

## CRISPR-CAS9 TIZIMI YORDAMIDA GENLARNI TAHRIRLASH VA HOSILNI YAXSHILASH

**Xayitbayev Azamat Madaminovich**

Namangan davlat universiteti magistranti

E-mail: [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

**Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich**

O‘zR FA Genomika va bioinformatika markazi

***Annotatsiya:** Genomni tahrirlash texnologiyalaridagi yutuqlar funksional genomika va hosilni yaxshilash sohalarida inqilob qildi. CRISPR/Cas9 (klasterli muntazam intervalgacha qisqa palindromik takrorlash) -Cas9 genetik muhandislik uchun ko‘p maqsadli texnologiya bo‘lib, u hidoyatRNK (gRNK) ning ma‘lum bir ketma-ketlik va Cas9 endonukleaza faolligiga to‘ldirilishiga asoslanadi. Bu qishloq xo‘jaligining tadqiqot sohasini kengaytirdi, zararli xususiyatlarni yo‘q qilish yoki muhim belgilarni qo‘shish bilan yangi o‘simlik navlarini yaratish uchun yangi imkoniyatlar yaratdi. Ushbu RNK tomonidan boshqariladigan genomni tahrirlash texnologiyasi o‘simlik biologiyasining alohida sohalarida innovatsion yangilik bo‘lib chiqdi. CRISPR texnologiyasi doimiy ravishda rivojlanib bormoqda, jumladan nokautlar yaratish kabi turli genetik manipulyatsiyalar uchun variantlar; aniq o‘zgartirishlar kiritish, multipleks genom muhandisligi va maqsadli genlarni faollashtirish va repressiya qilish. Ko‘rib chiqish CRISPR merosi davomidagi taraqqiyotni ta’kidlaydi. Biz CRISPR/Cas9 vositalarining ko‘p funksiyalari, imkoniyatlari va maxsus ilovalari bilan tez evolyutsiyasini o‘rganib chiqdik. Turli xil ishlar orasida o‘simliklarning oziqlanishini yaxshilash, o‘simliklarning kasalliklarga chidamliligini oshirish va qurg‘oqchilikka chidamli o‘simliklarni etishtirish ko‘rib chiqiladi. Sharh shuningdek, Cas9-gRNK komplekslarini o‘simlik hujayralariga etkazib berishning an’anaviy usullari haqida ba’zi ma’lumotlarni o‘z ichiga oladi va plazmidga asoslangan CRISPR tizimida mavjud bo‘lgan turli cheklovlarga yechim sifatida paydo bo‘lgan CRISPR ribonukleoproteinlarining (RNPs) paydo bo‘lishini o‘z ichiga oladi. Biz CRISPR/Cas9 vositalarining ko‘p funksiyalari, imkoniyatlari va maxsus ilovalari bilan tez evolyutsiyasini o‘rganib chiqdik. Turli xil ishlar orasida o‘simliklarning oziqlanishini yaxshilash, o‘simliklarning kasalliklarga chidamliligini oshirish va qurg‘oqchilikka chidamli o‘simliklarni etishtirish ko‘rib chiqiladi. Sharh shuningdek, Cas9-gRNK komplekslarini o‘simlik hujayralariga etkazib berishning an’anaviy usullari haqida ba’zi ma’lumotlarni o‘z ichiga oladi va plazmidga*

asoslangan CRISPR tizimida mavjud bo'lgan turli cheklovlariga yechim sifatida paydo bo'lgan CRISPR ribonukleoproteinlarining (RNPs) paydo bo'lishini o'z ichiga oladi. Biz CRISPR/Cas9 vositalarining ko'p funksiyalari, imkoniyatlari va maxsus ilovalari bilan tez evolyutsiyasini o'rganib chiqdik. Turli xil ishlar orasida o'simliklarning oziqlanishini yaxshilash, o'simliklarning kasalliklarga chidamliligini oshirish va qurg'oqchilikka chidamli o'simliklarni etishtirish ko'rib chiqiladi. Sharh shuningdek, Cas9-gRNK komplekslarini o'simlik hujayralariga etkazib berishning an'anaviy usullari haqida ba'zi ma'lumotlarni o'z ichiga oladi va plazmidga asoslangan CRISPR tizimida mavjud bo'lgan turli cheklovlariga yechim sifatida paydo bo'lgan CRISPR ribonukleoproteinlarining (RNPs) paydo bo'lishini o'z ichiga oladi.

**Kalit so'zlar:** CRISPR/Cas tizimi, genomni tahrirlash, ovqatlanishni yaxshilash, kasalliklarga chidamlilik, metabolik muhandislik, gen ekspressiyasini tartibga solish, CRISPR ribonukleoproteinlari.

## GENE EDITING AND CROP IMPROVEMENT USING CRISPR-CAS9 SYSTEM

**Khaitbayev Azamat Madaminovich**

Namangan State University master's

E-mail: [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

**Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich**

Center of genomics and bioinformatics academy of sciences the republic of  
Uzbekistan

### ABSTRACT

*Advancements in Genome editing technologies have revolutionized the fields of functional genomics and crop improvement. CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat)-Cas9 is a multipurpose technology for genetic engineering that relies on the complementarity of the guideRNA (gRNA) to a specific sequence and the Cas9 endonuclease activity. It has broadened the agricultural research area, bringing in new opportunities to develop novel plant varieties with deletion of detrimental traits or addition of significant characters. This RNA guided genome editing technology is turning out to be a groundbreaking innovation in distinct branches of plant biology. CRISPR technology is constantly advancing including options for various genetic manipulations like generating knockouts; making precise modifications, multiplex genome engineering, and activation and repression of target*

*genes. The review highlights the progression throughout the CRISPR legacy. We have studied the rapid evolution of CRISPR/Cas9 tools with myriad functionalities, capabilities, and specialized applications. Among varied diligences, plant nutritional improvement, enhancement of plant disease resistance and production of drought tolerant plants are reviewed. The review also includes some information on traditional delivery methods of Cas9-gRNA complexes into plant cells and incorporates the advent of CRISPR ribonucleoproteins (RNPs) that came up as a solution to various limitations that prevailed with plasmid-based CRISPR system.*

**Keywords:** *CRISPR/Cas system, genome editing, nutrition improvement, disease resistance, metabolic engineering, gene expression regulation, CRISPR ribonucleoproteins.*

## РЕДАКТИРОВАНИЕ ГЕНОВ И УЛУЧШЕНИЕ УРОЖАЯ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СИСТЕМЫ CRISPR-CAS9

**Хайтбаев Азамат Мадаминович**

Наманганский государственный университет

E-mail: [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

**Аюбов Мирзакамол Собитжонович**

Ан РУз Центр геномики и биоинформатики

**Аннотация:** *Достижения в области технологий редактирования генома произвели революцию в области функциональной геномики и улучшения сельскохозяйственных культур. CRISPR/Cas9 (короткие палиндромные повторы с регулярными интервалами)-Cas9 представляет собой многоцелевую технологию генной инженерии, основанную на комплементарности направляющей РНК (gРНК) определенной последовательности и эндонуклеазной активности Cas9. Это расширило область сельскохозяйственных исследований, предоставив новые возможности для создания новых сортов растений с удалением вредных признаков или добавлением важных признаков. Эта технология редактирования генома под управлением РНК оказывается революционной инновацией в различных областях биологии растений. Технология CRISPR постоянно совершенствуется, включая возможности для различных генетических манипуляций, таких как создание нокаутов; внесение точных модификаций, мультиплексная инженерия генома, а также активация и репрессия генов-мишеней. В обзоре освещается развитие*

*наследия CRISPR. Мы изучили быстрое развитие инструментов CRISPR/Cas9 с множеством функций, возможностей и специализированных приложений. Среди различных усердий рассматриваются улучшение питания растений, повышение устойчивости растений к болезням и получение засухоустойчивых растений. Обзор также включает некоторую информацию о традиционных методах доставки комплексов Cas9-gRNA в растительные клетки и включает появление рибонуклеопротеинов (RNP) CRISPR, которые появились как решение различных ограничений, преобладавших в системе CRISPR на основе плазмид. Мы изучили быстрое развитие инструментов CRISPR/Cas9 с множеством функций, возможностей и специализированных приложений. Среди различных усердий рассматриваются улучшение питания растений, повышение устойчивости растений к болезням и получение засухоустойчивых растений. Обзор также включает некоторую информацию о традиционных методах доставки комплексов Cas9-gRNA в растительные клетки и включает появление рибонуклеопротеинов (RNP) CRISPR, которые появились как решение различных ограничений, преобладавших в системе CRISPR на основе плазмид. Мы изучили быстрое развитие инструментов CRISPR/Cas9 с множеством функций, возможностей и специализированных приложений. Среди различных усердий рассматриваются улучшение питания растений, повышение устойчивости растений к болезням и получение засухоустойчивых растений. Обзор также включает некоторую информацию о традиционных методах доставки комплексов Cas9-gRNA в растительные клетки и включает появление рибонуклеопротеинов (RNP) CRISPR, которые появились как решение различных ограничений, преобладавших в системе CRISPR на основе плазмид.*

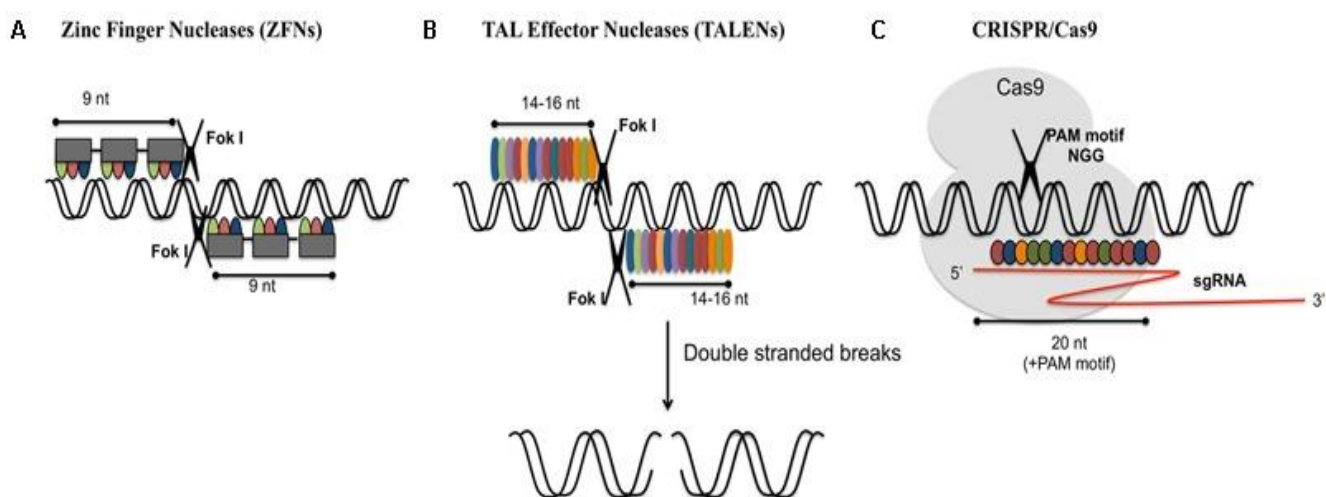
**Ключевые слова:** *система CRISPR/Cas, редактирование генома, улучшение питания, устойчивость к болезням, метаболическая инженерия, регуляция экспрессии генов, рибонуклеопротеиды CRISPR.*

## KIRISH

Genetik xilma-xillik o‘simliklardagi xususiyatlarni yaxshilashning asosiy manbai hisoblanadi. Genofondda o‘zgarishlarni yaratish o‘simlikning yangi navlarini yaratish uchun eng muhim talabdir. Istalgan o‘zgarishlarga erishilgandan so‘ng, transgenlarni yaxshilangan navdan kesib tashlash mumkin. Hosilni yaxshilash ko‘p yillar davomida an‘anaviy o‘simliklarni ko‘paytirish usullari yoki turli xil fizik, kimyoviy (masalan, gamma-nurlanish, etil metansulfonat) va biologik usullar (masalan, T-DNK, transpozon kiritish) orqali amalga oshirildi, bu esa nuqta mutatsiyalariga, o‘chirishga, qayta tartibga solishga va genlarning dublikatsiyasi. Saytga xos nukleazalarning (SSN)

paydo bo'lishi tasodifiy mutagenezga nisbatan saytga yo'naltirilgan mutagenezning muhimligini ta'kidladi <sup>[1]</sup>. Tasodifiy mutagenezning o'ziga xos kamchiliklari ham bor. U bir nechta istalmagan o'zgartirishlar va mutatsiyalarni keltirib chiqaradi, ularni tekshirish qimmat va juda murakkab. Genni tahrirlash DNK ketma-ketligini o'chirish, kiritish yoki almashtirish uchun ishlab chiqilgan SSN'lardan foydalanadi. Ishlab chiqilgan endonukleazlar/mega-nukleazalar, sink barmoq nukleazalari (ZFN), transkripsiya faollashtiruvchisiga o'xshash effektor nukleazalar (TALENs) va muntazam ravishda klasterlangan II tipdagi qisqa palindromik takrorlash (CRISPR) / CRISPR bilan bog'liq protein 9 (Cas9) ning rivojlanishi yo'l ochdi. hosilni yaxshilash uchun yagona nukleotid eksizyon mexanizmi uchun <sup>[2]</sup>

(1- rasm ). Ushbu genomni tahrirlash texnologiyalari maqsadli joylashuvning o'ziga xosligini oshirish uchun dasturlashtiriladigan nukleazlardan foydalanadi.



1-rasm

Turli xil genamlarni tahrirlash vositalari. (A) Sink-barmoq nukleazalari (ZFN) dimer vazifasini bajaradi. Har bir monomer DNK bog'lovchi domen va nukleaza domenidan iborat. Har bir DNK bog'lovchi domeni 9-18 nukleotidni taniydigan 3-6 ta sink barmoq takrorlash majmuasidan iborat. Nukleaza domeni II turdagi cheklovchi endonukleaza Fok1dan iborat. (B) Transkripsiya faollashtiruvchisiga o'xshash nukleazalar (TALENlar): bular ZFNlarga o'xshash dimerik fermentlardir. Har bir bo'linma DNKni bog'lash domenidan (har bir nukleotidga xos bo'lgan yuqori darajada saqlangan 33-34 aminokislotalar ketma-ketligi) va Fok1 nukleaza domenidan iborat. (C)CRISPR/Cas9: Cas9 endonukleazasi maqsadli o'ziga xos bo'linish uchun sgRNK (yagona qo'llanma RNK: crRNA va tracrRNA) tomonidan boshqariladi. 20 nukleotidni aniqlash joyi protospacer qo'shni motif (PAM) ning yuqori oqimida mavjud.

## ADABIYOTLAR TAHLILI VA METODOLOGIYA

Genomni tahrirlash ma'lum bir genomni aniq va bashorat qilinadigan tarzda o'zgartiradi. Maqsadli o'zgarishlarni taklif qiluvchi nukleazlar yordamida turli xil hujayralar va organizmlarda o'zgarishi mumkin bo'lgan genlarning navlari bo'lishi mumkin. ZFNs 1990-yillarda ishlab chiqilgan va Sangamo BioSciences kompaniyasiga tegishli bo'lgan eng qadimgi genlarni tahrirlash texnologiyalaridan biridir. ZFNlar oldindan o'ylangan cheklash fermentlari bo'lib, ular ketma-ket o'ziga xos DNKni bog'laydigan sink barmoq naqshlari va FokI endonukleazasining o'ziga xos bo'lmagan parchalanish sohasiga ega. 4-6 bog'lovchi modullar majmuasi bitta sink barmoq birligini hosil qilish uchun birlashadi. Har bir modul kodonni taniydi <sup>[3]</sup> Bir juft ZFN birgalikda 18-24 bp noyob DNK ketma-ketligini aniqlaydi va ikki zanjirli uzilishlar (DSB) FokI dimer tomonidan amalga oshiriladi. FokI nukleazalari tabiiy ravishda paydo bo'lgan IIS tipidagi cheklash fermentlari bo'lib, ular qo'sh spiralli DNKda bir zanjirli uzilishlarni keltirib chiqaradi. Demak, FokI dimer vazifasini bajaradi, har bir katalitik monomer (nikkaza) o'simtalar bilan staggered DSB yaratish uchun bitta DNK zanjirini parchalaydi <sup>[3]</sup>. ZFNlar tamaki, makkajo'xori, soya va boshqalarni o'z ichiga olgan turli o'simliklarning genomini o'zgartirishda muvaffaqiyatli <sup>[4]</sup>. U maqsadli fermentlarning ko'p vaqt talab qiladigan va qimmat qurilishi, past o'ziga xoslik va yuqori maqsadli mutatsiyalar kabi ba'zi kamchiliklar tufayli qaytarib olindi, natijada yangi texnologiyaga yo'l ochildi. TALENlar ZFN o'rnini bosuvchi bo'lib chiqdi va ma'lum DNK ketma-ketliklarini kesish uchun manipulyatsiya qilinishi mumkin bo'lgan cheklovchi fermentlar sifatida aniqlandi. An'anaga ko'ra, TALENlar tabiiy ravishda yuzaga kelgan va manipulyatsiya qilingan TALE takroriy massivlarining karboksilik-terminal uchi bilan FokI domeniga qo'shilgan transkripsiya faollashtiruvchisiga o'xshash effektor (TALE) ketma-ketliklarining uzun segmentlari sifatida ko'rib chiqildi (Christian va boshq., 2010). TALENlar o'ziga xos bo'lmagan FokI yadroviy domeni bilan birlashtirilgan sozlanishi mumkin bo'lgan DNK-bog'lovchi domenni o'z ichiga oladi (Christian va boshq., 2010). ZFN bilan solishtirganda TALENlar maqsadli joyning individual nukleotidlari takrorlanishi va TAL effektor oqsillarining aminokislotalar ketma-ketligining o'zaro ta'sirini o'z ichiga oladi. Ular saytga xos DNK parchalanishiga ishonitirish uchun FokI nukleaza domenini qo'llash orqali haddan tashqari o'zgarishlar yaratishi mumkin. Turli organizmlarda yuqori samaradorlikka ega bo'lgan homolog bo'lmagan mutatsiyalarni yaratish uchun keng qo'llanilgan <sup>[5]</sup>

CRISPR texnologiyasining paydo bo'lishi ZFN va TALENlarni o'rnini bosdi va 2011 yilda "yil usullari" dan 2015 yilda "yil yutug'i" gacha bo'lgan yangi yondashuv sifatida keng tarqalgan bo'lib ularning genomlarini tahrirlashda qo'llaniladi. Ushbu prokaryotik tizim eukaryotik xost hujayralarida genomni tahrirlash uchun darhol qabul

qilinadi <sup>[6]</sup> CRISPR gen nokautining RNKga nisbatan qo‘shimcha afzalligiga ega, bu genlarni nokaut qilishning mashhur usuli hisoblanadi. CRISPR RNAi texnologiyasidan foydalangan holda aniqroq aniqlik va soddalik bilan maqsad qilib bo‘lmaydigan endogen genlarga qaratilgan. RNK genining regulyatsiyasi endogen mikroRNKlar (miRNKlar) tomonidan boshqariladi. Ushbu miRNKlarning ekzogen miRNKlardan har qanday siljishi gipomorfik mutatsiyalarga va maqsaddan tashqari fenotiplarga olib kelishi mumkin. CRISPR/Cas9 ~100 nukleotid (nt) yo‘naltiruvchi RNK (gRNK) ketma-ketligi yordamida o‘ziga xos genomik lokuslarni nishonga oladi. sgRNA maqsadli DNKdagi protospacer qo‘shni motifga (PAM) gRNK 5'-uchida 17-20 nt orqali Watson va Crick bazasi juftligi orqali bog‘lanadi va Cas9 ni o‘ziga xos bo‘linish uchun boshqaradi <sup>[7]</sup>. Cas9 maqsadli DNKga DSBlarni kiritish orqali DNKni tiklash mexanizmini rag‘batlantiradi. Ta‘mirlash mexanizmi genomik o‘zgarishlar, gen nokautlari va genlarni kiritish uchun xatoga moyil bo‘lgan homolog bo‘lmagan uchlarni birlashtirish (NHEJ) yoki homolog rekombinatsiyani (HR) o‘z ichiga oladi. NHEJ hozirgacha somatik o‘simlik hujayralarida eng keng tarqalgan DSB ta‘mirlash mexanizmi <sup>[8]</sup>. Kodlash hududida NHEJ tomonidan tasodifiy kiritish yoki o‘chirish kadrlar siljishi mutatsiyalariga olib keladi va shu sababli gen nokautlarini keltirib chiqaradi. CRISPR texnologiyasi funksiyani yo‘qotish, funktsiyani oshirish va gen ekspressiyasini tahlil qilish uchun potentsialga ega. CRISPR o‘simlik biologiyasida ko‘p qirrali ilovalarga ega va yuqori sifatli qishloq xo‘jaligida barqaror mahsulotlarni ishlab chiqarish uchun osongina qo‘llaniladi. CRISPR/Cas9 orqali o‘zgartirish jarayonida bo‘lgan ko‘plab o‘simliklar mavjud. CRISPR bo‘yicha tahrirlangan pomidorlar zamonaviy tijorat navlariga nisbatan ta‘mi, shakar miqdori va xushbo‘yligi yaxshilanishi kutiladi; makkajo‘xori qurg‘oqchilikka chidamli bo‘lib, har gekardan yuqori hosil olinadi; bug‘doy chang chiriyotgan kasalligiga qarshi tahrirlanadi va qo‘ziqorinlar melanin tarkibini kamaytirishga qaratilgan.

### **CRISPR/Cas9 tizimi**

Bugungi dunyoda CRISPRning genomni tahrirlash vositasi sifatida rivojlanishi 1980-yillarning oxirida <sup>[9]</sup> va 2005 yildan beri o‘n yillik keng ko‘lamli eksperimentlardan kelib chiqqan holda kuzatilishi mumkin. CRISPR/Cas9 mikrobia adaptiv immun tizimi va uning hozirgi kungacha rivojlanishi butun dunyo bo‘ylab ko‘plab tadqiqotchilarning ishining natijasidir. Bir qator keng qamrovli sharhlar <sup>[10]</sup> CRISPR/Cas texnologiyasining har bir jihati haqida batafsil ma‘lumot beradi. CRISPR/Cas tizimining bakteriyalar va arxeyadagi rolini dekodlash ushbu tizimning genomni tahrirlash vositasi sifatida kuchini aniqladi. Bioinformatika vositalarini o‘z ichiga olgan bir qator eksperimentlar turli xil CRISPR/Cas komponentlarini va ularning bakterial hujayralarga moslashuvchan immunitetni ta‘minlash funksiyasini

ochib berdi. CRISPR lokusu CRISPR bilan bogʻlangan (Cas) genlari klasterlaridan va barcha immunologik xotiralar oʻyilgan CRISPR massivlaridan iborat <sup>[11]</sup>. CRISPR massivi 25-40 bp oʻzgaruvchan ketma-ketliklar (boʻshliqlar) bilan intervalgacha boʻlgan 21-40 bp takroriy ketma-ketliklarga (toʻgʻridan-toʻgʻri takrorlash) ega boʻlgan genomik lokusdir <sup>[12]</sup>. 2005 yilda uchta mustaqil tadqiqot guruhi <sup>[13]</sup> fag infeksiyasiga qarshi immunitetni taʼminlaydigan xorijiy DNKning oʻtmishdagi bosqinlari izlari sifatida ajratuvchi elementlarning rolini taxmin qildi. Shuningdek, ular ajratgichlar endi PAM deb nomlanuvchi umumiy yakuniy ketma-ketlikka ega ekanligini taʼkidladilar. Barrangou va boshqalar. (2007) eksperimental ravishda CRISPR massivlarining Cas genlari bilan bogʻliq holda bakteriofaglariga qarshilik koʻrsatishda ishtirok etishini koʻrsatdi. Har bir infeksiyada yangi fag DNKsi yaqinlashib kelayotgan infeksiyaga qarshi kurashish uchun CRISPR massiviga qoʻshiladi. Brouns va boshqalarning tadqiqotlari. (2008) Cas oqsillarini maqsadli DNKga yoʻnaltiruvchi kichik RNK larga (crRNK) fag spacer ketma-ketliklarining transkripsiyasini oching. RNK vositachiligida DNKni nishonga olishga asoslangan interferentsiya mexanizmi va Cas9 ning DSBlarni aniq pozitsiyada kiritishda roli, PAM dan yuqorida joylashgan uchta nukleotid ham koʻrsatildi <sup>[14]</sup>. Keyinchalik trans-aktivlashtiruvchi CRISPR RNK (tracrRNA) crRNK bilan dupleks hosil qiladi va Cas9 ni oʻz maqsadiga yoʻnaltiradi <sup>[15]</sup> Yagona, sintetik hidoyat RNK hosil qilish uchun crRNK va tracrRNKning birlashishi tizimni yanada soddalashtirdi <sup>[16]</sup> Nihoyat, Cong va boshqalar. (2013) Cas9 ning minimal mutagen faolligi bilan homologik yoʻnaltirilgan taʼmirlashni osonlashtirish qobiliyatini xabar qildi.

**CRISPR-Cpf1 (sinf II, *Prevotella* va *Francisella* dan V toifa CRISPR)** crRNKni qayta ishlash, maqsadli saytni aniqlash va DNKni ajratish uchun yagona Cpf1 oqsilidan foydalanadigan ilgʻor vositadir. Cpf1 funktsional ravishda Cas9 oqsiliga saqlanadi, lekin koʻp jihatdan sezilarli darajada farq qiladi. Farqlar quyidagicha: bu prekursor crRNKni qayta ishlovchi ribonukleaza; u timinga boy (masalan, 5'-TTTN-3') PAM saytlarini taniydi <sup>[16]</sup>. PAM ketma-ketligi protospacer ketma-ketligining yuqori qismida joylashgan va Cas9 ni maqsadli joyga yoʻnaltirish uchun tracrRNK talab qilinmaydi. Cpf1 ning eng muhim xususiyati - bu Cas9 tomonidan ishlab chiqarilgan toʻmtoq uchlarigacha boʻlgan kontraktda 4 bp oʻsish hosil boʻlishi <sup>[17]</sup>. Ushbu yopishqoq uchlar genomga ketma-ketlikni toʻldirish tufayli yanada samarali genomik qoʻshimchalarni taʼminlaydi. Cpf1 oilasidagi bir qancha oqsillar orasida *Lachnospiraceae* ND 2006 bakteriyasidan LbCpf1 *Acidaminococcus* sp.dan AsCpf1. BV3L6 boshqa ortologlar bilan solishtirganda inson hujayralarida samaraliroq harakat qiladi <sup>[18]</sup> 2-toifa VI-toifa C2c2 effektor oqsili bilan tavsiflanadi. C2c2 ikkita nukleotid bogʻlovchi (HEPN) saqlanib qolgan domenni oʻz ichiga oladi, ular har qanday maʼlum DNK nukleozasiga homologiyaga ega emas



[19] HEPN domenlari RNaza sifatida ishlaydi, shuning uchun u qo'shimcha protospacerlarni olib yuruvchi ssRNKni parchalash uchun ishlab chiqilishi mumkin bo'lgan yagona crRNK tomonidan boshqariladigan yangi RNK nishonlash vositasi sifatida tasvirlangan. Shunday qilib, C2c2 DNKni nishonga olmaydi [20]. C2c2 biokimyoviy jihatdan ssRNAGA xos endoribonukleazlar sifatida tavsiflangan HEPN domenlariga ega bo'lgan III-A va III-B tipidagi tizimlarga o'xshaydi, ammo bu ikki tur o'rtasida sezilarli farq bor. IIIA tipidagi Cas10- Csm va III B tipidagi Csx kamroq maqsadli o'ziga xoslikka ega va faol saytlarni hosil qilish uchun dimerizatsiyaga to'g'ri keladi. C2c2, aksincha, ikkita HEPN domenini o'z ichiga oladi va monomerik endoribonukleaza vazifasini bajaradi [21]. C2c2, dC2c2 ning dCas9 analoglari to'rtta bashorat qilingan HEPN domenining istalganini alanin bilan almashtirish orqali ishlab chiqarilishi mumkin. C2c2 tizimining mexanizmini va u bakteriyalarni himoya qila oladigan patogenlar sinfini aniqlash uchun qo'shimcha tekshiruv talab etiladi. *Hozirgi vaqtda VI turdagi tizim Carnobacterium gallinarum, Leptotrichia buccalis, L. shahii, L. wadei, Listeria newyorkensis, L. seeligeri, L. weihenstephanensis, Paludibacter propionicigenes va Rhodobacter capsulatus (Choi va Lepto)* da uchraydi .

### **CRISPR/Cas9 mexanizmi**

CRISPR/Cas9 tizimining adaptiv immuniteti uch bosqichdan iborat: moslashish, ifodalash va aralashuv . Moslashuv kichik bo'laklarga bo'lingan va CRISPR lokusiga kiritilgan virus yoki plazmidlardan olingan DNKni o'z ichiga oladi. CRISPR lokuslari transkripsiya qilinadi va kichik RNK (crRNA) hosil qilish uchun qayta ishlanadi, bu esa effektor endonukleazlarni virusli materialni asosiy komplementarlik bilan nishonga olish uchun boshqaradi [22]. II turdagi CRISPR/Cas tizimidagi DNK aralashuvi bitta Cas9 oqsilini talab qiladi . Cas9 bir nechta domenlarga ega bo'lgan ulkan oqsildir (amino terminalda RuvC domeni va o'rtada joylashgan HNH nukleaza domeni) va ikkita kichik RNK, ya'ni crRNA va tracrRNA. Cas9 moslashishga yordam beradi, crRNA ga oldindan ishlov berishda ishtirok etadi va tracrRNA va ikki zanjirli RNKga xos RNase III tomonidan boshqariladigan maqsadli DSBlarni joriy qiladi. II turdagi CRISPR bilan solishtirganda, III turdagi CRISPRning o'ziga xos xususiyatlari DNK va RNKning parchalanishi va uning Cas10 parchalanish oqsili bilan bog'lanishidir. Bo'linish transkripsiyaga bog'liq bo'lgan DNK ketma-ketligi modifikatsiyasi bo'lib, unda transkripsiyaviy faol promouter ham mavjud. Cas10 tizimi bakteriyalarga maxsus sharoitlarda begona DNKga qarshilik turini ta'minlaydigan virusli ajratuvchi elementlarni olish imkonini beradi. Chetel virusli DNKga bu qarshilik mezbon hujayra uchun zararli bo'lgan litik yo'lining faollashishini oldini oladi. Ushbu ketma-ketliklar hujayraning jismoniy xususiyatlarini ham o'zgartirishi mumkin, bu esa mezbon hujayra uchun omon qolish ustunligini ta'minlaydi.

## NATIJALAR

Makkajo‘xori [2], bug‘doy [3] va jo‘xori [5] bo‘yicha olib borilgan tadqiqotlar genlarni tahrirlashda CRISPR dan foydalanish uchun ajoyib asos bo‘ldi. Ushbu tadqiqotlar mutatsiyalar samaradorligi, ajralishning o‘ziga xosligi, katta xromosoma deletsiyalari va lokus tuzilishining rezolyutsiyasi kabi parametrlar bo‘yicha birinchi keng qamrovli ma‘lumotlarni taqdim etdi. Shuningdek, bir nechta promoterlar nazorati ostida gRNKlarning ifodasini ko‘rsatdi. Fauzer va boshqalar. (2014) *Arabidopsis thaliana* ustida olib borilgan tadqiqotlarida CRISPR/Cas asosidagi nukleazlar va nikkazalardan foydalanishni ta‘kidledi. Nukleazlar NHEJ vositachiligidagi mutageniz uchun samarali vositadir va ikkita nikkazaning birgalikdagi ta‘siri tandemli tartibga solingan to‘g‘ridan-to‘g‘ri takrorlashlar o‘rtasidagi rekombinatsiyani kuchaytirishi mumkin, teskari takrorlanishlar bilan boshqariladigan gen konvertatsiyasi va HR (Fauzer va boshq., 2014) bilan bog‘liq mexanizmlarni tartibga solishi mumkin. Yagona kimerik gRNK individual crRNA va tracrRNA komponentlariga qaraganda samaraliroq ekanligi aniqlandi (Miao va boshq., 2013; Zhou va boshq., 2014). Qizig‘i shundaki, to‘rtta mustaqil guruh (Shan va boshq., 2013; Brooks va boshq., 2014; Zhang va boshq., 2014; Zhou va boshqalar, 2014.) guruch va pomidorning T1 avlodida bialel yoki homozigot mutatsiyalar kiritilganligini ko‘rsatdi, bu tizimning yuqori samaradorligini ko‘rsatadi. Genetik o‘zgarishlar keyingi avlodlarda qo‘shimcha o‘zgarishlarsiz an’anaviy tarzda ajratiladi (Zhou va boshq., 2014).

## MUHOKAMA

CRISPR/Cas9 tizimi genlarni nishonga olishning samaradorligi va o‘ziga xosligi uchun doimiy ravishda takomillashtirilmoqda. Eukaryotik genomni o‘zgartirish uchun CRISPR/Cas9 tizimini qayta ishlatish zarurati oqsilning bir yoki ikkala uchida yadroviy lokalizatsiya signallarini qo‘shishni talab qildi. Ortogonal CRISPR/Cas9 tizimlarining joriy etilishi ushbu texnologiya manifoldining qo‘llanilishini kengaytirdi. Ushbu ortologlarga *Streptococcus thermophilus* (St), *Neisseria meningitidis* (Nm), *Campylobacter jejuni* (Cj) va *Staphylococcus aureus* (Sa) dan RNK tomonidan boshqariladigan endonukleazlar kiradi. Har bir ortogonal Cas9 tizimi o‘ziga xos xususiyatlarga ega, shu jumladan maqsadni aniqlash uchun Cas9 oqsillari, PAM saytlari va gRNK skafoldlaridagi o‘zgarishlar NmCas9 orqali insonning pluripotent ildiz hujayralarida endogen genlarni samarali yo‘naltirishni ko‘rsatdi. Ular SpCas9 va StCas9 ning 20 nt dan ortiq protospacer talablarini DNKni nishonga olish uchun 24-nukleotid (nt) protospacerdan foydalanadigan NmCas9 ni ishlab chiqishda kashshoflardir. Kengaytirilgan PAM ketma-ketligi (5'-NNNNGATT-3') NGG ketma-ketligiga nisbatan o‘ziga xoslikni yanada oshirishi mumkin.

## XULOSALAR

O'tgan to'rt yillikda olib borilgan tadqiqotlar genomni tahrirlash vositalarini maqsadli gen modifikatsiyalaridan tortib, virusga qarshilik ko'rsatishda asosiy o'yinchi bo'lgan eIF4E qarshilik allellarini loyihalashgacha (Bastet va boshq., 2017) ortda qoldirdi. o'simliklarda abiotik va biotik stressga chidamlilik kabi bir nechta atributlarni yaratish uchun genlarni o'zgartirish, ya'ni. qurg'oqchilikka chidamlilik, virus va kasalliklarga chidamlilik, yaxshilangan ozuqaviy, yuqori hosildorlik va o'simliklarning saqlash muddatini uzaytirish. CRISPR-Cas9 texnologiyasi kuchli va samarali oqibatlariga olib keladigan ko'p qirrali genom tahririning kelajagiga guvohlik beradi. CRISPR-Cas9 texnologiyasi yordamida o'simliklar, shu jumladan ekinlar genlarini tahrirlash qobiliyati tubdan o'zgartirildi. O'simliklar rivojlanishining asosiy biologiyasini o'rganish va stressga javob berish elita va yuqori ekinlarni loyihalashda yordam beradi. CRISPR-Cas9 yovvoyi turlardan faqat qiziqish genini olib, dizaynerlik o'simliklarini yaratishda juda istiqbolli kelajakka ega va gen aniq bir joyda to'g'ridan-to'g'ri interpolyatsiya qilinadi, bu esa o'z navbatida o'simlik seleksionerlari uchun dizaynerlik o'simliklarini yaratish uchun ko'plab yo'llarni ochadi. O'simliklarni barcha mumkin bo'lgan og'ir qiyinchiliklarga bardosh beradigan tarzda loyihalash uchun turli xil yondashuvlar mavjud. Yangi paydo bo'lgan CRISPR/Cas9 RNP tizimi Cas9 tarjimasini uchun maqsadli hujayra potentsialini va uning gRNK bilan ishonchli uchrashuvini o'tkazish zaruratidan qochdi.

## Adabiyotlar

1. Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Konermann S., Joung J., Slaymaker I. M., Cox D. B., et al. (2016). C2c2 is a single-component programmable RNA-guided RNA-targeting CRISPR effector. *Science* 353 557–566. 10.1126/science.aaf5573
2. Agrotis A., Ketteler R. (2015). A new age in functional genomics using CRISPR/Cas9 in arrayed library screening. *Front. Genet.* 6:300. 10.3389/fgene.2015.00300
3. Ahloowalia B. S., Maluszynski M. (2001). Induced mutations- A new paradigm in plant breeding. *Euphytica* 118 167–173. 10.1023/A:1004162323428
4. Ainley W. M., Sastry-Dent L., Welter M. E., Murray M. G., Zeitler B., Amora R., et al. (2013). Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnol. J.* 11 1126–1134. 10.1111/pbi.12107
5. Alagoz Y., Gurkok T., Zhang B., Unver T. (2016). Manipulating the biosynthesis of bioactive compound alkaloids for next-generation metabolic

- engineering in opium poppy using CRISPR-Cas 9 genome editing technology. *Sci. Rep.* 6 309–310. 10.1038/srep30910
6. Ali Z., Abulfaraj A., Idris A., Ali S., Tashkandi M., Mahfouz M. M. (2015). CRISPR/Cas9-mediated viral interference in plants. *Genome Biol.* 16 238–249. 10.1186/s13059-015-0799-6
  7. Amitai G., Sorek R. (2016). CRISPR-Cas adaptation: insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* 14 67–76. 10.1038/nrmicro.2015.14
  8. Andersson M., Turesson H., Nicolia A., Fält A. S., Samuelsson M., Hof-vander P. (2016). Efficient targeted multiallelic mutagenesis in tetraploid potato (*Solanum tuberosum*) by transient CRISPR- Cas9 expression in protoplasts. *Plant Cell Rep.* 36 117–128. 10.1007/s00299-016-2062-3
  9. Baltes N. J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P. A., Voytas D. F. (2014). DNA replicons for plant genome engineering. *Plant Cell* 26 151–163. 10.1105/tpc.113.119792
  10. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., et al. (2007). CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315 1709–1712. 10.1126/science.1138140
  11. Bastet A., Robaglia C., Gallois J. C. (2017). eIF4E Resistance: Natural Variation Should Guide Gene Editing. *Trends Plant Sci.* 17 S1360–S1385. 10.1016/j.tplants.2017.01.008
  12. Bikard D., Jiang W., Samai P., Hochschild A., Zhang F., Marraffini L. A. (2013). Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR–Cas system. *Nucleic Acids Res.* 41 7429–7437. 10.1093/nar/gkt520
  13. Bikard D., Marraffini L. A. (2013). Control of gene expression by CRISPR-Cas systems. *F1000Prime Rep.* 5:47. 10.12703/P5-47
  14. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., et al. (2009). Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* 326 1509–1512. 10.1126/science.1178811
  15. Boettiger A. N., Bintu B., Moffitt J. R., Wang S., Beliveau B. J., Fudenberg G., et al. (2016). Super-resolution imaging reveals distinct chromatin folding for different epigenetic states. *Nature* 529 418–422. 10.1038/nature16496
  16. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S. D. (2005). Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extra-chromosomal origin. *Microbiology* 151 2551–2561. 10.1099/mic.0.28048-0
  17. Bortesi L., Fischer R. (2015). The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnol. Adv.* 33 41–52. 10.1016/j.biotechadv.2014.12.006

18. Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z. B., Van Eck J. (2014). Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant Physiol.* 166 1292–1297. 10.1104/pp.114.247577
19. Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J., Snijders A. P., et al. (2008). Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321 960–964. 10.1126/science.1159689
20. Cermak T., Baltes N. J., Cegan R., Zhang Y., Voytas D. F. (2015). High frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol.* 16 232–246. 10.1186/s13059-015-0796-9
21. Chandrasekaran J., Brumin M., Wolf D., Leibman D., Klap C., Pearlsman M., et al. (2016). Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17 1140–1153. 10.1111/mpp.12375
22. Char S. N., Neelakandan A. K., Nahampun H., Frame B., Main M., Spalding M. H., et al. (2016). An *Agrobacterium*-delivered CRISPR/Cas9 system for high-frequency targeted mutagenesis in maize. *Plant Biotechnol. J.* 15 257–268. 10.1111/pbi.12611