

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ
БЕЛОРУССКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ
Кафедра генетики

ЛЕКУНОВИЧ
Татьяна Васильевна

СОЗДАНИЕ СЕРИИ ВЕКТОРОВ ДЛЯ ОБЕСПЕЧЕНИЯ СТАБИЛЬНОЙ
ЭКСПРЕССИИ МОДИФИЦИРОВАННОГО ГЕНА CAS9 В КЛЕТКАХ
ЧЕЛОВЕКА

Аннотация
к дипломной работе

Научный руководитель:
кандидат биологических наук,
доцент Т.В. Романовская

Минск, 2018

РЕФЕРАТ

Дипломная работа включает: страниц – 53, рисунка – 21, таблиц – 8, источников – 42.

Ключевые слова: CRISPR/CAS9-СИСТЕМА, ТРАНСПОЗОННЫЕ ВЕКТОРА, САХАРНЫЙ ДИАБЕТ, МОЛЕКУЛЯРНОЕ КЛОНИРОВАНИЕ, ПЦР, ЛЕНТИВИРУСНАЯ ТРАНСДУКЦИЯ.

Объект исследования: *E.coli* DH5 α , клетки линии HEK293T человека.

Цель: создание серии векторов для обеспечения стабильной экспрессии модифицированного гена Cas9 в клетках человека, проектирование гидРНК для CRISPR системы активации генов, участвующих в дифференцировке β -клеток поджелудочной железы.

Методы: молекулярное клонирование, ПЦР, лентивирусная трансдукция, специализированные инструменты биоинформационного анализа.

На сегодняшний день существуют различные способы, позволяющие регулировать работу генов, что помогает в изучении функционирования клеток, а также в контроле их фенотипа. Однако все ранее используемые методы значительно уступают системе CRISPR/Cas, которая начиная с 2011 года, совершила настоящий прорыв в области генной инженерии, открыв принципиально новые возможности для манипуляций на уровне генома высших организмов. Эта система была перепрофилирована для эффективной и специфически нацеленной на геном платформы, с помощью которой будет возможно контролировать транскрипцию целевых генов без изменения последовательности ДНК-мишени. Для этого используют различные модификации белка Cas9, в том числе пришивание активаторных (VP 160) и репрессорных (KRAB) доменов, а также разрабатывают последовательности гидРНК, направляющие этот модифицированный белок на интересующий нас локус в геноме.

В ходе настоящего исследования была разработана схема создания транспозонных векторов для репрессии и активации целевых генов. Установлена причина, не позволяющая получить конечный вектор. Разработаны последовательности гидРНК для CRISPR системы активации генов INS, PDX1, MAFA, NEUROD1 в клетках человека с использованием специализированных инструментов биоинформационного анализа. Кроме того, получена линия клеток, стабильно экспрессирующих dCas9 совместно с репортерным геном устойчивости к бластицидину. Подобрана оптимальная концентрация бластицидина для осуществления селекции модифицированных клеток.

РЕФЕРАТ

Дыпломная праца ўключае: старонак – 53, малюнка – 21, табліц – 8, крыніц – 42.

Ключавыя словы: CRISPR/CAS9-СІСТЭМА, ЦУКРОВЫ ДЫЯБЭТ, ТРАНСПАЗОННЫЯ ВЕКТАРА, МАЛЕКУЛЯРНАЕ КЛАНАВАННЕ, ПЛР, ЛЕНЦІВІРУСНАЯ ТРАНСДУКЦЫЯ.

Аб'ект даследавання: *E.coli* (штам DH5 α), клеткі лініі HEK293T чалавека.

Мэта: стварэнне серыі вектароў для забеспячэння стабільнай экспрэсіі мадыфікаванага гена Cas9 ў клетках чалавека, праектаванне гідРНК для CRISPR-сістэмы актывацыі генаў, якія ўдзельнічаюць у дыферэнцыроўке β -клетак падстраўнікавай залозы.

Метады: малекулярнае кланаванне, палімеразная ланцуговая рэакцыя, спецыялізаваныя інструменты біяінфармацыйнага аналізу.

На сённяшні дзень існуюць розныя спосабы, якія дазваляюць рэгуляваць працу генаў, што дапамагае ў вывучэнні функцыянавання клетак, а таксама ў кантролі іх фенатыпу. Аднак усе метады, якія выкарыстоўваліся раней, значна саступаюць сістэме CRISPR/Cas, якая пачынаючы з 2011 года, здзейсніла сапраўдны прарыв у вобласці геннай інжынерыі, адкрыўшы новыя магчымасці для маніпуляцый на ўзроўні геному вышэйшых арганізмаў.

Гэтая сістэма была перапрафіліравана для эфектыўнай і спецыфічна нацэленай на геном платформы, з дапамогай якой будзе магчыма кантраляваць транскрыпцыю мэтавых генаў без змены паслядоўнасці ДНК-мішэні. Для гэтага выкарыстоўваюць розныя мадыфікацыі бялку Cas9, у тым ліку прышыванне актыватарных (VP 160) і рэпрэсарных (KRAB) даменаў, а таксама распрацоўваюць паслядоўнасці гідРНК, якія накіроўваюць гэты мадыфікаваны бялок на канкрэтны локус ў геноме.

У ходзе гэтага даследавання была распрацавана схема стварэння транспазонных вектароў для рэпрэсіі і актывацыі мэтавых генаў. Устаноўлена прычына, якая не дазваляе атрымаць канчатковы вектар. Распрацаваны паслядоўнасці гідРНК для CRISPR-сістэмы актывацыі генаў INS, PDX1, MAFA, NEUROD1 у клетках чалавека з выкарыстаннем спецыялізаваных інструментаў біяінфармацыйнага аналізу. Акрамя таго, атрымана лінія клетак, якая стабільна экспрэсіруе dCas9 сумесна з рэпарцэрным генам ўстойлівасці да бласціцыдзіну. Падабрана аптымальная канцэнтрацыя бласціцыдзіна для ажыццяўлення селекцыі мадыфікаваных клетак.

ABSTRACT

The graduation project includes: pages – 53, figure – 21, tables – 8, sources – 42.

Key words: CRISPR/CAS9 SYSTEM, DIABETES, TRANSPOSON VECTORS, MOLECULAR CLONING, PCR, LENTIVIRAL TRANSDUCTION.

Object of investigation: *E.coli* DH5 α , human cell line HEK293T.

Aim of work: to create a range of vectors for providing a stable expression of the modified gene Cas9 in human cells, to design the sgRNA for CRISPR technology of genes activation, that take part in differentiation of β -cells of pancreas. And to design the sgRNA for CRISPR-mediated activation of genes involved in the differentiation of β -cells of the pancreas.

Methods: molecular cloning, PCR, lentiviral transduction, specialized tools of the bioinformation analysis.

Nowadays, there are a lot of different methods for regulation of genes expression, which help to study of cells functioning of cells and also to control their phenotype. However, all previously used methods are much inferior to the CRISPR/Cas system, which has made a real breakthrough in the field of genetic engineering since 2011, by opening essentially new opportunities for manipulations at the higher organisms genome level.

This system was reorientated for the effective and specifically genome-targeted platform, through which will be possible to control the transcription of target genes without changing the sequence of the target DNA. For this purpose various modifications of the Cas9 protein, including fusion with activator (VP 160) and repressor (KRAB) domains, are used and also sequences of the sgRNAs that direct this modified protein to the locus of interest in the genome, are developed.

In the course of this study the scheme of creation of transposon vectors for repression and activation of target genes has been developed. Here we established the reason, which does not allow us to obtain final vector. Also we developed sequences of the sgRNA for the CRISPR technology of activation of INS, PDX1, MAFA, NEUROD1 genes in human cells have been developed using specialized tools of the bioinformation analysis. Furthermore, we obtained a cell line, that stably expresses dCas9 together with a reporter blasticidin resistance gene. In addition, we determined the optimal concentration of blasticidin for the selection of modified cells.