

## O‘SIMLIKKA XOS CRISPR VEKTORLARI VA ULARNING TEXNIK AFZALLIKLARI

<sup>1</sup> Xayitbayev Azamat Madaminovich,

<sup>2</sup> Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich,

<sup>1,2</sup> Xasanova Dilfuza Yuldashaliyevna

1. Namangan Davlat Universiteti magistranti

1.2 Namangan Davlat Universiteti stajyor o‘qituvchisi

2. O‘zR FA Genomika va bioinformatika markazi PhD

1.Gmail: [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

*Annotatsiya:* CRISPR/Cas vositachiligida genomni tahrirlash o‘simlik genomini manipulyatsiya qilishning inqilobiy yondashuvidir. Biroq, ushbu texnologiyaning muvaffaqiyati aniq vektor va boshqa komponentlarni tanlashga bog‘liq. O‘simlikka xos CRISPR/Cas vektori odatda Cas dan iboratgen, maqsadga xos gRNK, yetakchi ketma-ketligi, tanlangan marker geni, aniq promouterlar va boshqa qismlar. Bir joyda CRISPR vektorlari haqida to‘liq ma‘lumot yo‘qligi sababli har bir tadqiqot uchun o‘ziga xos vektorni tanlash har doim qiyin bo‘lgan. Bu erda biz vektor tanlashda va kerakli o‘simlik genomini samarali tahrirlashda juda foydali bo‘lgan turli xil muhim elementlarning har bir texnik jihatlarini muhokama qildik.

*Kalit so‘zlar:* CRISPR/Cas9, Csy4-gRNA, asosiy tahrirlash, multiplekslash, endonukleazalar.

## СБОРНИК ВЕКТОРОВ CRISPR ДЛЯ КОНКРЕТНЫХ РАСТЕНИЙ И ИХ ТЕХНИЧЕСКИХ ПРЕИМУЩЕСТВ

<sup>1</sup> Хайтбаев Азамат Мадаминович,

<sup>2</sup> Аюбов Мирзакамол Собитжонович,

<sup>1,2</sup> Хасанова Дилфуза Юлдашалиевна

1. Наманганский государственный университет магистрант

1.2. Наманганский государственный университет стажерный-учитель

2. Ан РУз Центр геномики и биоинформатики PhD

1.Gmail: [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

*Аннотация:* CRISPR/Cas-опосредованное редактирование генома — это революционный подход к манипулированию геномом растений. Однако успех этой технологии сильно зависит от выбора конкретного вектора и других компонентов. Вектор CRISPR/Cas, специфичный для растений, обычно

*состоит из Casген, целевая gPHK, лидерная последовательность, селективируемый маркерный ген, точные промоторы и другие аксессуары. Всегда было сложно выбрать конкретный вектор для каждого исследования из-за отсутствия исчерпывающей информации о векторах CRISPR в одном месте. Здесь мы обсудили все технические аспекты различных важных элементов, которые будут очень полезны при выборе вектора и эффективном редактировании желаемого генома растения.*

**Ключевые слова:** CRISPR/Cas9, Csy4-gPHK, прайм-редактирование, мультиплексирование, эндонуклеазы.

## COMPENDIUM OF PLANT-SPECIFIC CRISPR VECTORS AND THEIR TECHNICAL ADVANTAGES

<sup>1</sup> **Khaitbayev Azamat Madaminovich,**

<sup>2</sup> **Ayubov Mirzakamol Sobitjonovich,**

<sup>1,2</sup> **Xasanova Dilfuza Yuldashaliyevna**

1. Namangan State University master's

1.2 Namangan State University teacher

2. Center of genomics and bioinformatics academy of sciences the republic of Uzbekistan PhD

**1.Gmail:** [azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com](mailto:azamathayitboyevmadaminovich@gmail.com)

**Annotation:** CRISPR/Cas mediated genome editing is a revolutionary approach for manipulating the plant genome. However, the success of this technology is highly dependent on selection of a specific vector and the other components. A plant-specific CRISPR/Cas vector usually consists of a Cas gene, target-specific gRNA, leader sequence, selectable marker gene, precise promoters, and other accessories. It has always been challenging to select the specific vector for each study due to a lack of comprehensive information on CRISPR vectors in one place. Herein, we have discussed every technical aspect of various important elements that will be highly useful in vector selection and efficient editing of the desired plant genome. Various factors such as the promoter regulating the expression of Cas and gRNA, gRNA size, Cas variants, multicistronic gRNA, and vector backbone, etc. influence transformation and editing frequency.

**Keywords:** CRISPR/Cas9, Csy4-gRNA, prime editing, multiplexing, endonucleases.

## KIRISH

Klasterlangan muntazam intervalgacha qisqa palindromik takrorlar (CRISPR) va u bilan bog'liq Cas oqsili (CRISPR/Cas) o'simliklar genom muhandisligi sohasida inqilob qildi. Sink-barmoq nukleazalari (ZFNs) va transkripsiya faollashtiruvchisiga

o'xshash effektor nukleazalar (TALENs) kabi boshqa yondashuvlarga nisbatan nisbatan aniq, loyihalash oson, arzon [1.2]. Turli xil PAM o'ziga xosligi bilan Cas9, Cas12a (Cpf1), Cas12b, Cas12e (CasX) va Cas12j (Cas $\phi$ ) kabi turli xil Cas oqsillarini identifikatsiya qilish o'simlik genomini o'zgartirish uchun xos bo'lgan ko'plab tahrirlovchi vektorlarni ishlab chiqishga olib keldi [3.4]. Ushbu vositalar turli xil o'simlik turlarida moslashuvchan tarzda istalgan genni, genni tuzatishni, saytga xos transgenni kiritish va hokazolarni nokaut qilish uchun tez-tez qo'llanilgan [5.6.7].

### ADABIYOTLAR TAHLILI

CRISPR-Cas vositachiligida genom muhandisligi muhim komponentlar sifatida endonukleaza (Cas9, Cas12a yoki Cas12b, Cas12j) va RNK (gRNK) ni talab qiladi. gRNK birinchi navbatda maqsadli joyni taniydi, so'ngra endonukleaza tomonidan ikki zanjirli DNKning parchalanishi kuzatiladi. Ikki zanjirli uzilish (DSB) keyinchalik gomologik bo'lmagan uchi birlashma (NHEJ) yoki gomologik yo'naltirilgan ta'mirlash (HDR) orqali tuzatiladi [8.9]. HDR DNK shablonidan foydalanadi va DSB ni xatosiz tuzatadi. Maqsadning o'ziga xosligi gRNKning birinchi 20 nukleotidiga (nt) bog'liq bo'lib, u genom ichidagi qo'shimcha maqsadli ketma-ketlikni (protospacer) taniydigan spacer sifatida ham tanilgan. 20 ta asosiy juftlik (bp) o'ziga xos va noyob maqsadli ketma-ketlikni tanlash samarali va aniq tahrirlash uchun juda muhimdir. Bundan tashqari, maqsadni tanlashda protospacer-qo'shni motif (PAM) mavjudligi muhim ahamiyatga ega [10.11]. Cas9, Cas12a va Cas12b uchun PAM ketma-ketligi mos ravishda 5'NGG3', TTTV va ATTN (N har qanday nukleotid bo'lishi mumkin va V A, C yoki G). Cas9 - bu RNK tomonidan boshqariladigan monomerik DNK endonukleaza bo'lib, u ba'zi bakterial genomlarda topilgan II turdagi CRISPR tizimining muhim tarkibiy qismidir. U genomning maqsadli ketma-ketligida DSB hosil qiladi, bu mutatsiyaga olib kelishi mumkin. DSB odatda o'simlik hujayralarining o'ziga xos ta'mirlash mexanizmi bilan ta'mirlanadi, ba'zida nukleotidlarni o'chirish yoki qo'shish orqali ramka o'zgarishi mutatsiyalarini kiritadi [12]. Cas9 oqsili globulyar tanib olish (REC) va kichik yadro (NUC) lobiga ega. REC lobi ko'prik spirali, REC1 va REC2 domenlaridan iborat bo'lsa, NUC lobi RuvC, HNH va PAM bilan o'zaro ta'sir qiluvchi domenlarni o'z ichiga oladi [13.14]. RuvC nukleaza domeni maqsadli ipni ajratadi, qo'shimcha ip esa HNH nukleazasi tomonidan parchalanadi, bu esa DSB ga olib keladi [8.14]. *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus thermophilus* va *Treponema denticola* dan ajratilgan Cas9 genining o'lchami 3,25 dan 4,6 kilobaza juftlari (kb) gacha o'zgarib turadi va turli PAM ketma-ketliklarini taniydi [15].

## TADQIQOT METODOLOGIYASI.

### Cas/sgRNA Ribonukleinkislotadan foydalanish usuli

Cas9, Cas12a, Cas12b va Cas12j yordamida o'simliklarda vektorsiz genomni tahrirlash ikkita usul bilan amalga oshirilishi mumkin. Birinchi usulda gRNK va Cas endonukleaza in vitroda transkripsiyalanadi. Keyin ular oltin yoki kumush zarralari kabi tashuvchi bilan qoplangan va o'simlik hujayralariga etkazib beriladi. In vitro transkripsiyasi uchun gRNK va Cas endonukleaz T7 promouteri tomonidan tartibga solinadi va keyin kalluslarga bombardimon qilish uchun qo'llaniladi. Ikkinchi usulda gRNK transkriptlari va tozalangan rekombinant Cas oqsili PEG yoki bombardimon orqali o'simlik hujayralariga yetkaziladi. Vektorsiz genomni tahrirlash *Arabidopsis*, tamaki, salat, guruch, uzum va olmada muvaffaqiyatli sinovdan o'tkazildi [28.30]. Makkajo'xori tarkibida bu komplekslar embrionlarga bombardimon qilindi va transgensiz mutantlar topildi [9]. Cas/sgRNK ribonukleoprotein komplekslarining asosiy afzalligi shundaki, ular vektorni talab qilmaydi va shuning uchun transgen kiritilmaydi. Ushbu komplekslar to'g'ridan-to'g'ri PEG, nanopartikullar yoki bombardimon usullaridan foydalangan holda o'simliklarning regenerativ to'qimalariga yuborilishi mumkin.

## TAHLILLAR VA NATIJALAR.

### CRISPR ning eng samarili usullaridan foydalanish

CRISPR aralashuvi (CRISPRi) vektorlari maqsadli genning transkripsiyasiga xalaqit berish uchun ishlatiladi. CRISPRi-da gRNK va katalitik faol bo'lmagan Cas yoki o'lik Cas (dCas) kompleksi maqsadli genning transkripsiya boshlang'ich joyini (TSS) bog'laydi va sun'iy transkripsiya bostiruvchi vazifasini bajaradi. Birinchi avlod CRISPRi tizimi transkripsiyaning o'rtacha darajada bostirishni ko'rsatdi. Holbuki, dCas9 transkripsiyaviy repressor bilan birlashtirilgan ikkinchi avlodda yaxshiroq transkripsiyaning bostirishni ko'rsatdi. O'simlik hujayralariga etkazib berilgandan so'ng, gRNK dCas9 repressorini maqsadli joyga bog'laydi, bu oxir-oqibat gen ekspressiyasini buzadi. CRISPRi vektorlariga misollar pYPQ153, pHSN6I01 va pdCas9 (GB1079), o'simliklarda ishlatilishi mumkin [7]. Ushbu vektorlar uchun potentsial maqsad promouter hududlari, tartibga soluvchi hududlar va kodlanmagan hududlar bo'lishi mumkin.

### CRISPRa vektorlari

CRISPR vositachiligidagi transkripsiya faollashuvi (CRISPRa) gRNK va effektor birlashtirilgan dCas9 kompleksi maqsadli genning promotor mintaqasiga bog'langan mexanizm bo'lib, bu transkripsiyaning kuchayishiga olib keladi. Dastlab, CRISPRa-da eng ko'p ishlatiladigan effektor molekullari VP64, p65 va p300 kabi transaktivatorlar edi. VP16 - herpes simplex virusining taniqli transkripsiya faollashtiruvchisi, VP64 esa VP16 tetrameridir. p65 NF-kappa B omilining faollashuv

domeniga ega bo'lgan boshqa transaktivatoridir. Ikkinchi avlod CRISPRa tizimi transaktivatorlar bilan birlashtirilgan MCP, PCP va Com kabi aptamerga xos oqsillarni o'z ichiga oladi. Ikkinchi avlod CRISPRa tizimi kuchliroq va birinchi avlodga nisbatan yuqori transkripsiya faolligini ko'rsatdi.

### XULOSALAR.

O'simliklarning genetik va metabolik muhandisligi sohasidagi so'nggi yutuqlar foydalanuvchilarga qulay genom muhandislik vositalarini talab qiladi. CRISPR/Cas endonukleaz vositachiligidagi genom muhandisligi o'simliklarda yakuniy molekulyar vositaga aylandi. Ushbu CRISPR vositalarining ko'pchiligi turli xil o'simlik turlarida ularning ozuqaviy va dorivor qiymatini yaxshilash uchun qabul qilinmoqda. CRISPR/Cas9 yordamida genomni tahrirlash muvaffaqiyati etkazib berish usuli va vektor tanlashga juda bog'liq. Cas9 va gRNKni ifodalash uchun promotor tanlash, gRNK hajmi, Cas9 variantlari, polikistronik *tRNK-gRNK*, polikistronik *Csy4-gRNK* kabi omillar, va vektor magistral va boshqalar maqsadli genomni tahrirlash tajribalarini loyihalash uchun asosiy komponentlardir. Bundan tashqari, polikistronik-tRNA/Csy4-gRNA dan foydalanish tahrirlash chastotalarini oshirdi. Cas endonukleazidagi turli xil modifikatsiyalar va ko'plab Cas variantlarining mavjudligi kengroq yordamchi dastur uchun turli xil CRISPR vektorlarini loyihalash imkonini berdi. OMEGA deb nomlanuvchi transpozon-kodlangan RNK tomonidan boshqariladigan nukleazalar yaqin kelajakda yangi vositalarni ishlab chiqish uchun kuchli potentsial nomzod bo'lishi mumkin. Yangi kashf etilgan Cas  $\phi$  va CasMINI kabi o'lchamlari kichikroq bo'lgan Cas endonukleazlari genetik muhandislik uchun foydaliroq bo'ladi. Tahrirlash, nicking, bazani tahrirlash, maqsadli genlarni kiritish, transkripsiyaning faollashtirish/bostirish, multiplekslash, asosiy tahrirlash va genlarni belgilash kabi CRISPR-dan turli xil foydalanish o'simlikshunoslar uchun turli xil yangi yo'llarni ochadi, bu esa pirovardida o'simliklarni oziqlantirish uchun dizaynerlik ekinlarini ishlab chiqishda yordam beradi. dunyo aholisining ko'payishi.

### FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR

1. Beumer K.J., Trautman J.K., Christian M., Dahlem T.J., Lake C.M., Hawley R.S., Grunwald D.J., Voytas D., Carroll D. Comparing Zinc Finger Nucleases and Transcription Activator-Like Effector Nucleases for Gene Targeting in *Drosophila*. *G3 Genes Genomes Genet.* 2013;3:1717–1725. doi: 10.1534/g3.113.007260.
2. Razzaq A., Saleem F., Kanwal M., Mustafa G., Yousaf S., Arshad H.M.I., Hameed M.K., Khan M.S., KhanJoyia F.A. Mod-ern trends in plant genome editing: An

- inclusive review of the CRISPR/Cas9 Toolbox. *Int. J. Mol. Sci.* 2019;20:4045. doi: 10.3390/ijms20164045.
3. Liu J.-J., Orlova N., Oakes B.L., Ma E., Spinner H.B., Baney K.L.M., Chuck J., Tan D., Knott G.J., Harrington L.B., et al. CasX enzymes comprise a distinct family of RNA-guided genome editors. *Nature*. 2019;566:218–223. doi: 10.1038/s41586-019-0908-x.
4. Pausch P., Al-Shayeb B., Bisom-Rapp E., Tsuchida C.A., Li Z., Cress B.F., Knott G.J., Jacobsen S.E., Banfield J.F., Doudna J.A. CRISPR-Cas $\Phi$  from huge phages is a hypercompact genome editor. *Science*. 2020;369:333–337. doi: 10.1126/science.abb1400.
5. Upadhyay S.K., Kumar J., Alok A., Tuli R. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat. *G3 Genes Genomes Genet.* 2013;3:2233–2238. doi: 10.1534/g3.113.008847.
6. Kaur N., Alok A., Shivani, Kumar P., Kaur N., Awasthi P., Chaturvedi S., Pandey P., Pandey A., Pandey A.K., et al. CRISPR/Cas9 directed editing of lycopene epsilon-cyclase modulates metabolic flux for  $\beta$ -carotene biosynthesis in banana fruit. *Metab. Eng.* 2020;59:76–86. doi: 10.1016/j.ymben.2020.01.008.
7. Alok A., Kumar J., Jogam P., Sandhya D. *Recent Trends and Techniques in Plant Metabolic Engineering*. Springer; Singapore: 2018. CRISPR/Cas9-mediated gene editing tool and fathomless genetic and meta-bolic engineering applications in plants; pp. 167–179.
8. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J.A., Charpentier E. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 2012;337:816–821. doi: 10.1126/science.1225829.
9. Ran F.A., Hsu P., Lin C.-Y., Gootenberg J., Konermann S., Trevino A.E., Scott D.A., Inoue A., Matoba S., Zhang Y., et al. Double Nicking by RNA-Guided CRISPR Cas9 for Enhanced Genome Editing Specificity. *Cell*. 2013;154:1380–1389. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021.
10. Mali P., Aach J., Stranges P., Esvelt K., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nat. Biotechnol.* 2013;31:833–838. doi: 10.1038/nbt.2675.
11. Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., et al. Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems. *Science*. 2013;339:819–823. doi: 10.1126/science.1231143.
12. Hsu P., A Scott D., Weinstein J., Ran F.A., Konermann S., Agarwala V., Li Y., Fine E., Wu X., Shalem O., et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nat. Biotechnol.* 2013;31:827–832. doi: 10.1038/nbt.2647

13. Nishimasu H., Ran F.A., Hsu P., Konermann S., Shehata S.I., Dohmae N., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal Structure of Cas9 in Complex with Guide RNA and Target DNA. *Cell*. 2014;156:935–949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
14. Nishimasu H., Cong L., Yan W.X., Ran F.A., Zetsche B., Li Y., Kurabayashi A., Ishitani R., Zhang F., Nureki O. Crystal Structure of Staphylococcus aureus Cas9. *Cell*. 2015;162:1113–1126. doi: 10.1016/j.cell.2015.08.007.
15. Esvelt K.M., Mali P., Braff J.L., Moosburner M., Yaung S., Church G.M. Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing. *Nat. Methods*. 2013;10:1116–1121. doi: 10.1038/nmeth.2681.
16. Fonfara I., Le Rhun A., Chylinski K., Makarova K.S., Lécrivain A.-L., Bzdrenga J., Koonin E.V., Charpentier E. Phylogeny of Cas9 determines functional exchangeability of dual-RNA and Cas9 among orthologous type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Res*. 2013;42:2577–2590. doi: 10.1093/nar/gkt1074.
17. Kim H.K., Lee S., Kim Y., Park J., Min S., Choi J.W., Huang T.P., Yoon S., Liu D.R., Kim H.H. High-throughput analysis of the activities of xCas9, SpCas9-NG and SpCas9 at matched and mismatched target sequences in human cells. *Nat. Biomed. Eng*. 2020;4:111–124. doi: 10.1038/s41551-019-0505-1.
18. Xu Z., Kuang Y., Ren B., Yan D., Yan F., Spetz C., Sun W., Wang G., Zhou X., Zhou H. SpRY greatly expands the genome editing scope in rice with highly flexible PAM recognition. *Genome Biol*. 2021;22:1–15. doi: 10.1186/s13059-020-02231-9.
19. Kleinstiver B., Prew M.S., Tsai S.Q., Topkar V.V., Nguyen N.T., Zheng Z., Gonzales A.P.W., Li Z., Peterson R.T., Yeh J.-R.J., et al. Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities. *Nature*. 2015;523:481–485. doi: 10.1038/nature14592.
20. Hu J.H., Miller S., Geurts M.H., Tang W., Chen L., Sun N., Zeina C.M., Gao X., Rees H.A., Lin Z., et al. Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA specificity. *Nature*. 2018;556:57–63. doi: 10.1038/nature26155.