеза требует экспериментальных доказательств. Что касается типа I-E, то Cas1–Cas2 комплекс достаточно для селекции и интеграции спайсера, однако по последним данным, наличие интерферирующего комплекса увеличивает частоту встраивания спайсеров с РАМ. Ко всему прочему, в процессе праймирования интерферирующий комплекс некоторых CRISPR-Cas систем типа I может стимулировать забор новых спайсеров из протоспайсеров, содержащих участки комплементарности с их crPHK (т.е. встроенных во время первой инфекции данным МГЭ). Этот процесс имеет, по сравнению с получением спайсера от нового патогена, сильно отличающийся механизм адаптации, так как требует существования ранее полученного спайсера от этого же инфекционного агента. Благодаря праймированию повышается частота встраивания спайсеров, расположенных

близко к ранее полученным. Следует заметить, что адаптация через праймирование не требует разрезания целевой последовательности и функционирует для дегенерировавших сайтов связывания, что в обычном случае снижало бы эффективность интерференции. На данный момент точный механизм не известен, однако показано, что интерферирующий комплекс способен рекрутировать Cas1 и Cas2 во время РАМ-независимого связывания ДНК.

## Биогенез

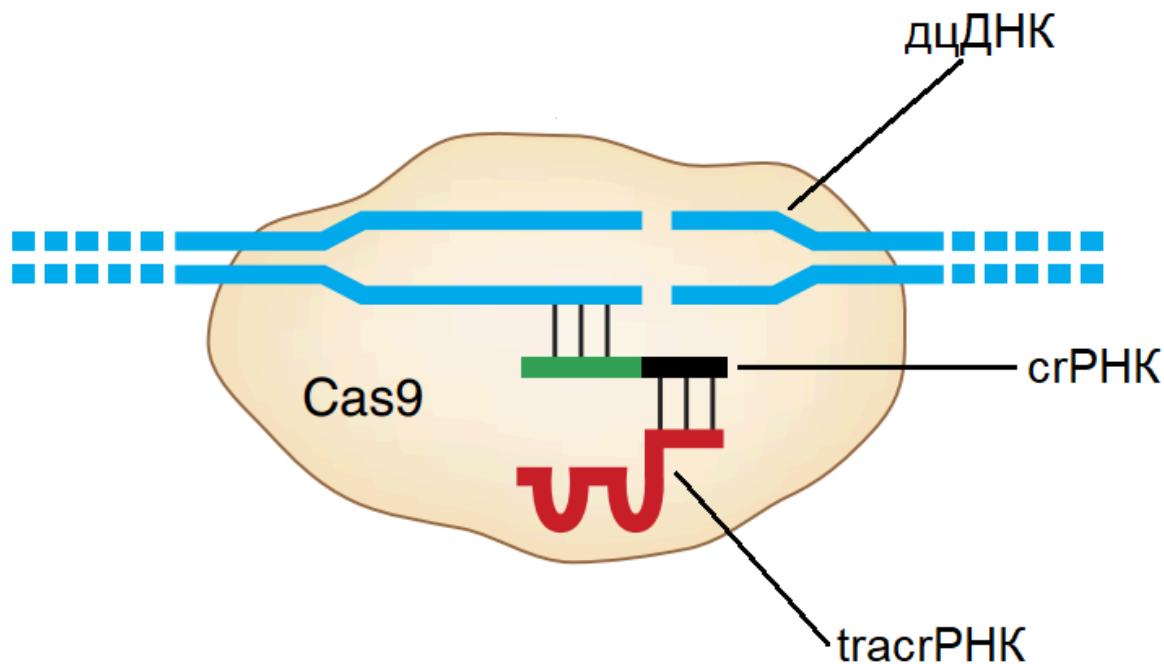
Для осуществления иммунного ответа, CRISPR-кассета транскрибуируется как длинная прекурсорная crРНК (pre-crРНК), которая при процессинге становится зрелой гидовой crРНК, содержащей части последовательностей инфекционных агентов. В системах I и III типов, белки Cas6 семейства процессируют pre-crРНК с образованием промежуточных crРНК, фланкированных коротким 5'-концевым «хвостом». Исключение составляют системы типа I-C, не кодирующие Cas6 белков. Вместо этого процессинг осуществляется белком Cas5d с образованием промежуточной crРНК с 11-нуклеотидным 5'-концевым «хвостом». Далее часть 3' конца промежуточной crРНК отщепляется, и образуется зрелая crРНК, состоящая из 5'-концевой спейсерной последовательности и последовательности повтора на 3'-конце, последний обычно имеет структуру шпильки в большинстве систем I типа. Созревание crРНК в системах 2ого класса значительно отличается, поскольку требует наличия трансактивирующей РНК для процессинга pre-crРНК. Антисмысловая последовательность повтора, содержащаяся в этой РНК, позволяет сформировать РНК-дуплекс с каждым из повторов pre-crРНК, стабилизируемый белком Cas9. Дуплекс, в свою очередь, узнаётся и процессируется РНКазой III клетки-хозяина с образованием промежуточной crРНК, которая созревает по неизвестному на данный момент механизму и становится малой гидовой РНК. В системе типа II-C (обнаружен у *Neisseria*

*meningitidis*) механизм созревания не требует РНКазы III. В каждом повторе кассеты были обнаружены промоторные последовательности, некоторые из которых инициировали транскрипцию с образованием промежуточных crРНК. Несмотря на наличие РНКаза-III-опосредованного 3'-концевого процессинга дуплекса crРНК: tracrРНК, этот процесс не был значим для интерференции. В CRISPR-Cas типа V-A, белок Cpf1 выполняет несколько функций при обеспечении иммунитета. Cpf1 участвует в процессинге незрелых crРНК, а также использует зрелые crРНК для разрезания целевой последовательности.

## **Интерференция**

На последней стадии иммунного ответа crРНК используются для поиска чужеродных нуклеиновых кислот и их специфичной интерференции. Системы 1ого класса используют комплексы, схожие с CRISPR-ассоциированными комплексами для противовирусной защиты (Cascade) для деградации целевой последовательности. В то же время в системах 2ого класса для осуществления интерференции достаточно одного эффекторного. Для предотвращения интерференции с собственной CRISPR-кассетой, в типах I, II и V узнаются РАМ сайты, расположенные до (типы I и V) или после (тип II) протоспейсера. В системах III типа спейсер и протоспейсер отличаются друг от друга при помощи 5' «хвоста» зрелой crРНК, который не должен совпадать с целевой последовательностью для обеспечения деградации комплексом. В системах I типа Cascade проводит crРНК-зависимое обнаружение вторгающихся МГЭ и рекрутирует нуклеазу Cas3 для деградации целевой последовательности. Cas3 вносит одноцепочечный разрыв в чужую ДНК, что ведёт к деградации последней. Что касается систем II типа, tracrРНК:crРНК дуплекс направляет эffекторный белок Cas9 к целевой последовательности, после чего Cas9 вносит в целевую ДНК двуцепочечный разрыв, для чего у него имеется два эндонуклеазных домена: RuvC и HNH, разрезающих нетаргетную и таргетную цепи, соответственно (таргетная цепь ДНК содержит последовательность,

узнаваемую эфекторным комплексом, нетаргетная комплементарна таргетной) [45] (см. рис.2). Следует отметить, что в исследовательских и биотехнологических целях зачастую используются не комплексы crPHK:tracrPHK, а sgPHK, которая представляет собой crPHK и tracrPHK, соединённые в единую молекулу коротким рибонуклеотидным линкером. Последовательность всей sgPHK (гРНК) может быть закодирована в геноме как отдельный ген, не требуя имитации нативного окружения (CRISPR-кассеты).



*Рис.4. Строение комплекса Cas9:гРНК:ДНК [45 с изм.].*

Интерференционная машинерия в системах типа III содержит Cas10-Csm (типы III-A и III-D) или Cas10-Cmr (типы III-B и III-C) комплекс, способные осуществлять интерференцию как ДНК, так и РНК. Было показано, что интерференция в типах III-A и III-B зависит от транскрипции целевой ДНК. Cas10 субъединица разрезает ДНК, в то время как Csm3 и Cmr4 разрезают транскрипты этой ДНК в системах типов III-A и type III-B, соответственно. Интерференция в системах типа V CRISPR-Cas схожа с таковой в типе II. Дуплекс tracrPHK:crPHK строго необходим для разрезания целевой

последовательности в V-V системах. Однако в типе V-A, используются crРНК для локализации и деградации целевой последовательности.

В исследовательской практике широкое применение нашли не только Cas белки с нуклеазной активностью, но и их мутанты. Так, мутант dCas9, не имеющий нуклеазной активности, используется для нахождения определённых участков генома, а также в методе CRISPRi. Данный метод основан на том, что связавшийся с определённым участком dCas/sgRNA комплекс способен стерически подавлять продвижение РНК-полимеразы по ДНК, а значит, блокировать транскрипцию. Метод CRISPRi используется для подавления или регуляции транскрипции определённых генов [46].

### 3.5.1 Механизм связывания Cas9/гРНК с дЦДНК.

Поскольку Cas9 наиболее часто используется в биоинженерии, а также в силу того, что dCas9 отличается от нативного Cas9 всего двумя точечными мутациями (D10A и H840A), а значит, их структуры и принципы связывания ДНК должны быть схожи, имеет смысл рассмотреть механизм связывания ДНК эффекторным комплексом на примере системы, включающей Cas9 (2 тип, II класс). После связывания Cas9 белком своей гРНК, образовавшийся комплекс способен узнавать и связываться с целевой последовательностью ДНК. Необходимыми условиями для связывания с целевой последовательностью являются: 1) комплементарность между 20-нуклеотидной спайсерной частью гРНК и целевой последовательностью ДНК, и 2) наличие консервативного РАМ (мотива, расположенного возле протоспайсера) возле сайта связывания. РАМ необходим для отличия собственного спайсера в кассете (либо схожих последовательностей генома) от частей чужеродного генома. Однонуклеотидные мутации в РАМ приводят к утрате нуклеазной активности Cas9/гРНК комплекса *in vitro*. Для широко используемого Cas9

белка, выделенного из *Streptococcus pyogenes*, характерная РАМ последовательность имеет вид 5'-NGG-3', где N - любой из 4x ДНК-нуклеотидов. Было показано, что комплекс Cas9/гРНК ищет целевые последовательности, сначала опознавая РАМ мотив, и после этого "проверяя" фланкирующую последовательность ДНК на наличие комплементарности спейсерной части гРНК. В отсутствие РАМ мотива комплекс быстро диссоциирует от цепи, в противном случае комплекс связывается с цепью ДНК, причём время жизни тройного комплекса зависит от степени комплементарности спейсера и ДНК.

Связывание Cas9/гРНК комплекса с целевой последовательностью ДНК идёт за счёт комплементарности 20-нуклеотидного участка гРНК и таргетной ДНК, причём формируется РНК-ДНК гетеродуплекс, обладающий геометрией, схожей с А-формой. Гетеродуплекс находится в канале Cas9 между Nuc и Rec доменами, причём было показано, что Cas9 узнаёт субстрат благодаря его характерной геометрии независимо от последовательности субстрата. Следует, однако, заметить, что структура гетеродуплекса приобретает более выраженную пластичность при рассмотрении от 3'-конца спейсера гРНК к 5'-концу, что обуславливает большее значение РАМ-проксимальных участков для проведения реакции. Также следует отметить, что связывание оцДНК приводит к гораздо более сильным конформационным изменениям в Cas9 (приводящим к активации комплекса), чем связывание олигонуклеотидов, содержащих РАМ-мотив, что указывает на важность комплементарности спейсера (особенно его 5'-концевой части) для выполнения функции Cas9/гРНК.

ДНК-дуплекс находится в положительно заряженной бороздке Cas9 белка между Nuc и Rec доменами. Сам РАМ, расположенный на нетаргетной цепи ДНК, локализуется в CTD (С-концевом домене) белка. Первое основание РАМ (N в 5'-NGG-3') спарено с комплементарным

основанием, но не взаимодействует с Cas9-белком, в то время как 2 гуанидиловых остатка, экспонированные в большой бороздке ДНК, образуют водородные связи с двумя остатками аргинина (R1333 и R1335, в образовании связей участвуют также м-лы H<sub>2</sub>O), входящие в состав бета-шпильки CTD. Данное взаимодействие способствует большей специфичности узнавания последовательности, чем взаимодействия с малой бороздкой ДНК. Ко всему прочему, CTD Cas9 образует многочисленные водородные связи в сахарофосфатным оставом нетаргетной оцДНК. Тем не менее, прямого контакта между Cas9 белком и таргетной цепью ДНК в области комплементарности РАМ, отмечено не было, что объясняет узнавание РАМ именно на нетаргетной цепи ДНК.

Специфическое узнавание РАМ Cas9 комплексом приводит к ряду структурных изменений, приводящих к дестабилизации близлежащего ДНК-дуплекса, и последующем Уотсон-Криковским спариванием гРНК и таргетной ДНК. На начальной стадии образуется резкий излом ДНК перед РАМ, за счёт взаимодействия фосфоэфирного остатка (т.н. +1 фосфат) и фосфатно-замочной петли, расположенной в РАМ-узнающем участке CTD и несколько выдвигающейся вперёд при узнавании РАМ. Излом ДНК, а также локальная дестабилизация ДНК возле РАМ мотива, вероятно вызванная взаимодействием ДНК с фосфатно-замочной петлёй, необходимы для плавления ДНК-ДНК дуплекса и образования ДНК-РНК гетеродуплекса. Без связывания РАМ и стабилизации +1 фосфата теряется возможность “вывернуть” ДНК к спайсеру Cas9/гРНК комплекса, из-за чего гРНК не сможет связываться с таргетной ДНК и инициировать вторжение цепи гРНК. Далее, при образовании R-петли, таргетная цепь находится в центральном канале между Rec и Nuc долями с сохранением излома в области +1 фосфата, а нетаргетная входит в боковой канал, расположенный в Nuc доле. Ближняя к РАМ часть нетаргетной цепи

стабилизирована гидрофобными и Ван-дер-Ваальсовыми взаимодействиями, по мере удаления от РАМ нетаргетная цепь дестабилизируется и разупорядочивается. Стабилизированная часть обладаетискажённой спиральной конформацией, причём 1ый нуклеотид перед РАМ (позиция -1) участвует в стэкинг-взаимодействии с РАМ-дуплексом, что вероятно способствует стабилизации и узнаванию РАМ-дуплекса белком Cas9. Нетаргетная цепь также претерпевает излом в позиции -1, однако не взаимодействует с белком. Данный участок нетаргетной цепи стабилизируется посредством взаимодействий Cas9 с вывернутыми основаниями в позициях -2 и -3. Затем в положении -4 образуется ещё один излом, и вся нетаргетная цепь протягивается в латеральный положительно заряженный канал между RuvC и HNH доменами нуклеазно-активной конформации. Таким образом, нуклеотиды в позициях +1 таргетной цепи и -1 на нетаргетной цепи составляют зону нуклеации для связывания гРНК, участвующие также в формировании R-петли. Плавление происходит в направлении от РАМ-проксимального к РАМ-дистальному участку.

При связывании с ДНК Cas9 взаимодействует также с нерасплавленной ДНК по обе стороны от спайсера. Конец, близкий к таргетному дуплексу, находится в РАМ-взаимодействующем участке CTD, в то время как РАМ-дистальный конец того же дуплекса расположен между 3-им спиральным доменом Rec доли и RuvC доменом Nuc доли. При этом Cas9 изгибает спираль ДНК на  $\sim 30^\circ$ , меняя пространственное расположение дуплекса. Вероятно, сгибание дЦДНК Cas9 белком способствует разделению цепей и предотвращает гибридизацию цепей ДНК до завершения работы эффекторного комплекса [47].

### 3.6 Применение генетических схем

Ввиду того, что генетические сети регулируют все аспекты жизнедеятельности организма, при конструировании генных сетей возможна реализация любых функций живого организма. При этом перед человечеством открывается очень широкое поле возможных применений генетических сетей в исследованиях, а также многих сферах практической деятельности.

#### 3.6.1 Устранение загрязнений

Так, был разработан сенсор для детектирования в воде такого поллютанта, как тринитротолуен [35]. Другая исследовательская группа разработала генетическую систему, позволившую очищать воду от ионов ртути, если её содержание превышает определённый порог. При этом клетки, помещённые в воду, практически не содержащие ртути, самоуничтожались за счёт особого модуля генной сети, и, таким образом, не наносили вреда окружающей среде [48]. Были описаны случаи использования микроорганизмов, модифицированных с помощью генетических систем, для детектирования и поглощения из среды меди и цинка [49], а также свинца [50]. Также с помощью микроорганизмов возможна утилизация таких веществ, как хлорфенол [51], нитрофенол [52], алкилфенол [53], их производных, а также других ароматических загрязнителей [54].

#### 3.6.2 Диагностика и лечение заболеваний

Генетические схемы также нашли немало применений в диагностике и медицине. Например, было показано, что бактерии с генетическими сетями на основе промоторов pYeaR и pCpxP могли использоваться в качестве биосенсоров нитросоединений и глюкозы (соответственно) в образцах биологических жидкостей человека. Такие биосенсоры могут использоваться как недорогие и достаточно точные системы для диагностики некоторых заболеваний человека, например, сахарный диабет [55]. Для лечения диабета

могут использоваться клетки, несущие генетическую сеть для наработки неактивной формы глюкагон-подобного пептида. Под действием этого вещества клетки кишечного эпителия становятся способными вырабатывать инсулин, снижая проявления диабета [56]. В другом исследовании была разработана генетическая схема на одной плазмиде, содержащая особый оператор OethR. In vivo этот оператор репрессируется белком, продуцируемом патогенными штаммами *Mycobacterium tuberculosis*. В результате репрессии не синтезируется фермент, под действием которого этионамид превращается в лекарственное вещество, из-за чего инфекция, вызванная *M. tuberculosis*, труднее излечима. В генетической схеме под регуляцией OethR находился ген зелёного флуоресцентного белка (GFP). Далее на примере трансформированных данной плазмидой клеток *E. coli* исследователи подобрали препарат, способный снимать репрессию оператора, и снижающий устойчивость *M. tuberculosis* к введению этионамида [57].

### 3.6.3 Производство органического сырья

Микроорганизмы, модифицированные генетическими схемами, также могут применяться для производства компонентов биотоплива. Так, с помощью модифицированных цианобактерий *Synechococcus elongatus* штамма РСС 7942 была показана возможность получения 2,3-бутандиола, используемого в производстве промышленных растворителей и топливной добавки. Для повышения выхода бутандиола потребовалось использовать генетическую сеть, обеспечивающую сверхэкспрессию нескольких ферментов цикла Кальвина и содержащую несколько усиленных сайтов связывания рибосом [58-60]. Кроме того, аналогичным образом были получены этанол, изобутанол, жирные кислоты, многоатомные спирты, гликоген, изопрен, лимонен, бисаболен, фарнезен, также потенциально пригодные для использования либо в качестве биотоплива, либо в производстве добавок к нему [61].

Культивирование модифицированных микроорганизмов позволяет решить проблему производства полимеров. В различных микроорганизмах были получены такие мономеры, как 2,3-бутандиол, 1,3-бутандиол и этилен. Полимеры, производимые из получаемых аналогичным образом, 3-гидроксипропионата, 3- и 4-гидроксибутират и лактата, являются биоразлагаемыми, и потому имеют особый интерес для решения проблем устойчивого развития человечества [61-62].

Модифицированные генными сетями организмы также могут производить лекарственные вещества, в частности, артемизиевую к-ту, используемую при лечении малярии, маноилоксид (прекурсор действующего вещества при лечении глаукомы), кофейную кислоту - противоопухолевый препарат, сквален - компонент вакцин [63-64].

Наконец, генно-инженерные микроорганизмы могут использоваться для синтеза фармацевтических и косметических соединений, например, маннитол и лимонен [64-65].

Таким образом, генетические схемы находят множество применений в разных сферах деятельности человека, а их разработка - перспективным направлением для исследований.

### 3.6.4 Разработка вычислительных систем на основе живых организмов

Изучение механизмов работы генов и применение этих механизмов на практике даёт возможность регулировать работу генов того или иного организма. Однако, чем сложнее и многостороннее предполагаемая регуляция, тем сложнее становится строение соответствующей генетической схемы. Для облегчения конструирования и характеризации генетических модулей в генно-инженерной практике закрепился способ представления генетических схем в виде кибернетических модулей, содержащих логические вентили, соответствующие определённым логическим операциям. Так, в исследовании, проведённом Лю с соавторами, был разработан логический вентиль “И”,

регулирующийся при помощи нескольких ключевых элементов: промотора *hrpL*, который активируется только под действием обоих энхансеров *hrpR* и *hrpS*. В качестве входных сигналов использовались следующие экзогенные элементы: аTc индуцируемый Ptet промотор (экспрессия *hrpS*), AHL индуцируемый Plux промотор (экспрессия *hrpL*), а также близкие им рецепторные гены *tetR* и *luxR* [1]. Другой группой исследователей были собраны генетические схемы, соответствующие логическому вентилю “НЕ”, а также переключатель, демонстрирующий гистерезис [43].

Кроме того, была показана возможность сборки генной сети, функционирующей либо как вентиль “НЕ-ИЛИ”, либо как вентиль “НЕ-И”, в зависимости от условий [66].

Технология CRISPR-dCas9, совмешённая с использованием химических соединений и чувствительными генетическими переключателями, позволяет осуществлять регуляцию работы генома организма разнообразными способами. Однако, даже простые переключатели с двумя состояниями не позволяют точно предсказать все последствия их переключения. В последнем исследовании был разработан биокомпьютер (resveratrol and protocatechuic acid-programmed CRISPR-mediated gene remodeling biocomputer - REPACRISPR) для регуляции транскрипции генов, осуществляемой как *in vitro*, так и *in vivo*. Для активации и ингибирования работы генов были разработаны два варианта этой генетической сети: REPACRISPRa и REPACRISPRi, соответственно. активационный модуль успешно регулировал транскрипцию генов, причём предсказуемым образом в зависимости от концентрации молекул, воспринимаемых как входной сигнал (предсказание работы системы осуществлялось с помощью разработанной к данной системе математической модели). Кроме того, высокий уровень экспрессии регулируемых генов мышей, обеспеченный работой логического вентиля “и” показал возможность CRISPR-dCas9-опосредованных изменений эпигенома мышей [67].

## 4. Материалы и методы

### 4.1 Плазмидная конструкция

В данной работе эффекторной плазмидой, на основе которой разрабатывалась генная сеть, является pRSF-Duet+sgRNAGen, кодирующая последовательности dCas9 (под оператором lacI и T7 промотором) и генератор sgRNAGen (Bba\_K1689000, Biobrick).

Генератор был разработан на основе системы CRISPR/Cas9 (тип II) и включает в себя T7 промотор, ген lacZα', tracrPHK и T7 терминатор. Последовательность tracrPHK состоит из 3'-концевой последовательности, соответствующей повтору, и небольшого линкера на 5'-конце. Последовательность, комплементарную спайсеру и комплементарную выбранному месту в геноме предполагается клонировать методом Golden Gate с использованием рестриктазы BsaI. В sgRNAGen расположены два сайта рестрикции BsaI, между которыми находится ген lacZ. Благодаря этому клоны, в которые был успешно клонирован спайсер, становится возможным отобрать методом бело-голубой селекции. Плазмида также кодирует гены KanR. Поскольку плазмида содержит ген lacI под соответствующим промотором, синтез dCas9 возможен только в присутствии IPTG.

Репортерная плазмида основана на векторе pSB1C3 и кодирует ген mRFP под контролем конститутивного промотора.

### 4.2 Олигонуклеотиды

Использованные в данной работе олигонуклеотиды были заказаны у компании “Евроген”.

Спайсер “Sp\_prom1” - комплементарен участку промотора гена mRFP, использовался для клонирования методом Golden Gate

Прямой праймер: TAGGTCTCAAATGTCGATCGAGTC

Обратный праймер: AAACGACTCGATCGACATTGAGA

Спейсер “Sp\_protein\_2” - комплементарен участку гена mRFP, использовался для клонирования методом Golden Gate

Прямой праймер: TAGGACTATTGCAGAACGCCTCCTT

Обратный праймер: AAACAAGGAGGGCTTCTGCAATAGT

Спейсер “pRSFCas\_vector” - комплементарен участку плазиды pRSF-Duet, использовался для наработки плазиды методом ПЦР.

Прямой праймер: ACTCTAGATTCAGTGCAATTATCTCTTCAA

Обратный праймер: AGCGCTGCATGCCTATTGTTAT

#### 4.3 Проведение измерений в планшетном ридере

Измерялась оптическая плотностьочных культур. После чего культуры разводились до оптической плотности 0,05 (в последнем эксперименте - до 0,1-0,2), конечный объём 1 пробы - 20 мл). Добавлялось по 20 мкл соответствующих антибиотиков к каждой пробе. Крышки неплотно завинчивались (для доступа кислорода к клеткам), и проводилось измерение в 0-ой точке. Затем клетки культивировались в шейкере-инкубаторе в течение 1ч. За это время были подготовлены пробирки и планшет (с чёрными стенками и прозрачным дном, “NON-BINDING“). По истечении необходимого времени достать клетки с качалки, раскопать 5 повторностей по 200 мкл по следующей схеме (сразу после раскапывания клетки неплотно закрыть и поместить обратно на качалку, запустить таймер):

	A	B	C	D	E	F	G	H	I
1	LB	BL21	pRSF(sg-)	pRSF(sg1)	pRSF(sg2)	pRSF(sg-) +mRFP	pRSF(sg1) +mRFP	pRSF(sg2) +mRFP	mRFP
2	LB	BL21	pRSF(sg-)	pRSF(sg1)	pRSF(sg2)	pRSF(sg-) +mRFP	pRSF(sg1) +mRFP	pRSF(sg2) +mRFP	mRFP
3	LB	BL21	pRSF(sg-)	pRSF(sg1)	pRSF(sg2)	pRSF(sg-) +mRFP	pRSF(sg1) +mRFP	pRSF(sg2) +mRFP	mRFP
4	LB	BL21	pRSF(sg-)	pRSF(sg1)	pRSF(sg2)	pRSF(sg-) +mRFP	pRSF(sg1) +mRFP	pRSF(sg2) +mRFP	mRFP
5	LB	BL21	pRSF(sg-)	pRSF(sg1)	pRSF(sg2)	pRSF(sg-) +mRFP	pRSF(sg1) +mRFP	pRSF(sg2) +mRFP	mRFP

*Рис.5. Схема нанесения проб в планшет. Условные обозначения: LB - жидкая среда LB, BL21 - клетки BL21(DE3), pRSF(sg-)- клетки BL21(DE3) с плазмидой pRSF\_Duet(sg-) (нет спейсерной части гPHK) , pRSF(sg1)-клетки BL21(DE3) с плазмидой pRSF\_Duet(sg1) (спейсерная часть гPHK направлена на промотор), pRSF(sg2)- клетки BL21(DE3) с плазмидой pRSF\_Duet(sg2) (спейсерная часть гPHK направлена на открытую рамку считывания гена mRFP), pRSF(sg-)+mRFP- клетки BL21(DE3) с плазмидами pRSF\_Duet(sg-) и репортерной, pRSF(sg1)+mRFP- клетки BL21(DE3) с плазмидами pRSF\_Duet(sg1) и репортерной, pRSF(sg2)+mRFP- клетки BL21(DE3) с плазмидами pRSF\_Duet(sg2) и репортерной, mRFP- клетки BL21(DE3) с репортерной плазмидой (pSB1C3 с геном mRFP).*

Измерения оптической плотности OD600, OD700 и флуоресценции проводились на планшетном ридере POLARstar (BMG Labtech, Германия).

После измерений пяти повторностей одной пробы (не считая пробы с чистой средой) переносили в специально отведённую пробирку, пробирку подписывали (какими плазмидами клетки трансформированы, номер измерения). По окончании каждой серии измерений (OD600, OD700, флуоресценция mRFP) планшет мыли и сушили.

При окончании первого дня измерений оставляли клетки в качалке на 33°C, на следующий день проводили одно измерение при 33 °C, переводили температуру обратно на 37°C, и продолжали измерения. По окончании измерений с данными клетками (или при израсходовании всех 20 мл культуры), экспортировали данные с планшетного ридера и строили по ним кривые роста и флуоресценции культур.

По окончании основной части измерений при необходимости (для проверки корректности кривых, при обнаружении выбросов/зашкаливающих данных и др.) следует раскалывать пробы из собранных пробирок, вниз по столбцу увеличиваясь порядковый номер измерения, вдоль по ряду находились клетки, трансформированные плазмидами.

#### 4.4 Приготовление сред

Для культивирования клеток использовалась среда Luria-Bertani (LB). Жидкая среда LB содержит (w/v): сухая смесь LB- 2,5%; твёрдая - сухая смесь LB - 2,5%, бактериологический агар - 1,5%. Среды автоклавировали в течение 15 минут при 121°C.

#### 4.5 Приготовление компетентных клеток

Стерильно засеяли жидкую среду культурой нужных клеток, растили культуру на качалке при 37°C и 250 об/мин. Каждые 30-45 минут измеряли OD600 и OD700. При достижении значения 0,4-0,5 усл. ед. переместили клетки на лёд, инкубировали не менее 10 минут. Включили и заранее остудили центрифугу до 4°C. Собрали клетки центрифугированием при 4°C, 2500 g в течение 10 мин. Стерильно слили супернатант.

Аккуратно ресуспензировали клетки в 10 мл буфера Inoue (0,5 М 1,4-пiperазиндиэтансульфоновая кислота (pH 6,7), 55 mM MnCl<sub>2</sub>\*4H<sub>2</sub>O, 15 mM

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 250 мМ KCl) и снова отцентрифугировали при 4000 g в теч. 10 мин при 4°C. Повторили процедуру.

Отцентрифужированные клетки аккуратно ресуспензировали в 5 мл буфера и добавили 480 мкл ДМСО. Инкубировали на льду не менее 15 минут.

Перенесли клетки и пробирки на 0,5 мл на лёд клетки по 50 мкл в стерильных условиях в зоне пламени горелки. Закрытые пробирки немедленно помещали в жидкий азот. По окончании заморозки клетки поместили в подписанный контейнер и убрали в кельвинатор на -80°C.

#### 4.6 Трансформация клеток.

Доставка плазмидных конструкций в клетки осуществлялась методом химической трансформации. Аликвоту клеток 50 мкл нужного штамма (BL21(DE3)) доставали из кельвинатора и размораживали на льду. После этого добавляли не менее 100 нг плазмиды и инкубировали на льду 15 минут. Далее клетки помещали в заранее разогретый до 42 °C термостат на 60-90 сек и перемещали обратно в лёд. После инкубации добавляли 200 мкл среды LB и помещали клетки в термошайкер на 1 час при температуре 37°C и перемешивании при 800 об/мин. За это время готовили чашки: твёрдую среду LB плавили, ждали остывания до ~45-55°C и добавляли необходимый антибиотик. Разливали среду по чашкам (25 мл среды на чашку) и ждали застывания. По окончании необходимого времени культивирования клеток их центрифугировали 1-2 мин при 1700g, отбирали 200 мкл среды, стараясь не затронуть осадок клеток. Остальное ресуспензировали и наносили на чашку в зоне пламени зажжённой спиртовки. После чего втирали супензию стерильным шпателем до исчезновения мокрых разводов и возрастания вязкого трения шпателя об агаризованную среду. Чашку закрывали, запечатывали плёнкой Parafilm, и ставили дном кверху в термостат при 37 °C на ночь. На следующий день проверяли чашки на наличие колоний и убирали в холодильник на +4°C.

#### 4.7 Выделение плазмид из клеток

Выделение плазмид из клеток *E. coli* проводилось методом осаждения этанолом. Разморозили клетки, добавили 6 мл ресуспенсирующего р-ра (Tris-HCl, pH8 25мМ, ЭДТА 10 мМ, глюкоза 60 мМ, лизоцим 5 мг/мл), и 6-7 мкл РНКазы А, ресуспензировали, инкубировали на льду 15 мин. Предварительно охладили центрифугу до 4°C и р-р NH4Cl (10 М NH4Cl, уксусная к-та 11,5% (v/v)) при -20°C. Добавили 12 мл лизирующего р-ра (0,2 М NaOH, 1% додецилсульфата натрия), перемешали переворачиванием, инкубировали не более 5 мин. Добавили 6 мл “Р-р NH4Cl”, перемешали переворачиванием, инкубировали 15 мин на льду и открутили при 10000xg при 4°C в течение 30 мин. За это время подготовили чистую пробирку и шприц с фильтром. Профильтровали супернатант в чистую пробирку, добавили 15 мл изопропанола, инкубировали 15 мин при -20°C, затем открутили при 15 000 g и 4°C в течение 20 минут. Убедились в наличии полупрозрачного белого осадка, аккуратно слили супернатант, оставляя осадок. Далее промыли осадок 70% этанолом, слили спирт. Просушили осадок в ламинарном боксе (до прозрачности), растворили в 25-50 мкл воды MQ. Проверили чистоту образца на спектрофотометре Nano-500 (Allsheng, Китай).

#### 4.8 Проведение электрофореза в агарозном геле

Для очистки нужных фрагментов ДНК, а также проверки успешности ПЦР и клонирования использовался метод электрофореза в 1% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Перед нанесением на гель к образцам добавляли 6х загрузочный буфер (R0611, Thermo).

#### 4.9 Экстракция плазмида из геля

Проводилась с использованием набора “Cleanup Standard для очистки ДНК из гелей и реакционных смесей” (Евроген, Россия).

#### 4.10 Клонирование методом GoldenGate

Для формирования дуплексов с “липкими” концами, олигонуклеотиды (см 4.2) отжигали путем нагрева до 95°C с постепенным охлаждением (1°C/мин) в буфере, содержащем 20мМ Трис pH 7.5, 100мМ KCl, 10мМ MgCl<sub>2</sub>. Качество сборки дуплексов проверяли методом электрофореза в 2% агарозном геле.

Рестрикцию вектора для вставки спайсеров (Bba\_K1689000, Biobrick) проводили с использованием рестриктазы BsaI (NEB). Линеаризованный фрагмент очищали как описано в 4.9.

Перед лигированием дуплексы фосфорилировали путем обработки протеинкиназой (PNK, NEB), а вектор дефосфорилировали щелочной фосфатазой (Thermo) при 37°C. Термоинактивацию проводили при 65°C в течение 15 минут. Для лигирования использовали T4 ДНК-лигазу (NEB), реакцию проводили при 16°C в течение ночи.

#### 4.11 Расчёт количества клеток при известных значениях оптической плотности.

По закону Бугера-Ламберта-Бера (в приложении к растворам) оптическая плотность, являющаяся логарифмом отношения исходной интенсивности света к интенсивности прошедшего через образец светового пучка, линейно зависит от концентрации поглощающего свет вещества в образце:

$$A = \ln \frac{I_0}{I_t} = \epsilon cl,$$

где  $A$  - оптическая плотность (часто обозначается OD),  $I_0$  - исходная интенсивность светового пучка,  $I_t$  - интенсивность светового пучка, прошедшего через образец,  $c$  - концентрация светопоглощающего вещества в образце,  $l$  - длина оптического пути,  $\epsilon$  - коэффициент молярной экстинкции. В данной работе оптическая плотность проб обусловлена поглощением и рассеянием света на бактериальных клетках, соответственно, под концентрацией следует понимать кол-во клеток в единице объёма пробы. Так как концентрация линейно зависит от кол-ва клеток, а оптическая плотность линейно зависит от концентрации, можно предположить, что оптическая плотность линейно зависит от количества клеток в образце. В соответствии с этим предположением, одним из коллег был построен калибровочный график, позволяющий установить соответствие между OD600 (оптической плотностью при освещении светом с длиной волны, равной 600 нм) и количеством клеток, который и был использован в данной работе (эксперименты и построение калибровочного графика подробно описаны в ВКР Винникова Рената). Поскольку в данной работе использовались клеточные культуры, производящие красный флуоресцентный белок, чьи максимумы поглощения и испускания расположены при 584 нм и 607 нм, соответственно, использование света с длиной волны, равной 600 нм, привело бы к завышенным значениям оптической плотности ввиду поглощения света красным флуоресцентным белком. Соответственно, измерения оптической плотности проводились с использованием длин волн 600 нм (OD600) и 700 нм (OD700) в рамках одного эксперимента. В каждом эксперименте присутствовала культура клеток, не нарабатывавшая mRFP (BL21 (DE3)). Для этой культуры по калибровочной кривой для OD600 было рассчитано количество клеток (что корректно в силу отсутствия mRFP и его вклада в оптическую плотность для данной культуры). Далее на основе полученных значений количества клеток

BL21(DE3) и соответствующих данной культуре данных по OD700, были найдены коэффициенты для калибровочной кривой зависимости кол-ва клеток от OD700. Полученные коэффициенты были использованы для рассчёта количества клеток остальных культур, при допущении об отсутствии каких-либо веществ с пиком поглощения при 700 нм в остальных культурах клеток.

## 5. Результаты и обсуждение

### 5.1 Предполагаемая работа разрабатываемой системы

Собранный генетический схема поддерживается двумя плазмидами и представляет из себя логический вентиль «НЕ». Система состоит из эффекторной и репортерной плазмид. Репортерная плазмида системы несёт ген репортерного белка mRFP под конститутивным промотором и ген устойчивости к хлорамфениколу. Эффекторная плазмида несёт: ген dCas9 (под IPTG-индуцируемым промотором), sgRNA и ген устойчивости к канамицину.

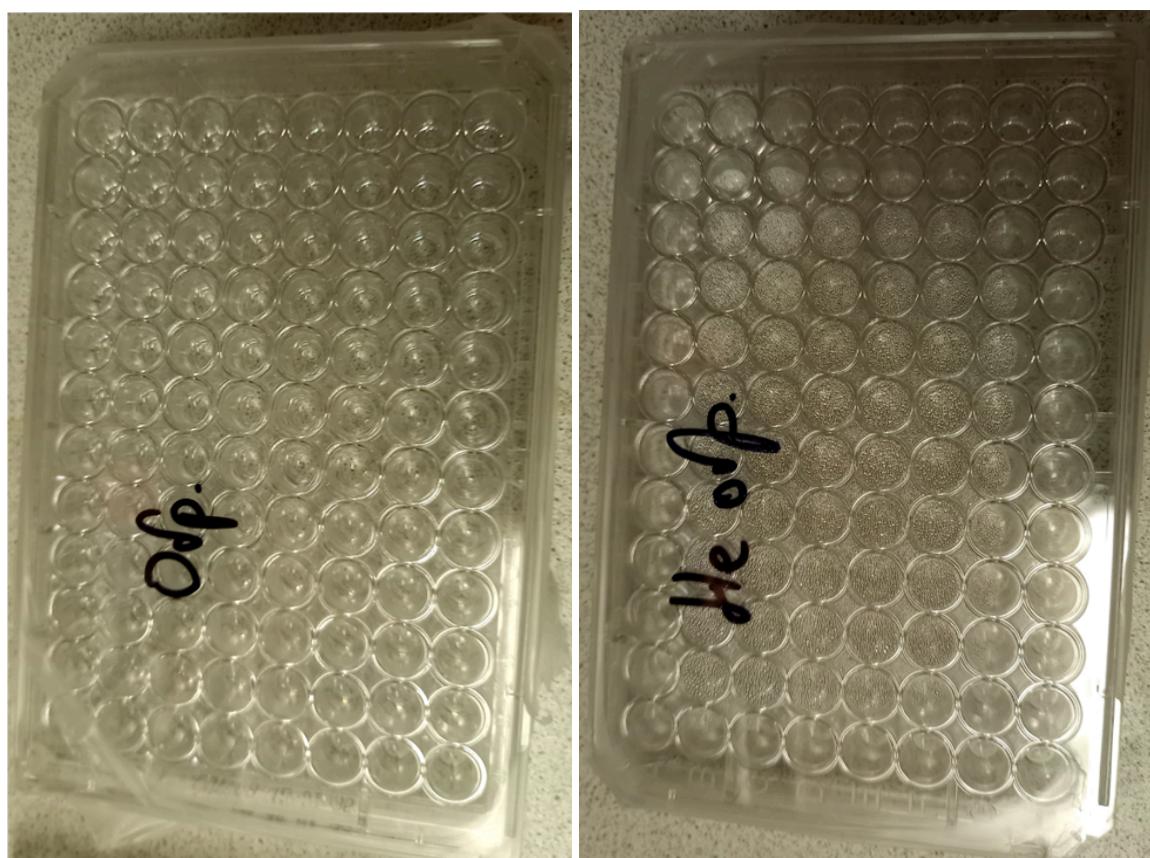
В основном состоянии (без добавления индуктора) клетка нарабатывает mRFP, в результате чего закономерно повышается уровень флуоресценции. При этом оператор LacO заблокирован белком-репрессором LacI, и синтез dCas9 не идёт. В присутствии индуктора (IPTG) репрессор снимается с LacO и с эффекторной плазмиды начинает синтезироваться dCas9, который, образуя комплекс с гРНК, связывается либо с промотором гена mRFP, либо с началом последовательности гена mRFP, в зависимости от спайсера. При связывании dCas9 комплекса с соответствующей последовательностью генома происходит стericкое блокирование работы РНК-полимеразы, подавление синтеза mRFP и, как следствие, снижение уровня флуоресценции культуры клеток.

### 5.2 Экспериментальная работа

Поскольку планировалось проводить измерения в планшетном ридере, необходимо было оптимизировать процесс культивирования клеток в условиях ридера. При этом возникло несколько проблем. Поскольку, во избежание контаминации прибора и изменения оптического пути луча встроенного спектрофотометра, на крышке образовывался конденсат, мешавший измерениям. Также при длительном культивировании на дне лунок планшета образовывались клеточные агрегаты, вносившие значительную погрешность в измерения.

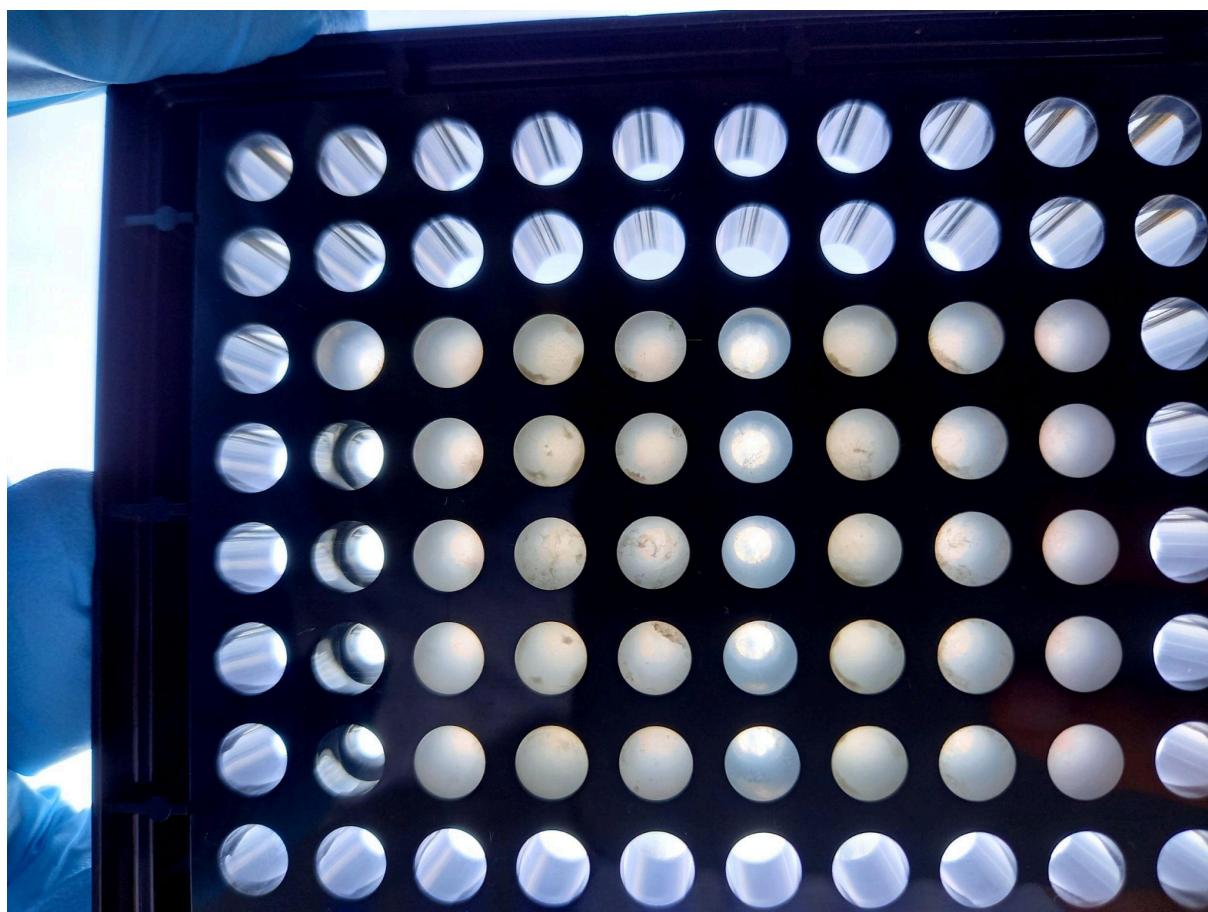
Проблему с конденсацией жидкости удалось решить с помощью обработки крышки планшета спиртовым раствором детергента ТРИТОН-Х100 - этот способ был описан в статье по проведению измерений в планшетном ридере [68]. Для проверки этого протокола раствор три раза заливался в крышку, которая затем инкубировалась 15 минут, после чего раствор сливался, а крышка сушилась в ламинарном боксе при действии УФ-излучения.

После высыхания и заполнения лунок образцами планшет закрывался крышкой и запечатывался плёнкой (Parafilm), после чего ставился в термостат при 37°C. По истечении суток проверялось состояние крышки планшета. Результаты эксперимента представлены на рис.6. Как видно из рисунка, при испарении конденсат осаждался на крышке, и в сочетании с детергентом образовывал на крышке оптически прозрачную гидрофильную плёнку. Необработанная же крышка стала менее прозрачной из-за осевших на гидрофобной поверхности капель воды.

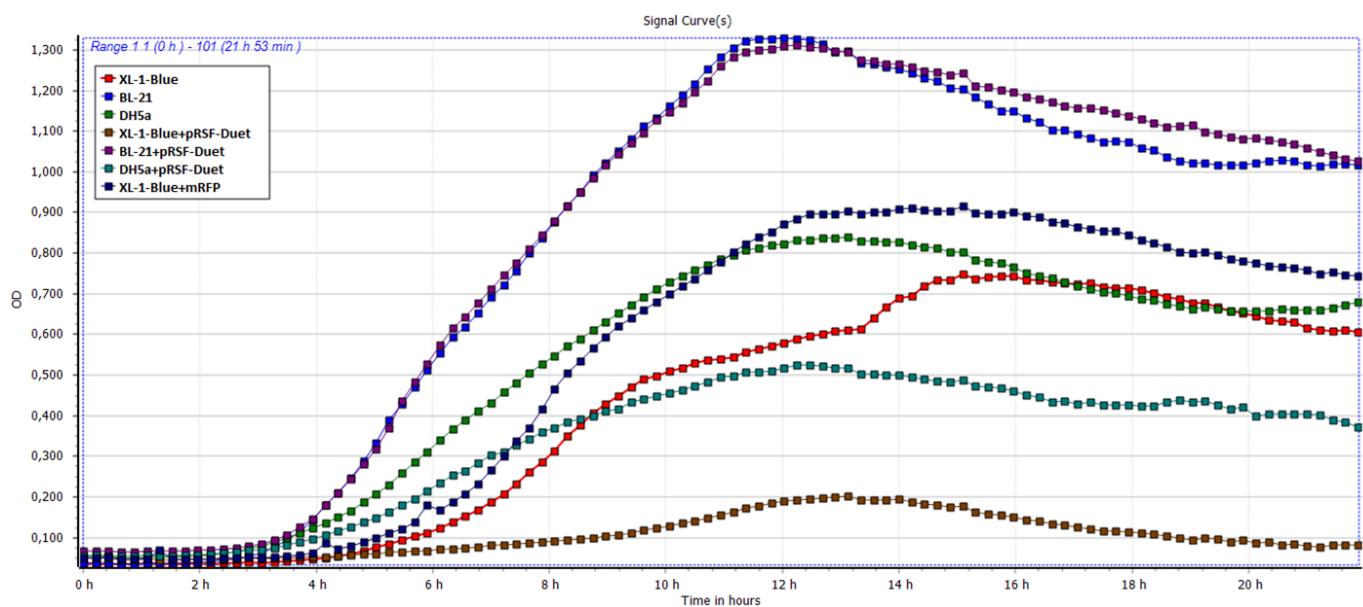


*Рис.6. Результаты эксперимента по предотвращению конденсации: на крышке обработанного планшета нет помутнения, обусловленного конденсацией воды. Обработанная крышка обозначена “Обр.”, необработанная - “Необр.”*

Далее требовалось решить проблему агрегации клеток на дне лунки. Наиболее доступным способом решения этой проблемы являлся подбор режима перемешивания. На приборе были доступны линейный (центр лунки движется по отрезку), орбитальный (центр лунки движется по кругу) и двуорбитальный (центр лунки описывает “восьмёрку”) режимы перемешивания. Однако при использовании лишь одного из них агрегация всё же происходила - либо по краям (при линейном режиме), либо в центре (орбитальные режимы). Был проведён эксперимент с сочетанием линейного и орбитального режимов. В течении 24 часов при 37°C перемешивание шло в следующем режиме: 180 секунд орбитально, затем 120 секунд линейно, после чего происходили измерения. При указанном сочетании линейного и орбитального режимов перемешивания агрегация клеток была почти полностью устранена.



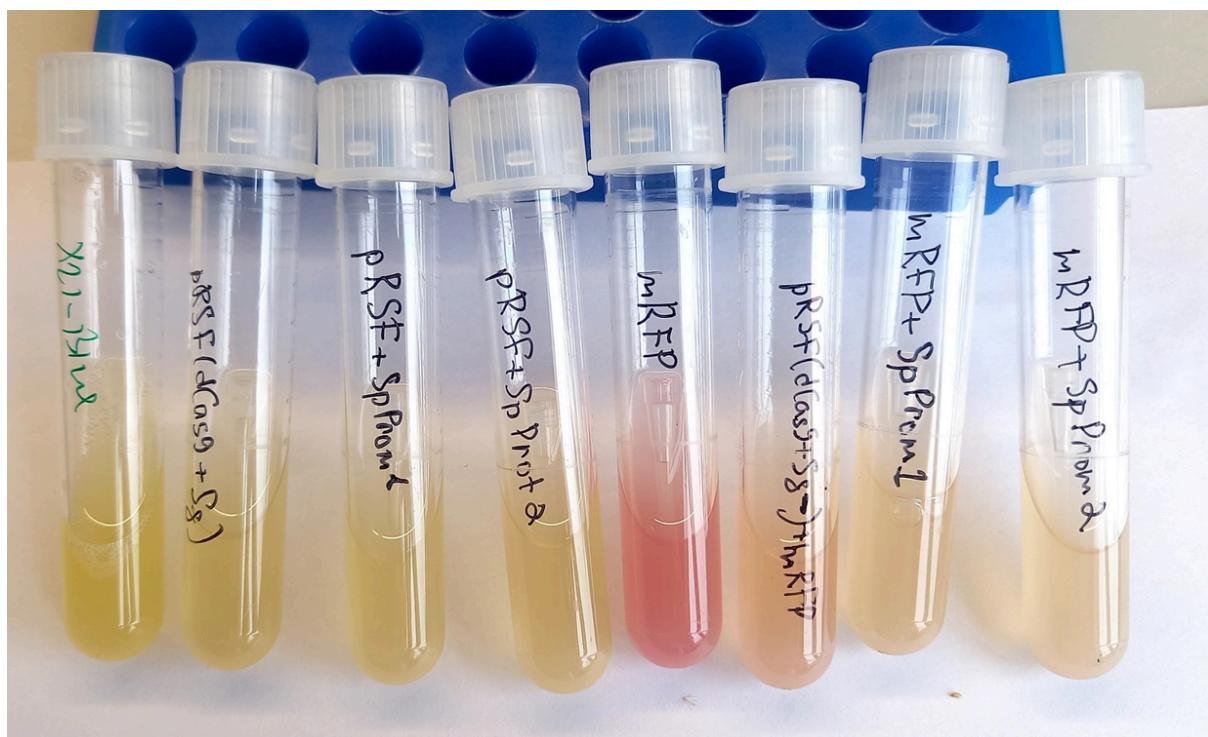
*Рис.7. Общий вид планшета (снизу).*



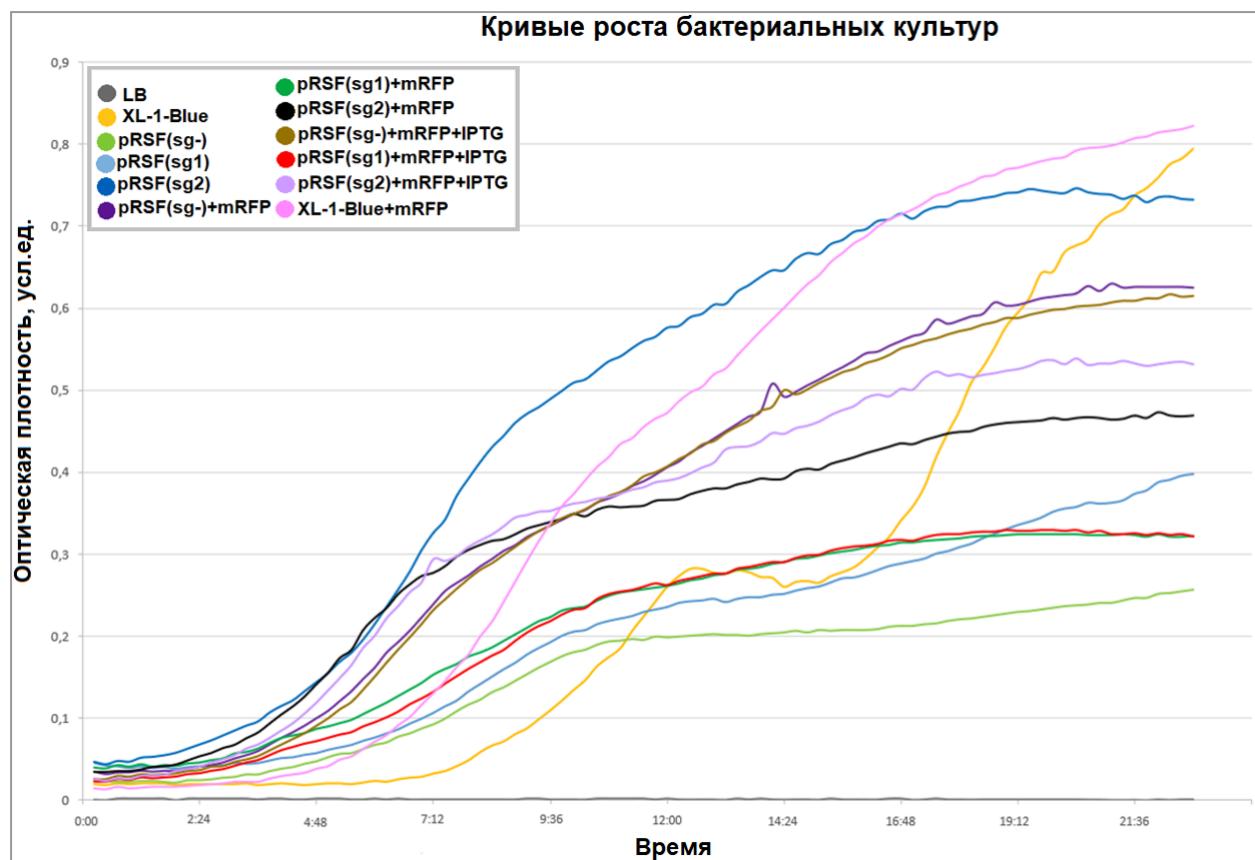
*Рис.8. Кривые роста культур.*

Как видно из рисунка 8, в результате эксперимента удалось снять кривые роста нескольких культур клеток, причём кривые имеют вид, близкий к каноническому: выявляются лаг-фаза, экспоненциальная фаза и стационарная фаза.

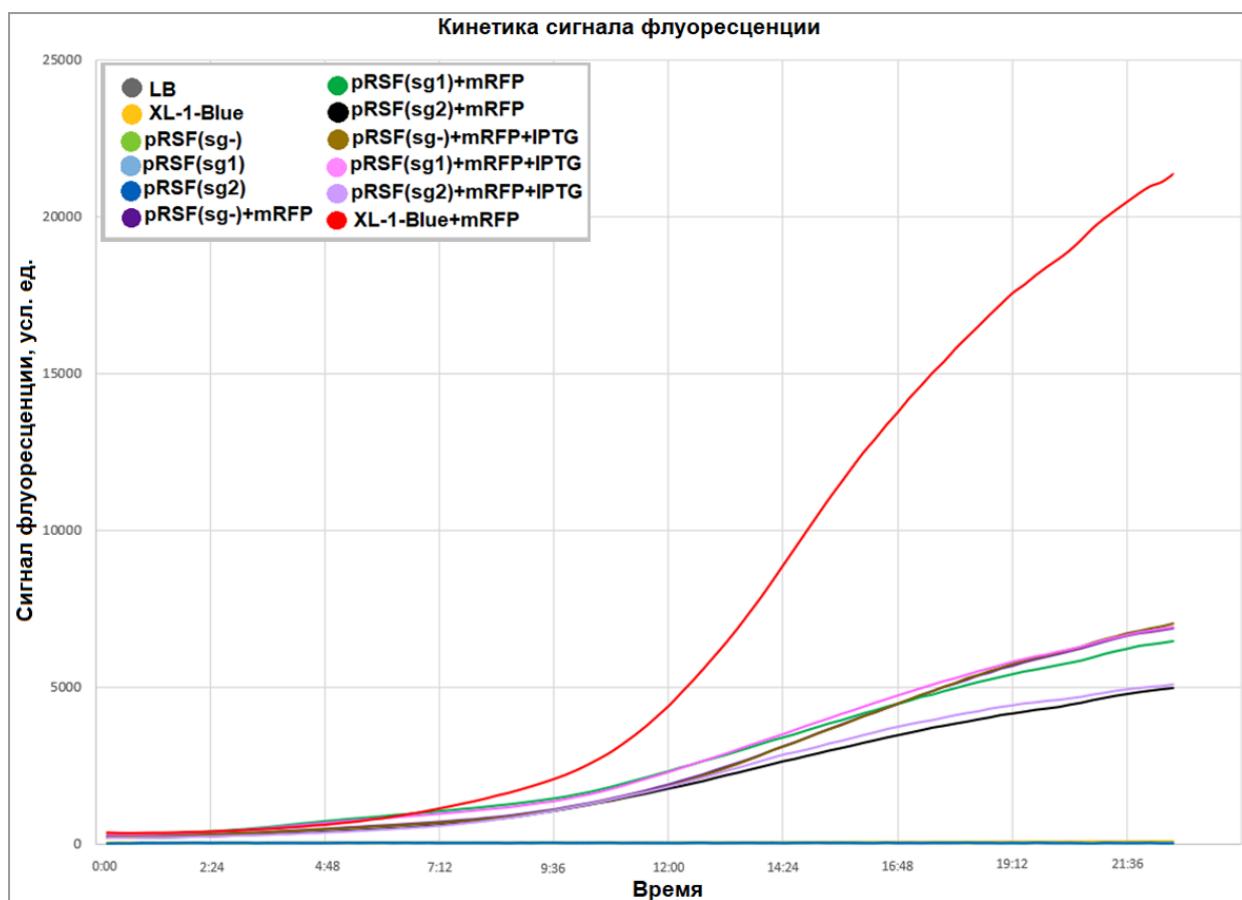
Далее решено было перейти к экспериментам с разработанной схемой. Клетки XL-1-Blue (штамм для наработки плазмида, был исходно выбран для снижения метаболической нагрузки на синтетические системы клетки) были трансформированы плазмидами: 3 вариантами эффекторной плазмида семейства pRSF-Duet, несущими спайсеры, комплементарные участку промотора и участку белка, соответственно, а также спайсер, не имеющий последовательности, комплементарной гену mRFP (в качестве контроля); плазмидой, несущей ген mRFP (репортерная). Также были получены 3 культуры клеток, котрансформированные mRFP и одним из вариантов эффекторной плазмида. Различия в экспрессии mRFP у разных культур были заметны уже после получения ночных культур клеток: клетки, несущие только репортерную плазмиду, были наиболее интенсивно окрашены, клетки, несущие только эффекторную плазмиду и не несущие плазмид - не окрашены. Клетки, несущие две плазмиды имели промежуточный вариант окраски, причём более интенсивно была окрашена культура, у которой спайсер на эффекторной плазмиде не был направлен на ген mRFP, что может свидетельствовать о функциональности разработанной системы (см. рис.9). С использованием оптимизированного режима культивирования были получены кривые роста и кинетика флуоресценции данных культур (см. рис.10 и 11).



**Рис.9.** Ночные культуры клеток для эксперимента с репортерной системой. Культуры: *XL-1-Blue*, *XL-1-Blue+pRSF(-)*, *XL-1-Blue+pRSF(Prom1)*, *XL-1-Blue+pRSF(Prot2)*, *XL-1-Blue+mRFP*, *XL-1-Blue+mRFP+pRSF(-)*, *XL-1-Blue+mRFP+Prom1*, *XL-1-Blue+mRFP+Prot2*.



*Рис.10. Кривые роста культуры клеток, несущих эффекторную и/или репортерную плазмиду.*

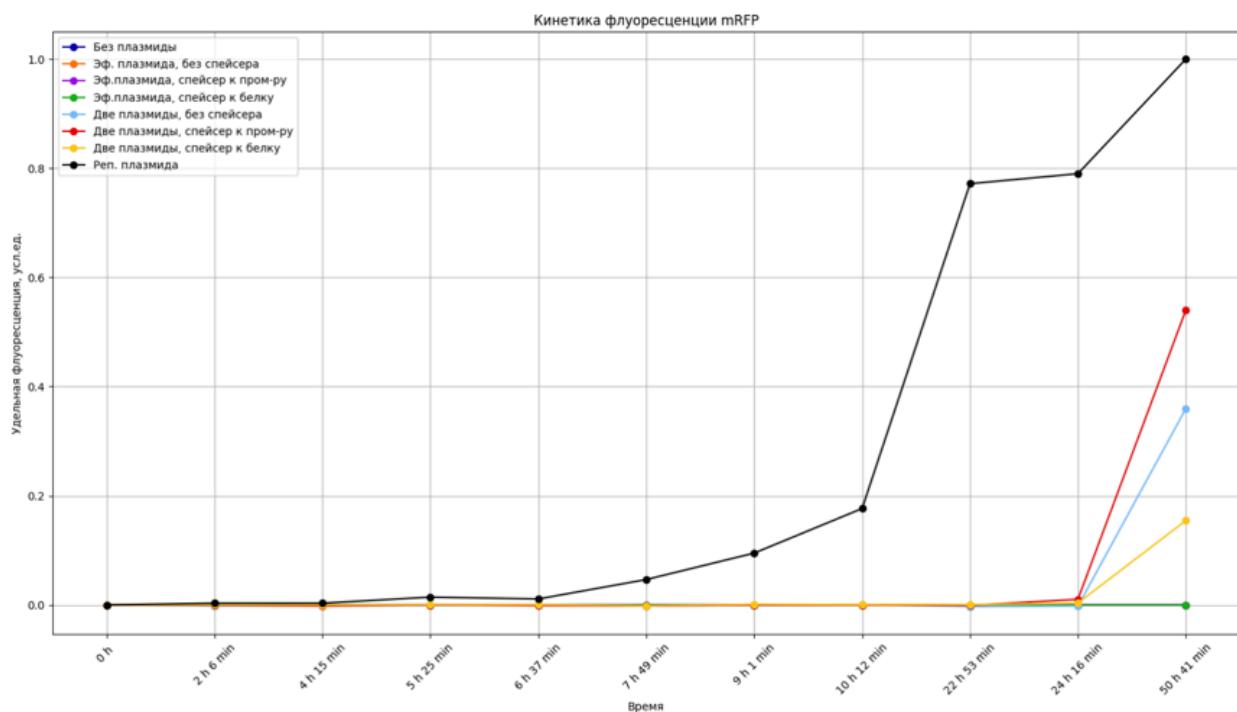


*Рис.11. Кинетика роста сигнала флуоресценции от нескольких культур клеток, несущих эффекторную и/или репортерную плазмиду.*

Как видно из рисунков 10 и 11, кривые роста большинства культур имеют вид, близкий к каноническому. Исключение составляет XL-1-Blue, кривая роста которого может быть характеризована как двухкомпонентная. Вероятно, полученная кривая может быть связана с тем, что это единственная культура, не высеивавшаяся из свежих клеток. Что же касается уровня флуоресценции, то культура с репортерной плазмидой имеет наибольший сигнал флуоресценции к окончанию измерений, чуть меньший - культуры, несущие две плазмиды, остальные не флуоресцируют вовсе. Это различие, вероятно, объясняется тем, что две плазмиды конкурируют друг с другом за рекрутируемые компоненты реплисом и материалы, необходимые для транскрипции и трансляции, в результате чего оказывают на клетку гораздо более сильную метаболическую нагрузку, чем одна эффекторная плазмida.

Клетки, несущие две плазмиды, по уровню сигнала значительно не отличаются друг от друга, вне зависимости от добавления индуктора (IPTG). Данное явление может быть объяснено некоторой текучестью lac-промотора. Следует также отметить, что в случае клеток с двумя плазмидами уровень флуоресценции наибольший для спейсера, не комплементарного гену, и спейсера, нацеленного на промотор, чуть меньше - для спейсера, нацеленного на белок. Это может быть либо следствием различий в конечной оптической плотности культур, либо эффективное подавление транскрипции наблюдается только для спейсера, нацеленного на белок.

При повторных проведениях эксперимента решено было сравнить поведение системы с добавлением индуктора и без добавления индуктора (IPTG). Также решено было использовать штамм для наработки белка (BL-21 (DE3)) вместо штамма для наработки плазмида (XL-1-Blue) для увеличения сигнала. Результат эксперимента представлен на рис. 11.

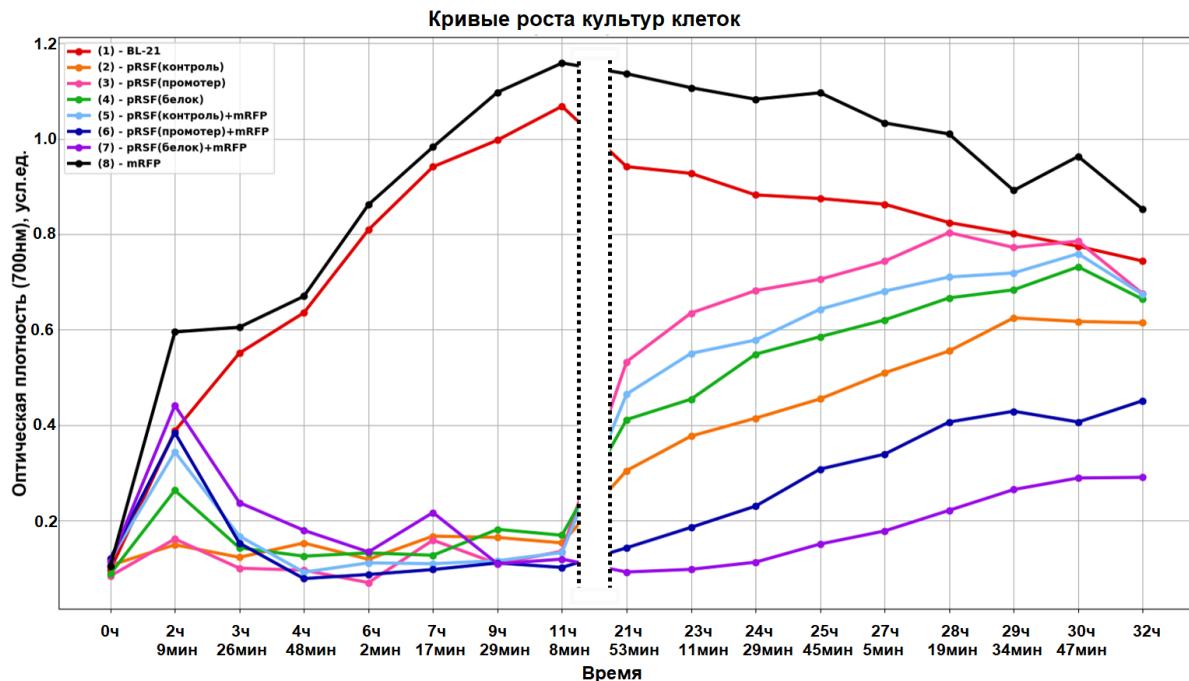


*Рис.12. Кинетика роста сигнала флуоресценции от нескольких культур клеток, несущих эффекторную и/или репортерную плазмиду, с добавлением IPTG (0,5 М).*

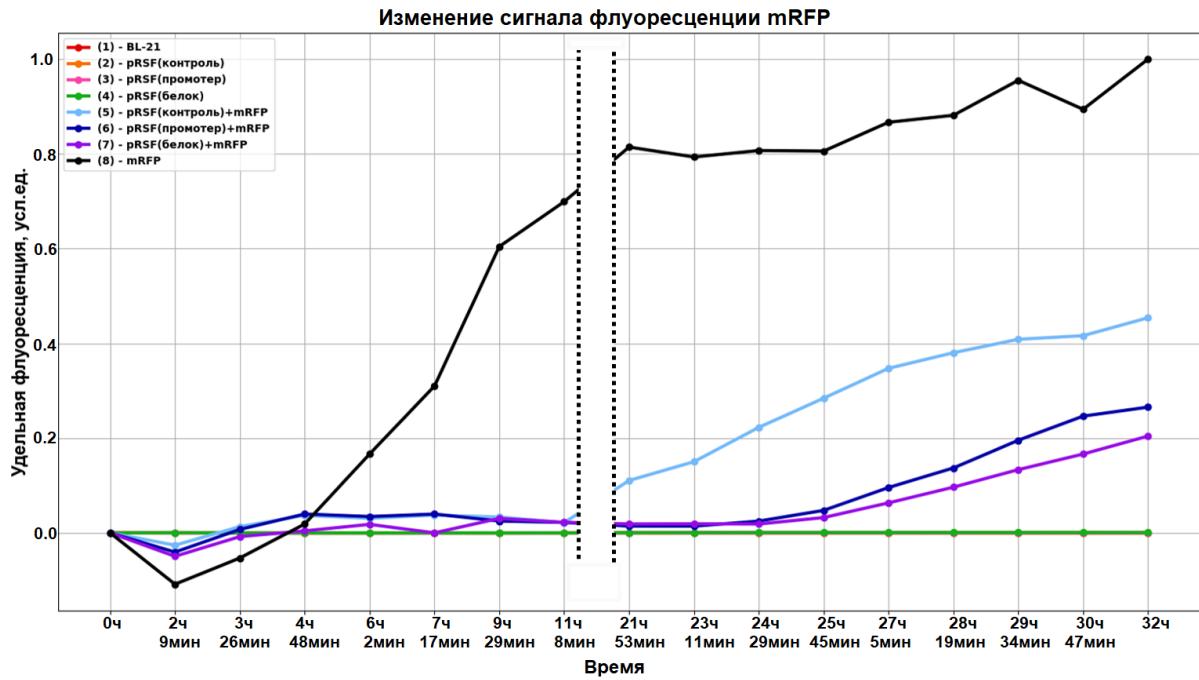
Как видно на рис.12, наибольшей удельной флуоресценцией обладают клетки, несущие только одну плазмиду с флуоресцентным белком, меньшей – имеющие две плазмиды. Данное явление объясняется метаболической нагрузкой на клетку и сопутствующей конкуренцией синтетических систем клетки за ресурсы хозяина. Клетки, не трансформированные репортерной плазмидой, не флуоресцируют. Клетки же, несущие по две плазмиды, представлены в 3х вариантах: голубой график – отрицательный контроль – не кодирует спайсер, имеется только трейсерная РНК; красный график выше – со спайсером, нацеленным на кодирующую цепь промотора; жёлтый график ниже – со спайсером, нацеленным на матричную цепь белка. Наименьшая репрессия (а значит и эффективность логического вентиля) наблюдается для культур со спайсером к промотору, чуть сильнее подавление у отрицательного контроля, и наибольшая эффективность наблюдается для спайсера, нацеленного на матричную цепь открытой рамки считывания белка. Полученные результаты могут быть частично обусловлены токсичностью самого dCas9: при отсутствии какого либо спайсера белок может потенциально связаться с любым участком генома клетки, стерически подавляя работу полимераз и рибосом и прочей клеточной машинерии. При наличии спайсера к матричной цепи белка происходит эффективное связывание и подавление транскрипции гена, в то время как для промотора эффективность связывания ниже, либо полимераза всё же преодолевает стерически заблокированный участок. Тем не менее, полученные в этом эксперименте результаты нерелевантны в силу того, что культуры клеток с полной системой из двух плазмид не успели достигнуть конца экспоненциальной фазы или стационарной фазы.

При проведении следующего эксперимента для максимального возможного ускорения роста клеток решено было снизить концентрацию IPTG

до 0,25 М, и поддерживать температуру шейкера при 37°C в течение дня, снижая её до 33°C ночью (во избежание гибели клеток в результате перегрева шейкера). Результаты эксперимента представлены на рисунках 13 и 14 (кривые роста и сигнала флуоресценции, соответственно). Индукция IPTG осуществлялась для всех культур, кроме обозначенных “BL-21” и “mRFP”.



*Рис.13. Кривые роста культур клеток, несущих эффекторную и/или репортерную плазмиду, с добавлением IPTG (0,25 M). Полосой с пунктирными границами показан период ночного культивирования, когда измерения не проводились.*



**Рис.14. Кинетика роста сигнала флуоресценции от культур клеток, несущих эфекторную и/или репортерную плазмиду, с добавлением IPTG (0,25 M). Значения пронормированы на количество клеток для каждой культуры. Полосой с пунктирными границами показан период ночного культивирования, когда измерения не проводились.**

Как видно из рисунков 13 и 14, клетки, не подвергшиеся индукции, растут быстрее индуцированных, что объясняется высокой метаболической нагрузкой в связи с активной экспрессией dCas9 белка с промотором LacO. Явлением метаболической нагрузки объясняется и значительное замедление темпов роста клеток с полной системой из эфекторной и репортерной плазмид по сравнению с клетками, трансформированные одним из вариантов эфекторной плазмиды. Что же касается удельной флуоресценции, то наибольший её уровень, как и ожидалось, отмечается у клеток, трансформированной только репортерной плазмидой (макс. уровень флуоресценции), чуть меньше - у полной генетической схемы с “контрольным” вариантом эфекторной плазмиды (без спайсера; 43,3% от максимального уровня), и наименьшая флуоресценция наблюдается у клеток, трансформированных ген. схемой со спайсерами, направленными на промотор

и открытую рамку считывания (OPC) белка (23.3% и 20% от максимального уровня, соответственно).

Статистическая обработка полученных данных проводилась, исходя из предположения о том, что уровень удельной флуоресценции культур является случайной величиной, формирующейся под действием множества независимых факторов (температурные флуктуации при перегреве инкубатора и отборе проб, ручного отбора проб и др.), а потому распределение уровня удельной флуоресценции разных повторностей одной пробы может считаться случайной величиной с распределением, близким к нормальному (согласно центральной предельной теореме). Тогда для оценки значимости различий может быть использован двухвыборочный t-критерий Стьюдента. При анализе сравнивались конечные уровни флуоресценции (при последнем измерении) системы из 2-х плазмид с “контрольным вариантом” эфекторной плазмиды (обозначим её MG0) и одной из двух разработанных систем (со спайсером к промотору и к OPC (обозначим их MG1 и MG2 соответственно). Две разработанные системы также сравнивались друг с другом для выявления значимых различий.

При разных комбинациях сравниваемых систем, статистические гипотезы имели вид:

1) “MG0 - MG1”

$$H_0: M(MG0) = M(MG1)$$

$$H_1: M(MG0) \neq M(MG1)$$

где  $M$  - среднее для той или иной пробы.

$$M(MG0) = 189.436425$$

$$\sigma(MG0) = 2.327247$$

$$M(MG1) = 97.047865$$

$$\sigma(MG1) = 1.549253$$

При уровне значимости  $\alpha=0.05$  и кол-ве степеней свободы  $f=8$  критическое значение t-критерия  $t_c=2.306$ . Значение t-критерия равно 33.05, p-значение =  $10^{-5}$ .

Вывод: гипотеза  $H_0$  отвергается в пользу альтернативной гипотезы при уровне значимости 0,05.

2) “MG0 - MG2”

$$H_0: M(MG0) = M(MG2)$$

$$H_1: M(MG0) \neq M(MG2)$$

$$M(MG0) = 189.436425$$

$$\sigma(MG0) = 2.327247$$

$$M(MG2) = 63.497141$$

$$\sigma(MG2) = 1.443427$$

При уровне значимости  $\alpha=0,05$  и кол-ве степеней свободы  $f=8$  критическое значение t-критерия  $t_c=2.306$ . Значение t-критерия равно 45.99, p-значение =  $10^{-5}$ .

Вывод: гипотеза  $H_0$  отвергается в пользу альтернативной гипотезы при уровне значимости 0,05.

3) “MG1 - MG2”

$$H_0: M(MG1) = M(MG2)$$

$$H_1: M(MG1) \neq M(MG2)$$

$$M(MG1) = 97.047865$$

$$\sigma(MG1) = 1.549253$$

$$M(MG2) = 63.497141$$

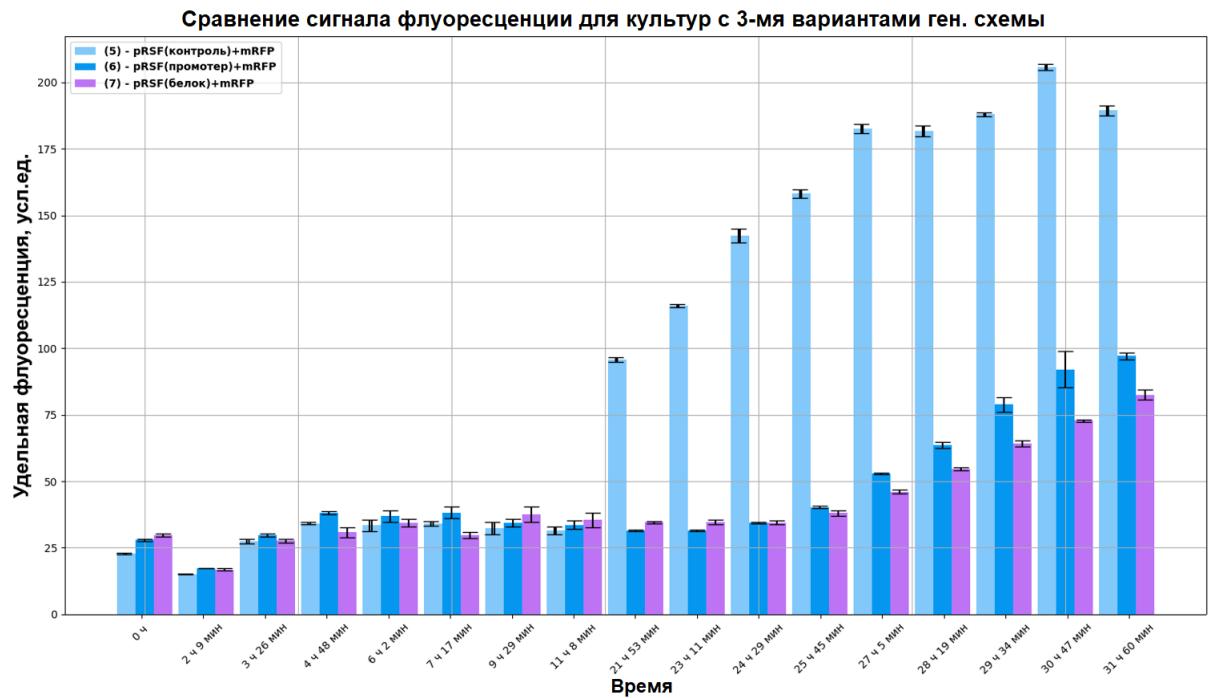
$$\sigma(MG2) = 1.443427$$

При уровне значимости  $\alpha=0,05$  и кол-ве степеней свободы  $f=8$  критическое значение t-критерия  $t_c=2.306$ . Значение t-критерия равно 15.84, p-значение =  $10^{-5}$ .

Вывод: гипотеза  $H_0$  отвергается в пользу альтернативной гипотезы при уровне значимости 0,05.

Т.о. в данном эксперименте наблюдаются значительные отличия уровня флуоресценции генетических схем со спайсерами к промотору и OPC от флуоресценции контроля, а также малого среднеквадратичного отклонения

сигнала флуоресценции (см. рис.15). На основе полученных результатов можно заключить, что разработанная система эффективно функционирует в соответствии с принципом работы логического вентиля “НЕ”. Кроме того, при нацеливании спейсера на OPC флуоресценция подавляется несколько эффективнее, чем при нацеливании на промотор.



*Рис.15. Кинетика роста сигнала флуоресценции от культур клеток с комбинациями репортерной и 3-х вариантов эффекторной плазиды, с добавлением IPTG (0,25 M). “Усами” обозначены значения стандартных отклонений для каждой пробы в каждом измерении.*

## 6. Выводы

1. Разработаны протоколы для культивирования бактериальных клеток, методами отбора проб из шейкера-инкубатора и постоянного культивирования в планшетном ридере;
2. Измерение кривых роста клеток в планшетном ридере упрощает

анализ генетических схем;

3. Получены ДНК-конструкции, кодирующие генетические элементы логического вентиля “НЕ” на основе CRISPR/dCas-системы;

4. Нацеливание dCas9-белка на область открытой рамки считывания белка эффективнее нацеливания на промоторную часть, поскольку нацеливание на ОРС приводит к снижению уровня экспрессии репортерного белка (RFP) на 54% по сравнению с контролем, в то время как при нацеливании на промотор - на 47%.

## 7. Список литературы

- 1) Liu Q., Schumacher J., Wan X., и др. Orthogonality and Burdens of Heterologous AND Gate Gene Circuits in *E. coli* // ACS Synth. Biol. 2018. Т. 7. № 2. С. 553–564.
- 2) Nielsen A. A., Voigt C. A. Multi-input CRISPR / C as genetic circuits that interface host regulatory networks // Molecular Systems Biology. 2014. Т. 10. № 11. С. 763.
- 3) Brophy J. A. N., Voigt C. A. Principles of genetic circuit design // Nat Methods. 2014. Т. 11. № 5. С. 508–520.
- 4) Mori T., Binder B., Johnson C. H. Circadian gating of cell division in cyanobacteria growing with average doubling times of less than 24 hours //Proceedings of the National Academy of Sciences. 1996. Т. 93. №. 19. С. 10183-10188
- 5) Kuspa A., Sucgang R., Shaulsky G. The promise of a protist: the *Dictyostelium* genome project // Functional & Integrative Genomics. 2001. Т. 1. № 5. С. 279–293.

- 6) Rodriguez-Leal D., Xu C., Kwon C.-T., и др. Evolution of buffering in a genetic circuit controlling plant stem cell proliferation // Nat Genet. 2019. T. 51. № 5. C. 786–792.
- 7) Prakash N., Wurst W. Genetic networks controlling the development of midbrain dopaminergic neurons // The Journal of Physiology. 2006. T. 575. № 2. C. 403–410.
- 8) Sajan S. A., Warchol M. E., Lovett M. Toward a Systems Biology of Mouse Inner Ear Organogenesis: Gene Expression Pathways, Patterns and Network Analysis // Genetics. 2007. T. 177. № 1. C. 631–653.
- 9) Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. Gene networks involved in drought stress response and tolerance // Journal of Experimental Botany. 2006. T. 58. № 2. C. 221–227.
- 10) Paulton R. J. L. The bacterial growth curve // Journal of Biological Education. 1991. T. 25. № 2. C. 92–94.
- 11) Widdel F. Theory and measurement of bacterial growth // Di dalam Grundpraktikum Mikrobiologie. 2007. T. 4. № 11. C. 1-11.
- 12) Reznikoff W. S. The lactose operon-controlling elements: a complex paradigm // Molecular Microbiology. 1992. T. 6. № 17. C. 2419–2422.
- 13) Жимулёв И. Ф. Общая и молекулярная генетика // Новосибирск: Сиб. унив. изд-во. – 2007.
- 14) Oehler S., Eismann E. R., Krämer H., и др. The three operators of the lac operon cooperate in repression. // The EMBO Journal. 1990. T. 9. № 4. C. 973–979.
- 15) Flashner Y., Gralla J. D. Dual mechanism of repression at a distance in the lac operon. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1988. T. 85. № 23. C. 8968–8972.
- 16) Dickson R. C., Abelson J., Barnes W. M., и др. Genetic Regulation: The Lac Control Region: The nucleotide sequence of the lac control region containing the promoter and operator is presented. // Science. 1975. T. 187. № 4171. C. 27–35.

- 17) Simpson R. B. Interaction of the cAMP receptor protein with the lac promoter // Nucleic Acids Res. 1980. T. 8. № 4. C. 759–766.
- 18) Schmitz A. Cyclic AMP receptor protein interacts with lactose operator DNA // Nucl Acids Res. 1981. T. 9. № 2. C. 277–292.
- 19) Maquat L. E. THE EFFECT OF BASE-PAIR ALTERATIONS ON ESCHERICHIA COLI LACTOSE PROMOTER EFFICIENCY AND NUCLEOTIDE SEQUENCE ANALYSES OF LACTOSE PROMOTER MUTANTS. 1980.
- 20) Xiong X. F., De La Cruz N., Reznikoff W. S. Downstream deletion analysis of the lac promoter // J Bacteriol. 1991. T. 173. № 15. C. 4570–4577.
- 21) Lorimer D. D., Cao J., Revzin A. Specific sequences downstream from –6 are not essential for proper and efficient in Vitro utilization of the Escherichia coli lactose promoter // Journal of Molecular Biology. 1990. T. 216. № 2. C. 275–287.
- 22) Irwin N., Ptashne M. Mutants of the catabolite activator protein of Escherichia coli that are specifically deficient in the gene-activation function. // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1987. T. 84. № 23. C. 8315–8319.
- 23) Ebright R. G., Oxender D. L. Protein structure, folding, and design // Alan R. Liss, New York, NY. 1986. C. 207-219.
- 24) Maquat L. E., Reznikoff W. S. In vitro analysis of the Escherichia coli RNA polymerase interaction with wild-type and mutant lactose promoters // Journal of Molecular Biology. 1978. T. 125. № 4. C. 467–490.
- 25) Malan T. P., McClure W. R. Dual promoter control of the escherichia coli lactose operon // Cell. 1984. T. 39. № 1. C. 173–180.
- 26) Peterson M. L., Reznikoff W. S. Properties of lac P2 in vivo and in vitro // Journal of Molecular Biology. 1985. T. 185. № 3. C. 535–543.
- 27) Yu X.-M., Reznikoff W. S. Deletion analysis of the CAP-cAMP binding site of the *Escherichia coil* lactose promoter // Nucl Acids Res. 1984. T. 12. № 13. C. 5449–5464.

- 28) Donnelly C. E., Reznikoff W. S. Mutations in the lac P2 promoter // J Bacteriol. 1987. T. 169. № 5. C. 1812–1817.
- 29) Eschenlauer A. C., Reznikoff W. S. Escherichia coli catabolite gene activator protein mutants defective in positive control of lac operon transcription // J Bacteriol. 1991. T. 173. № 16. C. 5024–5029.
- 30) Karls R., Schulz V., Jovanovich S. B., и др. Pseudorevertants of a *lac* promoter mutation reveal overlapping nascent promoters // Nucl Acids Res. 1989. T. 17. № 10. C. 3927–3949.
- 31) Rothmel R. K., LeClerc J. E. Mutational analysis of the *lac* regulatory region: second-site changes that activate mutant promoters // Nucl Acids Res. 1989. T. 17. № 10. C. 3909–3925.
- 32) Schulz V. P., Reznikoff W. S. Translation initiation of IS50R read-through transcripts // Journal of Molecular Biology. 1991. T. 221. № 1. C. 65–80.
- 33) Reznikoff W. S. et al. RNA Polymerase and the Regulation of Transcription. – Elsevier Science Pub. Co. Inc., New York, NY, 1987. – №. CONF-8607336-.
- 34) Atkinson M. R., Savageau M. A., Myers J. T., и др. Development of Genetic Circuitry Exhibiting Toggle Switch or Oscillatory Behavior in Escherichia coli // Cell. 2003. T. 113. № 5. C. 597–607.
- 35) Zhang Y., Zou Z.-P., Chen S.-Y., и др. Design and optimization of E. coli artificial genetic circuits for detection of explosive composition 2,4-dinitrotoluene // Biosensors and Bioelectronics. 2022. T. 207. C. 114205.
- 36) Gardner T. S., Cantor C. R., Collins J. J. Construction of a genetic toggle switch in Escherichia coli // Nature. 2000. T. 403. № 6767. C. 339–342.
- 37) Zhang H., Lin M., Shi H., и др. Programming a Pavlovian-like conditioning circuit in Escherichia coli // Nat Commun. 2014. T. 5. № 1. C. 3102.
- 38) Hasty J., McMillen D., Collins J. J. Engineered gene circuits // Nature. 2002. T. 420. № 6912. C. 224–230.

- 39) Wagner EK, Hewlett M, Bloom D, Camerini D, eds. "Technical Glossary" // *Basic Virology* (3rd ed.). 2008.
- 40) LaFleur T. L., Hossain A., Salis H. M. Automated model-predictive design of synthetic promoters to control transcriptional profiles in bacteria // *Nat Commun.* 2022. T. 13. № 1. C. 5159.
- 41) Б. З. Тарантул и др.// Словарь биотехнологических терминов / Москва : ИНИЦ Роспатента, 2005. 124, [2] с. : 21 см.
- 42) Ciampi M. S. *Rho-dependent terminators and transcription termination* // *Microbiology*. 2006. T. 152. № 9. C. 2515–2528.
- 43) Santos-Moreno J., Tasiudi E., Stelling J., и др. Multistable and dynamic CRISPRi-based synthetic circuits // *Nat Commun.* 2020. T. 11. № 1. C. 2746.
- 44) Bhatia S., Pooja, Yadav S. K. CRISPR-Cas for genome editing: Classification, mechanism, designing and applications // *International Journal of Biological Macromolecules*. 2023. T. 238. C. 124054.
- 45) Sander J. D., Joung J. K. CRISPR-Cas systems for editing, regulating and targeting genomes // *Nat Biotechnol.* 2014. T. 32. № 4. C. 347–355.
- 46) Larson M. H., Gilbert L. A., Wang X., и др. CRISPR interference (CRISPRi) for sequence-specific control of gene expression // *Nat Protoc.* 2013. T. 8. № 11. C. 2180–2196.
- 47) Jiang F., Doudna J. A. CRISPR–Cas9 Structures and Mechanisms // *Annu. Rev. Biophys.* 2017. T. 46. № 1. C. 505–529.
- 48) Xue Y., Du P., Ibrahim Shendi A. A., и др. Mercury bioremediation in aquatic environment by genetically modified bacteria with self-controlled biosecurity circuit // *Journal of Cleaner Production*. 2022. T. 337. C. 130524.
- 49) Ravikumar S., Ganesh I., Yoo I., и др. Construction of a bacterial biosensor for zinc and copper and its application to the development of multifunctional heavy metal adsorption bacteria // *Process Biochemistry*. 2012. T. 47. № 5. C. 758–765.

- 50) Maruthamuthu M. K., Ganesh I., Ravikumar S., и др. Evaluation of zraP gene expression characteristics and construction of a lead (Pb) sensing and removal system in a recombinant Escherichia coli // Biotechnol Lett. 2015. Т. 37. № 3. С. 659–664.
- 51) 배한홍 et al. Bacterial degradation of chlorophenols and their derivatives. – 2014.
- 52) Arora P. K., Srivastava A., Singh V. P. Bacterial degradation of nitrophenols and their derivatives // Journal of Hazardous Materials. 2014. Т. 266. С. 42–59.
- 53) Kolvenbach B. A., Corvini P. F.-X. The degradation of alkylphenols by Sphingomonas sp. strain TTNP3 – a review on seven years of research // New Biotechnology. 2012. Т. 30. № 1. С. 88–95.
- 54) Díaz E., Prieto M. A. Bacterial promoters triggering biodegradation of aromatic pollutants // Current Opinion in Biotechnology. 2000. Т. 11. № 5. С. 467–475.
- 55) Courbet A., Endy D., Renard E., и др. Detection of pathological biomarkers in human clinical samples via amplifying genetic switches and logic gates // Sci. Transl. Med. 2015. Т. 7. № 289.
- 56) Duan F. F., Liu J. H., March J. C. Engineered Commensal Bacteria Reprogram Intestinal Cells Into Glucose-Responsive Insulin-Secreting Cells for the Treatment of Diabetes // Diabetes. 2015. Т. 64. № 5. С. 1794–1803.
- 57) Weber W., Schoenmakers R., Keller B., и др. A synthetic mammalian gene circuit reveals antituberculosis compounds // Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 2008. Т. 105. № 29. С. 9994–9998.
- 58) Oliver J. W. K., Machado I. M. P., Yoneda H., и др. Combinatorial optimization of cyanobacterial 2,3-butanediol production // Metabolic Engineering. 2014. Т. 22. С. 76–82.
- 59) Oliver J. W. K., Atsumi S. A carbon sink pathway increases carbon productivity in cyanobacteria // Metabolic Engineering. 2015. Т. 29. С. 106–112.

- 60) Nozzi N. E., Atsumi S. Genome Engineering of the 2,3-Butanediol Biosynthetic Pathway for Tight Regulation in Cyanobacteria // ACS Synth. Biol. 2015. T. 4. № 11. C. 1197–1204.
- 61) Oliver N. J., Rabinovitch-Deere C. A., Carroll A. L., и др. Cyanobacterial metabolic engineering for biofuel and chemical production // Current Opinion in Chemical Biology. 2016. T. 35. C. 43–50.
- 62) Lee T.-C., Xiong W., Paddock T., и др. Engineered xylose utilization enhances bio-products productivity in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 // Metabolic Engineering. 2015. T. 30. C. 179–189.
- 63) Ro D.-K., Paradise E. M., Ouellet M., и др. Production of the antimalarial drug precursor artemisinic acid in engineered yeast // Nature. 2006. T. 440. № 7086. C. 940–943.
- 64) Kiyota H., Okuda Y., Ito M., и др. Engineering of cyanobacteria for the photosynthetic production of limonene from CO<sub>2</sub> // Journal of Biotechnology. 2014. T. 185. C. 1–7.
- 65) Jacobsen J. H., Frigaard N.-U. Engineering of photosynthetic mannitol biosynthesis from CO<sub>2</sub> in a cyanobacterium // Metabolic Engineering. 2014. T. 21. C. 60–70.
- 66) Goñi-Moreno A., Amos M. A reconfigurable NAND/NOR genetic logic gate // BMC Syst Biol. 2012. T. 6. № 1. C. 126.
- 67) Yin J., Wan H., Kong D., и др. A digital CRISPR-dCas9-based gene remodeling biocomputer programmed by dietary compounds in mammals // Cell Systems. 2024. T. 15. № 10. C. 941- 955.e5.
- 68) Brewster J. D. A simple micro-growth assay for enumerating bacteria // Journal of Microbiological Methods. 2003. T. 53. № 1. C. 77–86.