АННОТАЦИЯ

исследовательской работы на соискание степени
доктора философии (PhD) по специальности «8D05105 – Биотехнология»

Шайзадиновой Айши Маратовны

на тему: «Изучение новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas систем для применения в диагностике»

Общая характеристика диссертационного исследования. Диссертационная работа посвящена характеристике новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas – MbCas12a и MeCas12a, а также разработке молекулярной диагностики на основе этих ферментов.

Актуальность исследования. В последние годы технологии CRISPR/Cas стали объектом активных исследований, благодаря чему их применение в различных областях науки и медицины существенно расширилось. Первоначально CRISPR/Cas системы были открыты как иммунный механизм архей и бактерий, используемый ими для распознавания и уничтожения чужеродных нуклеиновых кислот. Этот механизм включает два основных компонента: кластер генов CRISPR, сохраняющий информацию о вирусных или плазмидных инвазиях, и белки Cas, обеспечивающие молекулярный механизм иммунитета, который активируется при повторной инвазии чужеродной нуклеотидной последовательности. В дальнейшем системы CRISPR/Cas нашли широкое применение в геномном редактировании, что открыло новые горизонты в генной инженерии, включая разработку методов генотерапии и эпигенетических исследований.

Одним из наиболее перспективных направлений использования CRISPR/Cas является молекулярная диагностика инфекционных заболеваний. Благодаря способности CRISPR/Cas обнаруживать и уничтожать чужеродные ДНК- и РНК-последовательности с высокой точностью, эти системы стали основой для создания диагностических платформ, способных выявлять даже малые концентрации патогенных организмов. Эти методы отличаются высокой точностью, быстротой и простотой использования, а для некоторых платформ не требуется дорогостоящее оборудование, что делает их особенно актуальными в условиях глобальных вызовов в области здравоохранения.

Таким образом, использование систем CRISPR/Cas в молекулярной диагностике представляет собой инновационный подход, который открывает новые перспективы в борьбе с инфекционными заболеваниями и способствует развитию новых методов диагностики.

Объекты исследования. Объектами исследования являются РНК-направляемые эндонуклеазы Cas12a, полученные из штаммов *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*; синтетические направляющие crРНК; ДНК-фрагменты патогенов *E. coli*, *S. aureus* и *Alternaria* spp.

Предмет исследования. Структурная и функциональная характеристика эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a и разработка эффективных методов молекулярной диагностики на их основе.

Цель исследования. Характеристика новых программируемых РНК-направляемых эндонуклеаз CRISPR/Cas, а также использование данных систем в точной идентификации участков ДНК патогенов в молекулярной диагностике.

Задачи исследования:

1. Получение и структурно-функциональное исследование рекомбинантных эндонуклеаз Cas12a из штаммов *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*.

2. Дизайн направляющих РНК (крРНК), определение оптимальной последовательности PAM для эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a, получение рибонуклеопротеинового комплекса CRISPR-Cas12a, и оптимизация условий для их работы в *in vitro* условиях.

3. Проведение гомологичного моделирования и изучение мутантных форм ферментов Cas12a для идентификации активного центра эндонуклеазы.

4. Разработка диагностических систем на основе LAMP/CRISPR-Cas12a и RPA/CRISPR-Cas12a.

Методы исследования. В исследовании использованы методы молекулярной биологии (амплификация ДНК, клонирование, трансформация), биохимии (экспрессия и очистка белков), генной инженерии (создание рекомбинантных конструкций), биоинформатики (моделирование структур, анализ последовательностей), а также структурно-функционального анализа белков с использованием программных средств визуализации.

Научная новизна исследования. Научная новизна работы заключается в характеристике и получении новых ранее не изученных аналогов Cas12a, которые являются программируемыми РНК-направляемыми эндонуклеазами CRISPR/Cas систем. Также научная новизна лежит в разработке высокочувствительных и специфичных методов молекулярной диагностики на основе полученных ферментов в комбинации с предварительной изотермической амплификацией для усиления эффективности детекции.

Практическая значимость исследования. Практическая значимость данной работы заключается в создании высокоэффективных и точных диагностических платформ, способных к надежному выявлению патогенов и инфекционных заболеваний, что способствует значительному улучшению методов ранней диагностики и лечения в клинической практике, а также в полевых условиях.

Теоретическая значимость. Теоретическая значимость работы состоит в расширении знаний о механизмах работы эндонуклеаз CRISPR/Cas, их взаимодействии с ДНК и возможностях их применения в биотехнологии.

Основные положения диссертации, выносимые на защиту:

1. Функционально активные рекомбинантные белки MbCas12a и MeCas12a из *Moraxella bovis* и *Moraxella equi* представлены в качестве новых аналогов Cas12a, обладающих подтверждённой *in vitro* нуклеазной активностью в комплексе с направляющими crРНК. Оптимизированная схема экспрессии и очистки обеспечивает получение высокоочищенных белков.

2. Структурные параметры направляющих РНК, включая длину 46–47 нуклеотидов, таргетную область 23–24 нуклеотида и PAM-последовательность “TTTN”, определяют высокую специфичность взаимодействия с ДНК-мишенью и эффективную работу эндонуклеаз MbCas12a и MeCas12a. Биохимические условия реакции — 2 мкМ crРНК, 1 мкМ Cas12a, температурный режим 37 °C и время инкубации 15–30 минут — обеспечивают формирование рибонуклеопротеинового комплекса и максимальную эндонуклеазную активность при расщеплении нуклеиновых кислот.

3. Функциональное значение каталитических доменов RuvC и Nuc в ферментах MbCas12a и MeCas12a подтверждено гомологичным моделированием и сайт-направленным мутагенезом. Критически важные аминокислотные остатки, в том числе в участках RuvC1, RuvC2, RuvC3 и Nuc, определяют активность фермента при расщеплении ДНК. Мутации в указанных позициях приводят к полной или частичной потере эндонуклеазной активности.

4. Разработанный и экспериментально обоснованный способ молекулярной диагностики патогенов на основе эндонуклеазы MbCas12a в сочетании с изотермической амплификацией (LAMP, РПА), обеспечивает специфическое и чувствительное выявление ДНК-мишеней. Чувствительность диагностических систем достигает от 10^1 до 10^4 копий ДНК, что демонстрирует их практическую применимость для быстрой и полевой диагностики микробных и грибковых патогенов таких как *E. coli, S. aureus* и *Alternaria spp.*

Основные результаты исследований и выводы

1) Получены гены эндонуклеаз Cas12a (*Moraxella bovis*) и Cas12a (*Moraxella equi*). Ген Cas12a (*Moraxella bovis*) клонирован в промежуточный вектор для сиквенсного анализа, наработки и хранения. Ген Cas12a (*Moraxella equi*) синтезирован с кодон-оптимизированной последовательностью. Оба белка, MbCas12a и MeCas12a, экспрессированы в клетках *E. coli*,

оптимизированы условия их очистки, подтверждена их чистота и идентичность методами SDS-PAGE и хроматографии. Экспериментальные исследования показали, что обе эндонуклеазы проявляют специфичную активность по расщеплению ДНК в присутствии crРНК, что подтверждает их функциональность в условиях *in vitro*.

2) Определена оптимальная последовательность PAM участка для ферментов MbCas12a и MeCas12a, при которой наблюдается наивысшая активность в расщеплении ДНК. Исследования показали, что последовательность TTTN, где «N» обозначает любой нуклеотид, является предпочтительной для максимальной специфичности и эффективности действия данных эндонуклеаз. Проведённый скрининг показал, что вариации PAM-мотива (TTTT, TTTA, TTTC, TTTG) демонстрируют сопоставимый уровень активности, что подтверждено денситометрическим анализом. Это свидетельствует о высокой толерантности и адаптивности CRISPR/Cas12a-систем к различным PAM-конфигурациям без значительной потери эффективности.

3) Произведены дизайн, синтез и очистка направляющих РНК (crРНК). Дизайн crРНК был проведен при помощи поиска прямых повторов в геномных последовательностях *Moraxella bovis* и *Moraxella equi*, а также поиска таргетной области в последовательностях целевых ДНК патогенов. Далее проводился синтез и очистка crРНК. Тестирование эффективности синтезированных crРНК проводилось в условиях их взаимодействия с эндонуклеазами MbCas12a и MeCas12a для оценки способности расщепления ДНК. В ходе экспериментов было подтверждено, что эти crРНК эффективно направляют эндонуклеазы на целевые участки ДНК, обеспечивая точное и специфичное расщепление. Также были синтезированы crРНК с использованием специфических праймеров, проведены эксперименты для определения оптимальной длины crРНК и укорочения «ручки» crРНК. Проведённый анализ показал, что как длина таргетной области, так и длина 5′-ручки crРНК существенно влияют на эндонуклеазную активность Cas12a. Сокращение таргетной части направляющей РНК с 23 до 15 нуклеотидов вызывало статистически значимое снижение активности фермента; при этом денситометрический анализ показал сохранение остаточной активности на уровне 3–8%, что соответствует практически полной, но не абсолютной утрате функциональности. Оптимальная длина таргетной области составила 23–24 нуклеотида. Аналогично, укорочение 5′-ручки crРНК ниже 15 нуклеотидов также приводило к значимому снижению активности, при этом наиболее резкое падение наблюдалось при длине ручки 13 нуклеотидов и менее.

4) В ходе работы были изучены активность и специфичность эндонуклеаз Cas12a по отношению к различным субстратам. Оптимизированы условия для проведения биохимических реакций, включая температуру, время реакции, концентрацию компонентов и состав буфера. Оптимальные концентрации crРНК и Cas12a в реакции цис-активности – 2 мкМ и 1 мкМ соответственно. В ходе исследования было установлено, что расщепление ДНК эндонуклеазами Cas12a начинается уже через 5 минут инкубации при оптимальных условиях реакции. Однако для достижения достоверности и максимальной воспроизводимости результатов инкубацию проводили в течение 30 минут. Для обеспечения условий транс-активности использовали концентрации компонентов: 100 нМ crРНК, 100 нМ Cas12a, и буферную систему 1× NEBuffer 2.1. Эти параметры были выбраны на основе предварительных оптимизационных экспериментов, обеспечивающих высокую активность и специфичность системы CRISPR/Cas12a. Результаты флуоресцентного анализа, основанного на методе CRISPR/Cas12a, показали, что инкубация комплекса MbCas12a с crРНК при 25°C в течение 15 минут, а затем реакция транс-расщепления при 37°C в течение 30 минут с продуктами амплификации, позволяет визуализировать результаты с помощью трансиллюминатора под ультрафиолетовым излучением.

5) Проведённое гомологичное моделирование ферментов MbCas12a и MeCas12a позволило идентифицировать каталитически значимые аминокислоты, расположенные в доменах RuvC и NUC. Сайт-направленный мутагенез и последующее тестирование активности мутантных форм подтвердили функциональную значимость этих остатков.

Мутации в доменах RuvC1 (D874A/D864A), RuvC2 (E968A/E958A), RuvC3 (D1218A/D1208A) и NUC (R1181A/R1171A) приводили к полному или частичному ингибированию ферментативной активности. Достоверные различия между активными и инактивированными формами были подтверждены денситометрическим анализом и статистически значимыми результатами. Полная потеря активности наблюдалась при мутациях D874A, E968A, D1218A (MbCas12a) и D864A, E958A, D1208A (MeCas12a). При этом мутации R1181A и R1171A приводили к частичному снижению активности, что свидетельствует о дифференцированной роли этих остатков в каталитической функции. Кроме того, данные подтверждают, что домены RuvC ответственны преимущественно за расщепление обеих цепей ДНК, тогда как остатки домена Nuc вносят вклад в расщепление одной цепи, указывая на их специфическую функциональную нагрузку.

6) Была проведена оптимизация условий петлевой изотермической амплификации LAMP и рекомбиназной полимеразной амплификации РПА. Для реакции РПА были оптимизированы условия температуры (37-39°C) и времени (20-30 минут), а также были сконструированы специфические праймеры для детекции таргетных ДНК. Для амплификации ДНК методом LAMP были также подобраны температура - 62°C, время - 45 минут, а также применялись специальные наборы праймеров (3 пары праймеров).

7) Разработан иммунохроматографический латеральный потоковый анализ на основе метода CRISPR/Cas12a, использующий золотые наночастицы и одноцепочечные ДНК-зонды, меченные флуоресцеином и биотином. Реакция проводилась при 37°C в течение 30 минут с последующей визуализацией результатов на полоске ИХА, что позволяет оперативно и эффективно выявлять целевые ДНК-последовательности.

8) Разработан и предложен метод молекулярной диагностики *Escherichia coli*, основанный на сочетании изотермической амплификации LAMP и технологии CRISPR/MbCas12a. Метод обеспечивает чувствительность до 1 копии плазмидной ДНК и 10 копий геномной ДНК на реакцию. Обеспечена специфичность за счёт использования таргетных crРНК и фермента MbCas12a с коллатеральной активностью, что позволило достоверно отличать *E. coli* от других патогенов мастита, включая *S. aureus* и *S. agalactiae*. Метод апробирован на образцах маститного молока и показал воспроизводимую детекцию *E. coli* в реальных клинических условиях, что подтверждает его применимость для экспресс-диагностики в ветеринарной практике.

9) Был разработан молекулярный диагностический метод для выявления *Staphylococcus aureus*, основанный на комбинации рекомбиназной полимеразной амплификации (RPA) и CRISPR/MbCas12a с использованием crРНК, нацеленной на ген *nuc*. Метод позволяет обнаруживать до 100 копий ДНК и обеспечивает селективную идентификацию *S. aureus* без перекрёстных реакций с другими патогенами. Проведена валидация метода на 13 клинических изолятах, включая пробы маститного молока, где система продемонстрировала стабильность, точность и оперативность (время анализа — около 60 минут), что делает её пригодной для первичного экспресс-тестирования в полевых условиях.

10) Разработан метод детекции *Alternaria spp.* с использованием CRISPR/MbCas12a и предварительной амплификации методом RPA. Метод позволяет выявлять до 100 копий ДНК в образцах зерна пшеницы. Проведена оценка видовой специфичности: метод не давал сигнала при наличии ДНК *Bipolaris sorokiniana*, *Nigrospora oryzae*, *Fusarium equiseti* и *Fusarium acuminatum*. Анализ инфицированных фитопатологическим материалом образцов подтвердил применимость метода для экспресс-скрининга *Alternaria spp.* в задачах фитосанитарного контроля и агробиотехнологии.

11) Статистический анализ данных чувствительности разработанных молекулярных диагностических методов, а также проведённая статистическая обработка результатов, полученных методом денситометрического анализа электрофореграмм, показала, что активность эндонуклеазы Cas12a достоверно зависит от условий тестирования, включая структуру направляющей РНК, мутации в каталитических доменах, а также концентрации

компонентов реакции. Значимые различия были установлены при использовании однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA, $p < 0,05$) и непараметрического критерия Крускала–Уоллиса.

12) Разработано портативное устройство CRISPR-Kaz для флуоресцентной визуализации и детекции патогенов на основе технологии CRISPR/Cas12a. Устройство предназначено для использования в условиях ограниченной инфраструктуры, включая полевые исследования. Конструкция включает корпус, напечатанный на 3D-принтере, с лунками для стандартных пробирок, стеклянную платформу для равномерного распределения УФ-света и встроенный УФ-источник. Дизайн обеспечивает компактность, удобство эксплуатации и возможность быстрой детекции патогенов.

Связь с планом основных научных работ. Диссертация была выполнена в лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии» в рамках выполнения гранта AP09259771 «Характеристика новых программируемых рнк-направляемых эндонуклеаз CRISPR/CAS систем для применения в диагностике», BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a».

Апробация научно-исследовательской работы. Результаты научно-исследовательской работы были представлены на научно-техническом совете факультета биологии и биотехнологии, заседаниях кафедры генетики и молекулярной биологии КазНУ имени аль-Фараби, научных семинарах лаборатории молекулярной биотехнологии ТОО «Национальный центр биотехнологии». Результаты диссертационной работы включены в отчеты НИР по проектам AP09259771 «Характеристика новых программируемых рнк-направляемых эндонуклеаз CRISPR/CAS систем для применения в диагностике», BR10764944 «Разработка методов аналитического контроля и проведения мониторинга безопасности пищевой продукции», AP19579275 «Разработка современной молекулярной диагностики патогенов сельскохозяйственных культур на основе метода CRISPR/Cas12a».

Публикации. Основные результаты диссертационной работы представлены в 7 печатных работах, в том числе 3 статьи в журналах с ненулевым импакт-фактором входящим в базу данных Web of Science или Scopus, 3 статьи в республиканских научных изданиях, рекомендуемых ККСОН МОН РК, получен 1 патент. Оформлена 1 нормативно-техническая документация (НТД).

Личный вклад докторанта. Личный вклад докторанта включает планирование и проведение экспериментов, анализ данных, написание научных статей, обработку результатов исследования.

Объём и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания методов, результатов исследований и обсуждения полученных данных, заключения, списка литературы и приложений. Диссертация изложена на 163 страницах и содержит 16 таблиц, 88 рисунков, 162 источника, 9 приложений.