Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Biológia Doktori Iskola

CRISPR/Cas rendszerek és kis RNS-eik expressziójára alkalmazott promóterek vizsgálata

Doktori (Ph.D.) értekezés tézisei

Weinhardt Nóra

Témavezető: Welker Ervin PhD, DSc

Biokémiai Intézet
Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

Enzimológiai Intézet
Természettudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

2020
Szeged

Bevezetés

A *Streptococcus pyogenes* baktériumból származó Cas9 endonukleáz (SpCas9) a génmódosításra jelenleg legelterjedtebben alkalmazott CRISPR/Cas rendszer. A specificitást a guideRNS (gRNS) 5' végén elhelyezkedő 20 bázispáros szekvencia, a spacer biztosítja. A spacer segítségével kerül felismerésre a célszekvencia (target) komplementer DNS-RNS hibridizáció alapján. A nukleáz a DNS mindkét szálát hasítja. Ennek hatására DNS javítási útvonalak indulnak be, melyek a DNS specifikus módosítására használhatók fel. A 2 fő útvonal a homológ rekombinációs (HR) és a nem homológ végek összeillesztése (NHEJ) hibajavítási mechanizmusok. A célszekvencia felismeréséhez és hasításához szükség van egy néhány bázispáros szekvencia jelenlétére is a target mellett, ez a PAM szekvencia.
A mai molekuláris biológiai technikákkal már könnyedén változtatható a spacer szekvenciája, ennek köszönhető a rendszer robbanásszerű elterjedése. A Cas9 fehérje segítségével szinte bármilyen genomi szakasz szabadon módosítható, ezért jelentős biotechnológiai, orvosi és tudományos felhasználása van.
A Cas12a (másnéven Cpf1) nukleázokat néhány éve publikálták először, mint genomszerkesztésre alkalmas módszert. Amiatt nagyon érdekesek, mert más PAM szekvenciát ismernek fel, mint az SpCas9, így eltérő targetek hasítására képesek, ráadásul eltérő módon, mert az Cas9-el szemben a DNS két szálának hasításakor nem tompa, hanem ragadós végeket hoznak létre. Azt is megmutatták, hogy alacsonyabb off-target aktivitással bírnak, mint az SpCas9.
A CRISPR/Cas rendszereknek vannak limitációi. Az egyik ilyen az off-target hatás, azaz a célszekvenciákhoz hasonló, nem kívánt targetek hasítása. Ennek megoldására számos törekvés van, az egyik ezek közül a nukleáz mutációkkal történő módosítása specifikus helyeken. Napjainkig már több olyan SpCas9 variánst hoztak létre, amelyek megnövekedett specificitással bírnak.

A gRNS-ek előállítására két elterjedt, az RNS szintetizáltatásnál költséghatékonyabb módszer van a gyakorlatban. Az egyik a T7 promóter segítségével történő *in vitro* RNS transzkripció, a másik a különböző organizmusokban más-más, kis RNS expresszióra alkalmas promóterek használata. Számos kutatás szerint a Cas nukleázok működését befolyásolja a gRNS-ek mennyisége és hossza, ezért rendkívül fontos, hogy pontos ismereteink legyenek az alkalmazott promóterekről.
Több tanulmány szerint a promótertől downstream elhelyezkedő nukleotidok befolyásolhatják az RNS expressziót és a transzkripció iniciáció pozícióját is. Bár néhány általunk vizsgált promóter esetében a promótert követő első bázis szerepét már vizsgálták szisztematikusan, de a további nukleotidok szerepét még nem. Ezen vizsgálatok alapján a humán 7sk és U6 promóterek egyaránt alkalmazhatók a +1-es pozícióban A-val és G-vel és a várt hosszúságú RNS-eket kapták róluk.

A T7 promóterről ismert, hogy a promótertől downstream elhelyezkedő első bázis befolyásolja a transzkripció iniciációjának pozícióját, és az eddigi eredmények szerint legalább egy G-t kell használni a megfelelő expresszióhoz. Az azonban az irodalom szerint nem konzisztens, hogy a T7 promóterhez egy, kettő vagy 3 darab guanint szükséges alkalmazni.
Az U6T7 hibrid promótert az U6 promóter módosításával hozták létre, úgy, hogy a promóter végét a T7 promóterre cserélték le. A hibrid promótert bemutató cikk szerint a +1-ben legalább egy G-vel ajánlatos használni.
A bakteriális J23119 promóterekkel kapcsolatban tudomásunk szerint eddig nem került publikálásra a +1-es pozícióval kapcsolatos eredmény.
Habár az U6 és 7sk promóterekről megmutatták, hogy a +1-es pozícióban A-val is hatékony expresszióra képesek, a gyakorlatban azonban az SpCas9 gRNS-ekhez általában olyan targeteket választanak, amelyekben a spacer 5' első bázisának megfelelő bázis G, amely a targetek számát szűkíti. Megoldásképp különböző gRNS módosításokat alkalmaznak, amelyek viszont befolyásolhatják a nukleázok aktivitását.
Ezek a +1-es pozícióra irányuló vizsgálatok általában nem a jelenleg a kis RNS-ek hosszáról és mennyiségéről legpontosabb képet adó újgenerációs szekvenálással (NGS) történtek, hanem egyéb kevésbé pontos módszerekkel, illetve az eddig napvilágot látott NGS-el kapott eredményekhez nagyon kis minta számot alkalmaztak.

Célkitűzések

1. A Cas12a nukleázokkal kapcsolatban arra kerestük a választ, hogy képesek-e hatékony HR javítás indukálására N2a sejtekben az As-és LbCas12a nukleázok, és mennyire hatékonyak a leggyakrabban alkalmazott Cas9 nukleázokhoz képest. (Az As- és LbCas12a nukleázokat az *Acidaminococcus* sp. BV3L6 illetve a *Lachnospiraceae* ND2006 baktériumokból azonosították.)

2. A megnövelt specificitású eSpCas9 és SpCas9HF1 variánsokkal kapcsolatban azt kívántuk megtudni, hogy aktivitásukat hogyan befolyásolják a különböző gRNS módosítások, amelyeket akkor alkalmaznak, ha a targetben a gRNS első átíródó bázisának megfelelő bázis nem guanin.

3. A humán U6 és 7sk, a fág T7, a hibrid U6T7 és a bakteriális J23119 promóterek sokkal átfogóbb vizsgálatát szándékoztuk elvégezni az eddigiekhez képest, nagy readszámú mélyszekvenálással. Azt kívántuk megtudni, hogy hogyan befolyásolja a promótertől downstream elhelyezkedő 4 pozíció a transzkripció iniciációjának pozícióját és az RNS expressziót.

Módszerek

A Cas12a nukleázok vizsgálatához és a Cas9 nukleázokkal való összehasonlításukhoz különböző targetekkel komplementer kis RNS-eket és a nukleázokat expresszáló plazmidokat hoztunk létre. Ezeket kotranszfektáltuk N2a (egér neuroblasztóma) sejtekbe. A nukleázok aktivitását GFxFP, valamint genomi HR tesztekkel vizsgáltuk és a fluoreszcens jelet áramlási citometriával mértük.

GFxFP esszé

Az esszé során a nukleázok target szekvenciáját két ismétlődő, de önmagában ép GFP-t nem expresszáló GFP szekvencia közé integráljuk. A nukleáz hasításakor létrehozott kettős szálú DNS-törés hatására ép GFP keletkezik. Ennek az esszének az az előnye, hogy a hasítás hatékonyságát nem befolyásolják olyan tényezők, mint a genomi környezet, a target szekvencia epigenetikus állapota, vagy a target relatív távolsága a homológ karoktól.

Genomi HR teszt

A genomi HR javítás indukálásához egy, a célszekvenciára homológ karokat tartalmazó GFP szekvenciát kódoló donor plazmidot alkalmaztunk, melyet a PRNP gén promótere mögé integráltunk a nukleázok hasítása által kiváltott HR javítással, majd a GFP jelet citometriásan mértük.

N2a.EGFP hasítási teszt

A megnövelt specificitású nukleázok aktivitásának vizsgálatához módosított gRNS-eket és a nukleázokat kódoló plazmidokat hoztunk létre, majd ezeket N2a.EGFP sejtekbe kotranszfektáltuk. Az N2a.EGFP sejtek a genomba integrált EGFP-t tartalmaznak, amit a nukleázokkal céloztunk és a nukleázok aktivitásának teszteléséhez a fluoreszcens jel csökkenését mértük áramlási citometria segítségével.

Plazmid könyvtárak létrehozása

A promóterek vizsgálatához először a megfelelő promótereket tartalmazó plazmidokat hoztunk létre, amelyek a plazmid könyvtárak vektoraiként szolgáltak. Majd promóterenként 3-féle plazmid könyvtárat alkottunk meg, amely 3 különböző spacer szekvenciával egy-egy SpCas9 módosított gRNS-t kódolt. A promótereket downstream követő első 4 bázis randomizált volt.
A gRNS szekvenciája egy bárkódot is tartalmazott, amely alapján azonosítani lehetett, hogy melyik templátról melyik RNS keletkezett, valamint biztosította a vizsgált 4 bázisos szekvenciákhoz tartozó szekvenciák sokféleségét, amelynek segítségével az olyan RNS mennyiségre ható külső tényezők hatása csökken, mint pl. az RNS-ek szekvencia-specifikus degradációja. Az átfedő DNS szakaszok által Gibson klónozó technikával illesztettük össze a könyvtárak fragmenseit.

cDNS könyvtárak létrehozása

A plazmid könyvtárakat az emlős sejtes promóterek esetében HEK-293 sejtekbe transzfektáltuk. A T7 promóteres könyvtárakról a promótert és a gRNS-t tartalmazó expressziós kazettát PCR-el amplifikáltuk, majd ezt templátként használva *in vitro* T7 kittel állítottuk elő az RNS-eket. A bakteriális plazmid könyvtárakat tartalmazó sejteket LB médiumban rázatva inkubáltuk egy éjszakán át. Ezt követte az RNS-ek izolálása, majd a reverz transzkripció egy gRNS-re specifikus primerrel.

NGS

A cDNS-ek 3’ végére adaptereket ligáltunk T4 DNS ligáz segítségével, amelyhez egy egyedi, gRNS-ek szekvenálására alkalmas módszert állítottunk be. Az adapter egy részben duplaszálú DNS molekula. Az adapter mindkét vége és az adapterrel komplementer oligó 3’ vége foszforiláltak. A 3’ végek foszforilálásával elkerülhető a ligálási melléktermékek kialakulása, mert gátolja a ligázt. A komplementer oligó 3’ végén 4 randomizált bázis segíti elő a szintén randomizált bázisokat tartalmazó cDNS könyvtárakkal való ligálást.
A cDNS könyvtárakat a plazmid könyvtárakkal együtt PCR-es amplifikációt követően mélyszekvenáltuk, majd az eredményeket bioinformatikai módszerek segítségével értékeltük ki.

Eredmények és megvitatásuk

Összehasonlítottuk az As-, és LbCas12a nukleázok hatékonyságát az Sp- és 3 másik, gyakran alkalmazott Cas9 nukleáz aktivitásával. A nukleázok hasítási aktivitásának vizsgálatához a GFxFP nevű esszét optimalizáltuk egy korábban publikált esszéből, ahol a nukleáz hasítása nélkül is kaptunk háttér fluoreszcens GFP jelet. A riporter esszét sikeresen módosítottuk úgy, hogy ez a hasítás nélküli GFP háttér csökkent. Az esszé használatával a különböző PAM szekvenciákból adódó eltérő genomi pozíciók okozta aktivitásbeli különbségeket kívántuk kizárni. Eredményeink alapján bár az SpCas9 hatékonyabbnak bizonyult: nagyobb arányban váltott ki HR javítást a sejtekben, mint a Cas12a-k, de a többi Cas9-el viszont hasonló mértékben, illetve egyes targeteken jobban teljesítettek a Cas12a nukleázok. Nemcsak riporter esszével, de genomi célpontokon is teszteltük a Cas12a nukleázok alkalmasságát genomszerkesztésre. Eredményeink szerint alkalmasak HR javítás indukálására genomi targeteket célozva is. A Cas12a nukleázokkal kapcsolatos vizsgálataink során nem a Zetsche és mtsai. által használt emlős sejtekben, hanem más emlős sejteken (N2a) mutattuk be, hogy a Cas12a nukleázok alkalmasak genomszerkesztésre, ráadásul míg ők csak az NHEJ javítási útvonal segítségével tesztelték le aktivitásukat, mi HR javítást indukáltunk a genomban, valamint a GFxFP plazmidot célozva. Eredményeink alapján a Cas12a nukleázok hasznos alternatívát nyújthatnak a genomszerkesztő eszközök palettáján, ami egybecseng azzal, hogy az elmúlt években számos csoport szintén megmutatta alkalmasságukat a génszerkesztésre többféle organizmusban is.

A megnövelt specificitású eSpCas9 és SpCas9HF1 variánsokkal kapcsolatban azt kívántuk megtudni, hogy aktivitásukat hogyan befolyásolják a különböző gRNS módosítások, amelyeket akkor alkalmaznak, ha a targetben a gRNS első átíródó bázisának megfelelő bázis nem guanin. Ezek közül a módosítások közül a gRNS 5' végén elhelyezkedő első nukleotid G-re cserélését, vagy a spacer változatlanul hagyását, továbbá a gRNS-ek 5' végének rövidítését teszteltük le. Hatásukat egy EGFP-t tartalmazó egér neuroblasztóma sejtvonalban, az EGFP hasítás hatékonyságával teszteltük. Eredményeink alapján, míg a vad típusú SpCas9 aktivitását csak kis mértékben befolyásolják ezek a módosítások, addig a nagy specificitású Cas9 variánsok aktivitását különböző mértékben, de jobban rontják. Így eredményeink alapján e nukleáz variánsokat ilyen módosításokkal nem lehet rutinszerűen alkalmazni. Ennek feloldására többféle megoldás is lehetséges, az egyik a nukleáz variánsok olyan további mutációkkal történő módosítása, amely által jobban tolerálják a gRNS módosításait. A megnövelt specificitású nukleázok targeteinek körét bővítendő felmerül az igény a kis RNS expresszióra alkalmas promóterek mélyrehatóbb vizsgálatára. Ennek segítségével lehetne olyan egyéb szekvenciákat találni, amelyekkel gRNS módosítások nélkül is használhatóak lennének ezek a nukleázok.

A disszertációmban bemutatott munka nagyobbik részében arra kerestünk választ, hogy a gRNS-ekhez gyakran alkalmazott promótereknél a promótertől downstream elhelyezkedő bázisok milyen módon befolyásolják az RNS expressziót és a kezdő szekvenciákat. Kísérleteinkben a kiválasztott promóterek sokkal átfogóbb vizsgálatát végeztük el az eddigiekhez képest. Nemcsak a +1-es pozíció, de a tőle downstream elhelyezkedő további 3 pozíció szerepét is megvizsgáltuk az RNS mennyiségekre és a transzkripció iniciációs pozíciókra. Kutatásunkban minden promóterhez plazmid könyvtárakat hoztunk létre, és a plazmid könyvtárakról expresszálódott RNS-ek szekvenálásához egy egyedi, gRNS-ek szekvenálására alkalmas módszert alkalmaztunk. Kísérleteinket az RNS-t kódoló szakaszba épített randomizált bárkódoknak köszönhetően rengeteg különböző RNS szekvenciával végeztük el, amellyel a vizsgált 4 bázisos szekvencia különbségein kívül adódó, külső hatásokat, mint például szekvenciaspecifikus RNS degradáció, kívántuk elkerülni. A promóterekre irányuló vizsgálatainkat 4 bázispáros szekvenciánként nagy lefedettséggel végeztük el a legmodernebb technikák közé tartozó újgenerációs szekvenálás segítségével.

NGS eredményeink alapján az összes vizsgált promóterre igaz, hogy a promótertől downstream lévő pozíciók nukleotidjai befolyásolhatják a keletkező RNS-ek mennyiségét és a transzkripció iniciációjának pontos helyét, ezáltal az RNS hosszát is. Eddig csak a +1-es pozíciót vizsgálták szisztematikusan, azt is csak a T7, U6 és 7sk promóterek esetében. Eredményeink alapján nemcsak a +1 pozíció, de a tőle downstream lévő pozíciók is fontosak az RNS expresszió szempontjából. Így előfordulhat, hogy nagyságrendbeli különbségek lehetnek az RNS mennyiségekben a további pozíciók függvényében, hiába azonos a +1-es pozíció nukleotidja.
Azt találtuk, hogy az összes vizsgált promóternél befolyásolhatja a transzkripció kezdő pozícióját is a promótertől downstream elhelyezkedő szekvencia. Mindegyik promóternél azt kaptuk, hogy ha a promótertől downstream az első pozícióban pirimidin van, sokkal kisebb arányban lesz a +1-es pozíció a kezdő pozíció, és ilyenkor nem egy fix pozícióról indul el az átírás. Abban az esetben, ha a +1-ben pirimidin van, mindegyik promóter esetében nagymértékben befolyásolta nemcsak a promótert követő első, hanem a többi azt követő nukleotid is, hogy melyik pozícióról milyen arányban indult el a transzkripció.

Megmutattuk, hogy a humán U6 promóterről expresszálódó RNS-ek mennyiségében a +1A és a +1G között nincs szignifikáns különbség, ami egybecseng azokkal a publikációkkal, amelyek szerint az U6 promóter +1A-val is használható. Ha a +1 pozícióban A, vagy G nukleotid van, a transzkripció kezdő pozíciója közel minden esetben a +1, melyet jelentős módon már nem befolyásol a +2- +4 pozíciók szekvenciája. A +1-ben purint tartalmazó szekvenciák közül az első két pozíciót vizsgálva azt kaptuk, hogy az AG és a GG szignifikánsan nagyobb, a legkisebb expressziójú GC szekvenciák kétszeresét elérő expressziót biztosít. A +3 és a +4. pozíció a tőle upstream elhelyezkedő szekvencia függvényében változó mértékben befolyásolhatja az RNS mennyiségét, de akár többszörös RNS mennyiségbeli különbségeket okozhat e pozíciók szekvenciája is. A +1 pozíciókban A-t, vagy G-t tartalmazó szekvenciákat elemezve megmutattuk, hogy az expresszált RNS mennyiségében a +2- +4 pozíciók szekvenciája egy nagyságrend különbséget is okozhat.

Azt találtuk, hogy a humán 7sk promóter szintén nemcsak +1 guaninnal, hanem adeninnal is használható kis RNS expresszióra. A 7sk promóternél a +1-es pozícióban a purin jelenléte pontos, +1 pozíciójú transzkripciós iniciációt okoz, amin a további +2- +4. pozíciók szekvenciája jelentősen nem változtat. +1G-vel szignifikánsan több RNS keletkezik, mint +1A-val. Ha a +1 pozícióban A, vagy G nukleotid van, a legmagasabb expressziót biztosító kezdő dinukleotidok az AG, a GG és GT, amelyek esetében kétszer magasabb RNS szint érhető el átlagban, mint a legalacsonyabb RNS szintet biztosító purin kezdetű dinukleotidról. Az RNS mennyiséget a +3- +4. pozíciók nukleotidjai is szignifikánsan, a tőlük upstream elhelyezkedő szekvenciától függő mértékben befolyásolhatják. Eredményeink alapján, ha a +1-es pozícióban A nukleotid van, a további 3 bázis szekvenciája akár 27x-es, +1G-vel pedig 7x-es RNS mennyiségbeli különbségeket okozhat. Azt találtuk, hogy HEK sejtekben az U6 és a 7sk promóterekről termelődött RNS-ek mennyiségében nincs szignifikáns különbség, így a 7sk párhuzamosan, vagy akár az U6 promóter helyett is alkalmas lehet gRNS expresszióra.

A T7 promóter a méréseink szerint az eddigi adatokkal megegyezően a +1-es pozícióban a guanint preferálja. Vannak azonban olyan adeninnel kezdődő szekvenciák is, amelyek megközelítik a +1G-ről termelődő RNS-ek mennyiségét és az átírás is nagyrészt +1-ről indul el. A T7 promótert követő 4 nukleotid összes variációjáról keletkezett RNS-eket vizsgálva megállapítottuk, hogy az AG dinukleotidokról kezdődő szekvenciák esetében majdnem olyan pontos, +1-ről induló a transzkripció, mint +1G-ről, amit a +3 és +4 pozíciók szekvenciája már nem befolyásol nagymértékben. Irodalmi adatok alapján nem konzisztens, hogy a T7 promóterhez a promótertől downstream egy, kettő vagy 3 darab G-t érdemes használni. Megmutattuk, hogy a GG és GGG szekvenciákról csak fele- illetve negyedannyi transzkript keletkezik, mint a GA kezdetűekről. Érdekes módon az

AG dinukleotidok esetében a GA-t elérő szintű expressziót találtunk. Az RNS mennyiséget a +3- +4. pozíciók nukleotidjai is szignifikánsan, a tőlük upstream elhelyezkedő szekvenciától függő mértékben befolyásolják.

Eredményeink alapján a módosított hibrid U6T7 promóter, bár T7 polimerázzal jól használható, emlős expresszióhoz figyelembe kell venni, hogy bár azt találtuk, hogy az U6T7, a 7sk és az U6 promóterekről keletkezett RNS-ek mennyiségében nincs szignifikáns különbség, de nagyon heterogén hosszúságú RNS-ek keletkeznek róla, még +1purinról is.

Megvizsgáltuk a J23119 promótertől downstream elhelyezkedő szekvencia hatását a transzkripcióra, és azt találtuk, hogy ha a +1-es pozícióban purin van, a transzkripció iniciáció helye majdnem mindig a +1-es pozíció, amit a +2- +4 pozíciók szekvenciája már nem befolyásol jelentős mértékben. Továbbá megmutattuk, hogy a legtöbb RNS akkor keletkezik, ha a +1-ben purin van. Eredményeink alapján a J23119 promóterről keletkezett RNS mennyiségét is szignifikánsan befolyásolja a +2- +4 pozíciók szekvenciája is. A kezdő dinukleotidokat vizsgálva AG kezdettel keletkezik a legtöbb RNS, ami 3x-os RNS mennyiséget jelent. Az RNS mennyiséget a +3-4 pozíciók nukleotidjai is szignifikánsan, a tőlük upstream elhelyezkedő szekvenciától függő mértékben befolyásolják. Eredményeink alapján, ha a +1-es pozícióban A nukleotid van, a további 3 pozíció szekvenciája akár 50x-es, +1G-vel pedig 5x-ös RNS mennyiségbeli különbségeket okozhat.

A promóterekkel kapcsolatos eredményeink több okból is jelentősek lehetnek.
A 3 különböző organizmusból származó promóterek mindegyikénél azt találtuk, hogy a promótertől downstream nemcsak az első, hanem további 3 pozíció is befolyásolja a transzkripció iniciációs pozíciót, ezáltal az RNS-ek hosszát, valamint az expressziót is. Ez az alapkutatásban is érdekes lehet és felveti más promóterek, illetve további pozíciók vizsgálatának szükségszerűségét.
Eredményeink alapján a vizsgált promóterekkel adott szekvenciákat alkalmazva nagyobb RNS szint és pontosabb hosszúságú RNS-ek érhetőek el. Ez rendkívül hasznos lehet különböző alkalmazások számára, mint például az RNS interferencia, vagy a CRISPR. Eredményeink alapján a CRISPR-hez választható targetek köre bővülhet, abból adódóan, hogy találtunk olyan a promóterektől dowsntream elhelyezkedő szekvenciákat, amelyekről eddig nem volt ismert, hogy ugyanolyan alkalmasak lehetnek gRNS expresszióra, mint az eddig ismert variációk. Eredményeink ezen kívül- akár további pozíciók vizsgálatából származó eredményekkel együtt- alkalmasak lehetnének a jelenlegi CRISPR target predikciós programok továbbfejlesztéséhez is.
A disszertációmban bemutatott eredmények hozzájárulhatnak a CRISPR/Cas rendszer hatékonyabb alkalmazásához.

Összefoglalás

1. Megmutattuk, hogy a Cas12a nukleázok hatékonyan képesek indukálni a HR javítást N2a sejtekben, mind genomba integrált és ektopikus GFP riporterek segítségével.
2. Eredményeink alapján az eSpCas9 és az SpCas9HF1 variánsok aktivitását csökkentik a vizsgált gRNS módosítások.
3. Megmutattuk, hogy a promótertől downstream elhelyezkedő első bázis nem határozza meg a további szekvenciától függetlenül az expressziós szintet. Azt találtuk, hogy akár nagyságrendbeli különbségek lehetnek az RNS mennyiségekben a +2- +4 pozíciók szekvenciájának függvényében.
4. Eredményeink alapján a promótertől downstream elhelyezkedő nukleotidok a transzkripciós kezdő pozíciókat is befolyásolhatják. A +1-es pozícióban pirimidinnel kisebb arányban lesz a +1-es pozíció a transzkripció kezdő pozíciója, melyet a további pozíciók is befolyásolnak.
5. A humán U6 promóterről megmutattuk, hogy ha a +1-es pozícióban A, vagy G nukleotid van, a transzkripció kezdő pozíciója közel minden esetben a +1, melyet jelentős módon már nem befolyásol a +2- +4 pozíciók szekvenciája. Megmutattuk, hogy a humán U6 promóterről expresszálódó RNS-ek mennyiségében +1A és a +1G között nincs szignifikáns különbség.
6. Azt találtuk, hogy a humán 7sk promóternél a +1-es pozícióban a purin jelenléte pontos, +1 pozíciójú transzkripciós iniciációt okoz, amin a további +2- +4 pozíciók szekvenciája jelentősen nem változtat. A 7sk promóterről +1G-vel összességében szignifikánsan több RNS keletkezik, mint +1A-val. Eredményeink alapján HEK-293 sejtekben az U6 és a 7sk promóterekről termelődött RNS-ek mennyiségében nincs szignifikáns különbség.
7. A T7 promóter a méréseink szerint az eddigi adatokkal megegyezően a +1-es pozícióban a guanint preferálja. Vannak azonban olyan adeninnel kezdődő szekvenciák is, amelyek megközelítik a +1G-ről termelődő RNS-ek mennyiségét és az átírás is nagyrészt +1-ről indul el. Eredményeink szerint a +1-ben G-t tartalmazó szekvenciák közül a GG és GGG kezdetűekről kevesebb transzkript keletkezik, mint a nagyobb expressziót biztosító GA kezdetűekről.
8. Megmutattuk, hogy az U6 promóter módosítása U6T7 hibrid promóterré azt eredményezte, hogy akkor is nagyon heterogén, hogy melyik pozícióról kezdődik a transzkripció, ha a +1-es pozícióban purin van.
9. A J23119 promóterről azt találtuk, hogy +1purin esetében a transzkripció iniciáció helye majdnem mindig a +1-es pozíció, amit a +2- +4 pozíciók szekvenciája már nem befolyásol olyan jelentős mértékben, mint +1pirimidineknél. Továbbá megmutattuk, hogy összességében a legtöbb RNS akkor keletkezik, ha a +1-ben purin van.

Közlemények listája

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények:

1. Cpf1 nucleases demonstrate robust activity to induce DNA modification by exploiting homology directed repair pathways in mammalian cells
Toth, E; **Weinhardt, N***; Bencsura, P; Huszar, K; Kulcsar, P I; Talas, A; Fodor, E; Welker, E
BIOLOGY DIRECT 11 Paper: 46, 14 p. (2016) **IF:3,472 *megosztott első szerző**

2. Crossing enhanced and high fidelity SpCas9 nucleases to optimize specificity and cleavage
Kulcsar, PI; Talas, A; Huszar, K; Ligeti, Z; Toth, E; **Weinhardt, N**; Fodor, E; Welker, E
GENOME BIOLOGY 18 Paper: 190, 17 p. (2017) **IF:13,214**

3. Nucleotides downstream of the promoter affect start site and RNA level in promoters used for gRNA expression
(Az eredmények jelenleg kézirat formájában vannak, melynek a jelölt az első szerzője)

A disszertáció témájához közvetlenül kapcsolódó közlemények kumulatív hatástényezője: 16,686

A disszertáció témájához közvetve kapcsolódó közlemények:

4. Mb- and FnCpf1 nucleases are active in mammalian cells: activities and PAM preferences of four wild-type Cpf1 nucleases and of their altered PAM specificity variants.
Toth, E; Czene, B C; Kulcsar, P I; Krausz, S L; Talas, A; Nyeste, A; Varga, E; Huszar, K; **Weinhardt, N**; Ligeti, Z; Borsy A; Fodor, E; Welker, E
NUCLEIC ACIDS RESEARCH 46: 19 pp. 10272-10285., 14 p. (2018) **IF:11,147**

5. A convenient method to pre-screen candidate guide RNAs for CRISPR/Cas9 gene editing by NHEJ-mediated integration of a 'self-cleaving' GFP-expression plasmid
Talas, A; Kulcsar, P I; **Weinhardt, N**; Borsy, A; Toth, E; Szebenyi, K; Krausz, S L; Huszar, K; Vida, I; Sturm, A; Gordos, B; Hoffmann, O I; Bencsura, P; Nyeste, A; Ligeti, Z; Fodor, E ; Welker, E
DNA RESEARCH 24: 6 pp. 609-621., 13 p. (2017) **IF:5,415**

A disszertáció témájához nem kapcsolódó közlemények:

6. Highly efficient RNAi and Cas9-based auto-cloning systems for C. elegans research.
Sturm, A; Saskoi, E; Kovacs, T; **Weinhardt, N**; Vellai, T
NUCLEIC ACIDS RESEARCH 46: 17 Paper: e105, 13 p. (2018) **IF:11,147**

MTMT azonosító: 10054747
Összes publikáció kumulatív hatástényezője (IF): 44,395
Összes független hivatkozások száma: 97
Hirsch index: 5