

Kokkuvõte

CRISPR-dCas9 tehnoloogia võimaldab efektiivselt reguleerida geeni ekspressiooni ilma, et genoomi püsivalt modifitseeritakse. Molekulaarse neurobioloogia laboris on CRISPR vahendatud geeni ekspressiooni aktiveerimiseks kasutusel süsteem, kus otse dCas9 valgu külge on liidetud kahes korduses aktivaator VP64. Uudsed CRISPR aktivatsiooni meetodid, nagu SunTag ning Casilio, mis võimaldavad süsteemi kaasata rohkemates kordustes aktivaatoreid, omavad potentsiaali transkriptsiooni sihtmärkgeenilt veelgi efektiivsemalt võimendada. Sellest tulenevalt sai käesoleva töö eesmärgiks luua uus CRISPR-dCas9 süsteemil põhinev tööriist geeni ekspressiooni aktiveerimiseks. SunTag ja Casilio meetodite töötamise uurimiseks otsustati aktiveerida aju-päritolu neurotroofse faktori (BDNF) geeni transkriptsiooni. BDNF on selgroogsete närvisüsteemi arengus ning talitluses osalev neurotrofiin, vastutades näiteks neuronite diferentseerumise, neuriitide kasvu ja sünaptilise plastilisuse eest.

Käesoleva töö raames aktiveeriti SunTag ja Casilio süsteemide toimimise uurimiseks BDNF geeni promootor I-te, mida võrreldi VP64-dCas9-VP64 süsteemi poolse aktivatsiooniga. Esmalt testiti kummagi süsteemi variatsioone koos erinevate aktivaatoritega HEK293 rakkudes. SunTag ning Casilio meetodid aktiveerisid BDNF promootor I-te kordades efektiivsemalt, kui VP64-dCas9-VP64 süsteem. Uuritavates süsteemides kasutatavad efektorjärjestused kloonitati ümber lentiviirusvektoritesse, mida testiti samuti HEK293 rakkudes. Lentiviirusvektoreid kasutava SunTag meetodi poolne BDNF promootor I aktivatsioon langes, kuigi süsteemis kasutatava dCas9 valgu ekspressioon rakkudes tehti kindlaks *Western Blot* analüüsiga. Meetodite toimimise uurimiseks roti kortikaalsetes neuronites valmistati lentiviirused, mis kodeerivad SunTag ja Casilio süsteemis kasutatavaid efektorjärjestusi. Neuronites nähti, et nii SunTag kui ka Casilio süsteemid aktiveerivad BDNF promootor I-te, kuid võrreldes VP64-dCas9-VP64 süsteemiga jäi aktivatsioonitase madalamaks.

Käesoleva bakalaureusetöö tulemusena tehti kindlaks, et nii SunTag kui ka Casilio CRISPR-dCas9 meetodid suudavad HEK293 rakkudes BDNF geeni ekspressiooni efektiivselt aktiveerida. Nimetatud süsteemide potentsiaalset toimimist neuronites tasuks kindlasti edasi uurida, proovides selleks aktiveerida näiteks mõnda muud BDNF geeni promootorit, enhanserit või aktiveerida hoopis teist geeni. Uute ja võimsamate CRISPR aktivatsiooni meetodite leidmine võimaldaks hõlpsamini uurida geeniekspressiooni regulatsiooni häiretest tulenevaid haigusi, nende täpsemaid tagamaid ning aidata kaasa geeniteraapia arengule.