АҢДАТПА

философия докторы (PhD) дәрежесін алуға арналған зерттеу жұмысы, «8D05105 – Биотехнология» мамандығы бойынша

Шайзадинова Айша Маратовна

тақырыбы: «Диагностикада қолдануға арналған CRISPR/Cas жүйелерінің эндонуклеазаларын РНҚ-ға бағытталаған жаңа бағдарламаланатын жүйелерін зерттеу»

Диссертациялық зерттеудің жалпы сипаттамасы. Диссертациялық жұмыс жаңа бағдарламаланатын РНҚ-бағытталған CRISPR/Cas эндонуклеазалары – MbCas12a және MeCas12a сипаттамасына, сондай-ақ осы ферменттер негізінде молекулалық диагностика әзірлеуге арналған.

Зерттеудің өзектілігі. Соңғы жылдары CRISPR/Cas технологиялары ғылым мен медицинаның әртүрлі салаларында кеңінен қолданыла бастады, бұл олардың зерттеу объектісі ретінде белсенді түрде қарастырылуына әкелді. Бастапқыда CRISPR/Cas жүйелері архейлер мен бактериялардың бөгде нуклеин қышқылдарын тану және жою үшін қолданатын иммундық механизмі ретінде ашылды. Бұл механизм екі негізгі компонентті қамтиды: вирустық немесе плазмидтік инвазиялар туралы ақпаратты сақтайтын CRISPR гендер кластері және бөгде нуклеотидтік тізбектің қайта инвазиясы кезінде белсендірілетін молекулалық иммунитет механизмін қамтамасыз ететін Cas ақуыздары. Кейіннен CRISPR/Cas жүйелері геномды өңдеуде кеңінен қолданыла бастады, бұл гендік инженерияда, соның ішінде генотерапия әдістерін және эпигенетикалық зерттеулерді дамытуда жаңа мүмкіндіктер ашты.

CRISPR/Cas қолданудың ең перспективалы бағыттарының бірі – инфекциялық аурулардың молекулалық диагностикасы. CRISPR/Cas жүйелерінің бөгде ДНҚ және РНҚ тізбектерін жоғары дәлдікпен анықтау және жою қабілеті оларды патогендік организмдердің аз концентрациясын анықтай алатын диагностикалық платформалар құрудың негізіне айналдырды. Бұл әдістер жоғары дәлдікпен, жылдамдықпен және қолданудың қарапайымдылығымен ерекшеленеді, ал кейбір платформалар үшін қымбат жабдықтар қажет емес, бұл оларды денсаулық сақтаудың жаһандық сын-қатерлері жағдайында әсіресе өзекті етеді.

Осылайша, CRISPR/Cas жүйелерін молекулалық диагностикада қолдану инфекциялық аурулармен күресте жаңа перспективалар ашатын және диагностиканың жаңа әдістерін дамытуға ықпал ететін инновациялық тәсіл болып табылады.

Зерттеу объектілері. *Moraxella bovis* және *Moraxella equi* штаммдарынан алынған Cas12a түріндегі РНҚ-бағытталған эндонуклеазалар, синтетикалық бағыттаушы crРНҚ молекулалары, сондай-ақ *E. coli*, *S. aureus* және *Alternaria* spp. патогендеріне тән ДНҚ-фрагменттері.

Зерттеу пәні. MbCas12a және MeCas12a эндонуклеазаларының құрылымдық және функционалдық сипаттамасы және олардың негізінде тиімді молекулалық диагностика әдістерін әзірлеу.

Зерттеу мақсаты. Жаңа бағдарламаланатын РНҚ-бағытталған CRISPR/Cas эндонуклеазаларын сипаттау, сондай-ақ осы жүйелерді патогендердің ДНҚ учаскелерін молекулалық диагностикада дәл анықтау үшін қолдану.

Зерттеу міндеттері:

1. *Moraxella bovis* және *Moraxella equi* штаммдарынан рекомбинантты Cas12a эндонуклеазаларын алу және олардың құрылымдық-функционалдық зерттеуі.
2. Бағыттаушы РНҚ (крРНҚ) дизайнын жасау, MbCas12a және MeCas12a эндонуклеазалары үшін оңтайлы PAM тізбегін анықтау, CRISPR-Cas12a рибонуклеопротеинді кешенін алу және олардың *in vitro* жағдайда жұмыс істеуі үшін оңтайлы жағдайларды анықтау.

3. Cas12a ферменттерінің гомологты модельдеуін жүргізу және эндонуклеаза активті орталығын анықтау үшін мутантты формаларын зерттеу.
4. LAMP/CRISPR-Cas12a және RPA/CRISPR-Cas12a негізінде диагностикалық жүйелерді әзірлеу.

Зерттеу әдістері. Зерттеу барысында молекулалық биология әдістері (ДНҚ амплификациясы, клондау және трансформация), биохимия әдістері (рекомбинантты ақуыздарды экспрессиялау және тазарту), гендік инженерия тәсілдері (плазмидалық векторлар мен рекомбинантты жүйелерді құрастыру), сондай-ақ биоинформатика әдістері (тізбектерді талдау, гомологиялы модельдеу және құрылымдық болжау) қолданылды. Cas12a ақуыздарының құрылымдық және функционалдық талдауы үшөлшемді модельдеу және белсенді орталықтарды аннотациялау үшін арнайы бағдарламалық жасақтама көмегімен жүргізілді.

Зерттеудің ғылыми жаңалығы. Жұмыстың ғылыми жаңалығы бұрын зерттелмеген Cas12a аналогтарын, яғни бағдарламаланатын РНҚ-бағытталған CRISPR/Cas жүйелерінің эндонуклеазаларын сипаттау және алуда жатыр. Сондай-ақ ғылыми жаңалық алынған ферменттерді алдын ала изотермиялық амплификациямен біріктіріп, жоғары сезімтал және спецификалық молекулалық диагностика әдістерін әзірлеуде болып табылады.

Зерттеудің практикалық маңыздылығы. Жұмыстың практикалық маңыздылығы патогендер мен инфекциялық ауруларды сенімді анықтауға қабілетті жоғары тиімді және дәл диагностикалық платформалар құруда, бұл клиникалық практикада және далалық жағдайларда ерте диагностика мен емдеу әдістерін айтарлықтай жақсартуға ықпал етеді.

Зерттеудің теориялық маңыздылығы. Жұмыстың теориялық маңыздылығы CRISPR/Cas эндонуклеазаларының жұмыс механизмдері, олардың ДНҚ-мен өзара әрекеттесуі және биотехнологияда қолдану мүмкіндіктері туралы білімді кеңейтуде жатыр.

Диссертацияның қорғауға шығарылатын негізгі ережелері:

1. *Moraxella bovis* және *Moraxella equi*-ден алынған функционалды белсенді рекомбинантты MbCas12a және MeCas12a ақуыздары бағыттаушы crРНҚ-мен кешенде in vitro жағдайында нуклеазалық белсенділігі расталған Cas12a-ның жаңа аналогтары ретінде ұсынылады. Экспрессия мен тазартып алу сызбасының оңтайландырылуы жоғары дәрежеде тазартылған ақуыздарды алуға мүмкіндік береді.
2. Бағыттаушы РНҚ-лардың құрылымдық параметрлері, оның ішінде ұзындығы 46–47 нуклеотид, нысаналы аймағы 23–24 нуклеотид және “TTTN” PAM-тізбегі, ДНҚ-нысанаға жоғары ерекшеліктегі байланыс пен MbCas12a және MeCas12a эндонуклеазаларының тиімді жұмысын қамтамасыз етеді. Биохимиялық реакция жағдайлары — 2 мкМ crРНҚ, 1 мкМ Cas12a, 37 °C температура және 15–30 минут инкубация уақыты — рибонуклеопротеиндік кешеннің түзілуі мен нуклеин қышқылдарын тиімді ыдыратуға қажетті максималды эндонуклеазалық белсенділікті қамтамасыз етеді.
3. MbCas12a және MeCas12a ферменттеріндегі RuvC және Nuc каталитикалық домендерінің функционалдық маңызы гомологияға негізделген модельдеу және сайтқа бағытталған мутагенез әдістері арқылы дәлелденді. RuvC1, RuvC2, RuvC3 және Nuc аймақтарындағы маңызды аминқышқылдық қалдықтар ферменттің ДНҚ-ны ыдырату қабілетін анықтайды. Аталған позициялардағы мутациялар эндонуклеазалық белсенділіктің толық немесе ішінара жоғалуына әкеледі.
4. MbCas12a эндонуклеазасына және изотермиялық амплификацияға (LAMP, RPA) негізделген молекулалық диагностика әдісі әзірленіп, тәжірибелік түрде дәлелденді; бұл әдіс ДНҚ-нысандарын ерекше және сезімтал анықтауға мүмкіндік береді. Диагностикалық жүйелердің сезімталдығы 10^1–10^4 ДНҚ көшірмесіне дейін жетеді, бұл оларды *E. coli*, *S. aureus* және *Alternaria* spp. сияқты микробтық және зеңді патогендерді жылдам әрі далалық жағдайда анықтау үшін қолдануға болатындығын көрсетеді.

Зерттеудің негізгі нәтижелері мен қорытындылары

1. *Moraxella bovis* және *Moraxella equi*-ден алынған Cas12a эндонуклеазаларын кодтайтын гендер алынды. *Moraxella bovis*-тің Cas12a гені сиквенирлеу, жинақтау және сақтау мақсатында аралық векторға клондалды. *Moraxella equi*-дің Cas12a гені кодонға оңтайландырылған тізбектің негізінде синтезделді. MbCas12a және MeCas12a ақуыздары *E. coli* жасушаларында экспрессияланды, олардың тазарту шарттары оңтайландырылды. Ақуыздардың тазалығы мен сәйкестігі SDS-PAGE және хроматография әдістерімен расталды. Эксперименттік зерттеулер көрсеткендей, екі эндонуклеаза да crРНҚ қатысуымен ДНҚ-ны ерекше тіліп, in vitro жағдайында функционалды белсенділігін көрсетті.

2. MbCas12a және MeCas12a үшін оңтайлы PAM тізбегі анықталды, ол ДНҚ-ны тіліп бөлу белсенділігінің ең жоғары деңгейін қамтамасыз етеді. Зерттеулер TTTN тізбегі (мұндағы “N” — кез келген нуклеотид) бұл эндонуклеазалар үшін тиімділік пен ерекшелік тұрғысынан ең қолайлы екенін көрсетті. PAM-мотивтерінің (TTTT, TTTA, TTTC, TTTG) түрлі нұсқаларының белсенділігі денситометриялық талдау арқылы салыстырылып, ұқсас нәтижелер көрсетті. Бұл CRISPR/Cas12a жүйесінің әртүрлі PAM конфигурацияларына бейімділігін және тиімділігін жоғалтпай икемді жұмыс істейтінін дәлелдейді.

3. Бағыттаушы РНҚ (crРНҚ) дизайны, синтезі және тазартылуы жүзеге асырылды. crРНҚ дизайны *Moraxella bovis* пен *Moraxella equi* геномдарынан тікелей қайталанатын тізбектерді және патогендік ДНҚ-ның нысаналық аймақтарын анықтау негізінде жүргізілді. Синтезделген crРНҚ-лардың тиімділігі MbCas12a және MeCas12a ферменттерімен әрекеттесу арқылы тексерілді. Зерттеу нәтижелері көрсеткендей, бұл crРНҚ-лар эндонуклеазаларды мақсатты ДНҚ бөліктеріне дәл бағыттай отырып, тиімді және ерекше тіліп бөлуге мүмкіндік береді. Сонымен қатар, арнайы праймерлермен синтезделген crРНҚ-лар қолданылып, crРНҚ-ның ұзындығы мен 5′-ұстағыш бөлігінің ықтимал қысқаруы зерттелді. crРНҚ-ның нысаналық аймағын 23-тен 15 нуклеотидке дейін қысқарту фермент белсенділігінің едәуір төмендеуіне әкеліп, қалдық белсенділік 3–8% деңгейінде сақталғаны анықталды. crРНҚ-ның оңтайлы нысаналық ұзындығы 23–24 нуклеотидті құрады. Сондай-ақ, 5′-ұстағыш бөлігі 15 нуклеотидтен қысқарғанда, әсіресе 13 нуклеотидтен төмен болғанда белсенділіктің күрт төмендегені байқалды.

4. Cas12a эндонуклеазаларының әртүрлі субстраттарға қатысты белсенділігі мен ерекшелігі зерттелді. Биохимиялық реакцияның температурасы, ұзақтығы, құрамдас бөліктердің концентрациясы және буферлік жүйе оңтайландырылды. Цис-белсенділік үшін crРНҚ мен Cas12a концентрациялары тиісінше 2 мкМ және 1 мкМ құрады. ДНҚ-ны тілу ферменттің белсенділігіне қолайлы жағдайда 5 минут ішінде басталды, бірақ сенімді және қайталанатын нәтижелер үшін инкубация 30 минут жүргізілді. Транс-белсенділік үшін 100 нМ crРНҚ, 100 нМ Cas12a және 1× NEBuffer 2.1 қолданылды. Флуоресценттік талдаулар MbCas12a/crРНҚ кешенін 25 °C температурада 15 минут инкубациялауды және кейін 37 °C температурада 30 минут транс-тілу реакциясын жүргізуді көздейді. Нәтижелер ультракүлгін жарық астындағы трансиллюминатор арқылы визуализацияланды.

5. MbCas12a және MeCas12a ферменттеріне гомологтық модельдеу жүргізіліп, каталитикалық маңызды аминқышқыл қалдықтары анықталды. Бұл қалдықтардың маңыздылығы сайтқа бағытталған мутагенез және ферменттік белсенділікті сынау арқылы расталды. RuvC1 (D874A/D864A), RuvC2 (E968A/E958A), RuvC3 (D1218A/D1208A) және NUC (R1181A/R1171A) аймақтарындағы мутациялар фермент белсенділігінің толық немесе жартылай жоғалуына әкелді. Белсенді және белсенді емес формалар арасындағы айырмашылықтар денситометриямен және статистикалық тәсілдермен расталды. D874A, E968A, D1218A (MbCas12a) және D864A, E958A, D1208A (MeCas12a) мутациялары ферменттің толық белсенділігін жойды. R1181A және R1171A мутациялары белсенділіктің ішінара төмендеуіне себеп болды. Нәтижелер RuvC домендері ДНҚ-ның екі тізбегін тілуге жауапты, ал Nuc домені бір тізбекті тіліп, ерекше функция атқаратынын көрсетті.

6. Петлелі изотермиялық амплификация (LAMP) және рекомбинозды полимеразалық амплификация (РПА) реакцияларының шарттары оңтайландырылды. РПА үшін температура

(37–39°C) мен уақыт (20–30 минут), сондай-ақ арнайы праймерлер таңдалды. LAMP үшін температура – 62°C, уақыт – 45 минут, және үш жұп арнайы праймерлер қолданылды.

7. CRISPR/Cas12a негізінде иммунохроматографиялық латеральды ағынды анализ жасалды, онда алтын нанобөлшектері және флуоресцеин мен биотинмен таңбаланған ssДНҚ зондтары қолданылды. Реакция 37°C температурада 30 минут жүргізіліп, нәтижелер тест-жолақ арқылы визуализацияланды. Бұл тәсіл мақсатты ДНҚ-ны жедел әрі тиімді анықтауға мүмкіндік береді.

8. *Escherichia coli* анықтауға арналған молекулалық-диагностикалық әдіс әзірленіп, CRISPR/MbCas12a технологиясы мен изотермиялық LAMP-амплификация үйлесімі негізінде жүзеге асырылды. Әдіс плазмидалық ДНҚ-ның 1 көшірмесін және геномдық ДНҚ-ның 10 көшірмесін реакцияда сенімді түрде анықтауға мүмкіндік берді. Арнайы crРНҚ және MbCas12a ферментінің коллатералды белсенділігі арқасында әдіс *E. coli*-ді сиыр маститінің басқа қоздырғыштарынан (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*) нақты ажыратуға мүмкіндік берді. Әдіс маститпен ауырған малдың сүт үлгілерінде сынақтан өткізілді және нақты клиникалық жағдайда қолдануға жарамдылығын көрсетті.

9. *Staphylococcus aureus* анықтауға арналған әдіс ұсынылды, ол рекомбиназалық полимеразалық амплификация (RPA) және CRISPR/MbCas12a жүйесін қамтиды. crРНҚ *nuc* геніне бағытталды. Бұл әдіс 10^2 көшірмеге дейінгі ДНҚ-ны анықтауға мүмкіндік берді және басқа патогендермен айқаспалы реакция байқалмады. Әдіс маститпен ауырған жануарлардан алынған 13 клиникалық изолятта сынақтан өткізілді, нәтижесінде тұрақты жұмыс, жоғары дәлдік және 60 минут ішінде жедел талдау жүргізу мүмкіндігі көрсетілді. Бұл оны ветеринарлық саладағы жылдам диагностика үшін қолайлы етеді.

10. *Alternaria spp.* анықтауға арналған әдіс CRISPR/MbCas12a және рекомбиназалық полимеразалық амплификация (RPA) көмегімен әзірленді. Әдіс бидай дәніндегі 100 көшірмеге дейінгі ДНҚ-ны анықтауға мүмкіндік берді. Түрлік ерекшелігіне жүргізілген сынақтар әдістің *Bipolaris sorokiniana*, *Nigrospora oryzae*, *Fusarium equiseti* және *Fusarium acuminatum* ДНҚ-сына жауап бермейтінін көрсетті. Зақымдалған фитоматериал үлгілерінде жүргізілген сынақтар бұл әдісті агробиотехнологияда және фитосанитарлық бақылауда қолдануға болатынын растады.

11. Жасалған молекулалық диагностикалық әдістердің сезімталдық деректеріне жүргізілген статистикалық талдау, сондай-ақ электрофореграммалар денситометриялық талдауы нәтижелерінің статистикалық өңдеуі Cas12a эндонуклеазасының белсенділігі сынақ жүргізу шарттарына сенімді түрде тәуелді екенін көрсетті. Бұл шарттарға бағыттаушы РНҚ құрылымы, каталитикалық домендердегі мутациялар және реакция компоненттерінің концентрациясы жатады. Маңызды айырмашылықтар бір факторлы дисперсиялық талдау (ANOVA, $p < 0,05$) және Крускалл–Уоллис бейпараметрлік критерийі арқылы анықталды.

12. CRISPR/Cas12a технологиясына негізделген патогендерді анықтауға арналған портативті CRISPR-Kaz құрылғысы әзірленді. Құрылғы инфрақұрылымы шектеулі жағдайларда, соның ішінде далалық зерттеулерде қолдануға арналған. Құрылғы 3D-принтерде басылған корпустан, стандартты пробиркаларға арналған ұяшықтардан, УФ жарықты біркелкі тарататын әйнек платформадан және кіріктірілген УФ көзі жүйесінен тұрады. Құрылғы ықшам, пайдалануға ыңғайлы және патогендерді жылдам визуализациялауға мүмкіндік береді.

Негізгі ғылыми жұмыстар жоспарымен байланысы.

Диссертациялық жұмыс «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС-нің молекулалық биотехнология зертханасында келесі гранттық жобалар аясында орындалды: AP09259771 «Диагностикада қолдануға арналған жаңа бағдарламаланатын РНҚ-бағытталған CRISPR/Cas эндонуклеазаларын сипаттау», BR10764944 «Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігін бақылау мен мониторинг жүргізудің аналитикалық әдістерін әзірлеу», AP19579275 «CRISPR/Cas12a әдісі негізінде ауылшаруашылық дақылдарының қоздырғыштарының заманауи молекулалық диагностикасын жасау».

Ғылыми-зерттеу жұмысының апробациясы.

Ғылыми-зерттеу жұмысының нәтижелері биология және биотехнология факультетінің ғылыми-техникалық кеңесінде, әл-Фараби атындағы ҚазҰУ-дың генетика және молекулалық биология кафедрасының отырыстарында, сондай-ақ «Ұлттық биотехнология орталығы» ЖШС молекулалық биотехнология зертханасының ғылыми семинарларында ұсынылды. Диссертациялық жұмыстың нәтижелері келесі ғылыми жобалар бойынша ғылыми-зерттеу жұмыстарының есептеріне енгізілді: AP09259771 «Диагностикада қолдануға арналған жаңа бағдарламаланатын РНҚ-бағытталған CRISPR/Cas эндонуклеазаларын сипаттау», BR10764944 «Тамақ өнімдерінің қауіпсіздігін бақылау мен мониторинг жүргізудің аналитикалық әдістерін әзірлеу», AP19579275 «CRISPR/Cas12a әдісі негізінде ауылшаруашылық дақылдарының қоздырғыштарының заманауи молекулалық диагностикасын жасау».

Публикациялар. Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері 7 баспа жұмысында ұсынылды, соның ішінде Web of Science немесе Scopus деректер базасына кіретін нөлдік емес импакт-факторы бар журналдарда 3 мақала, ҚР БҒМ ККСОН ұсынған республикалық ғылыми басылымдарда 3 мақала, 1 патент алынды. 1 нормативтік-техникалық құжаттама (НТҚ) рәсімделді.

Докторанттың жеке үлесі. Докторанттың жеке үлесі барлық эксперименттерді жоспарлау және өткізу, деректерді талдау, ғылыми мақалалар жазу, зерттеу нәтижелерін өңдеуді қамтиды.

Диссертацияның көлемі және құрылымы. Диссертация кіріспеден, әдебиетке шолудан, әдістер сипаттамасынан, зерттеу нәтижелері мен оларды талқылаудан, қорытындыдан, әдебиет тізімінен және қосымшалардан тұрады. Диссертация 163 бетте баяндалған және 16 кесте, 88 сурет, 162 дереккөз, 9 қосымшаны қамтиды.