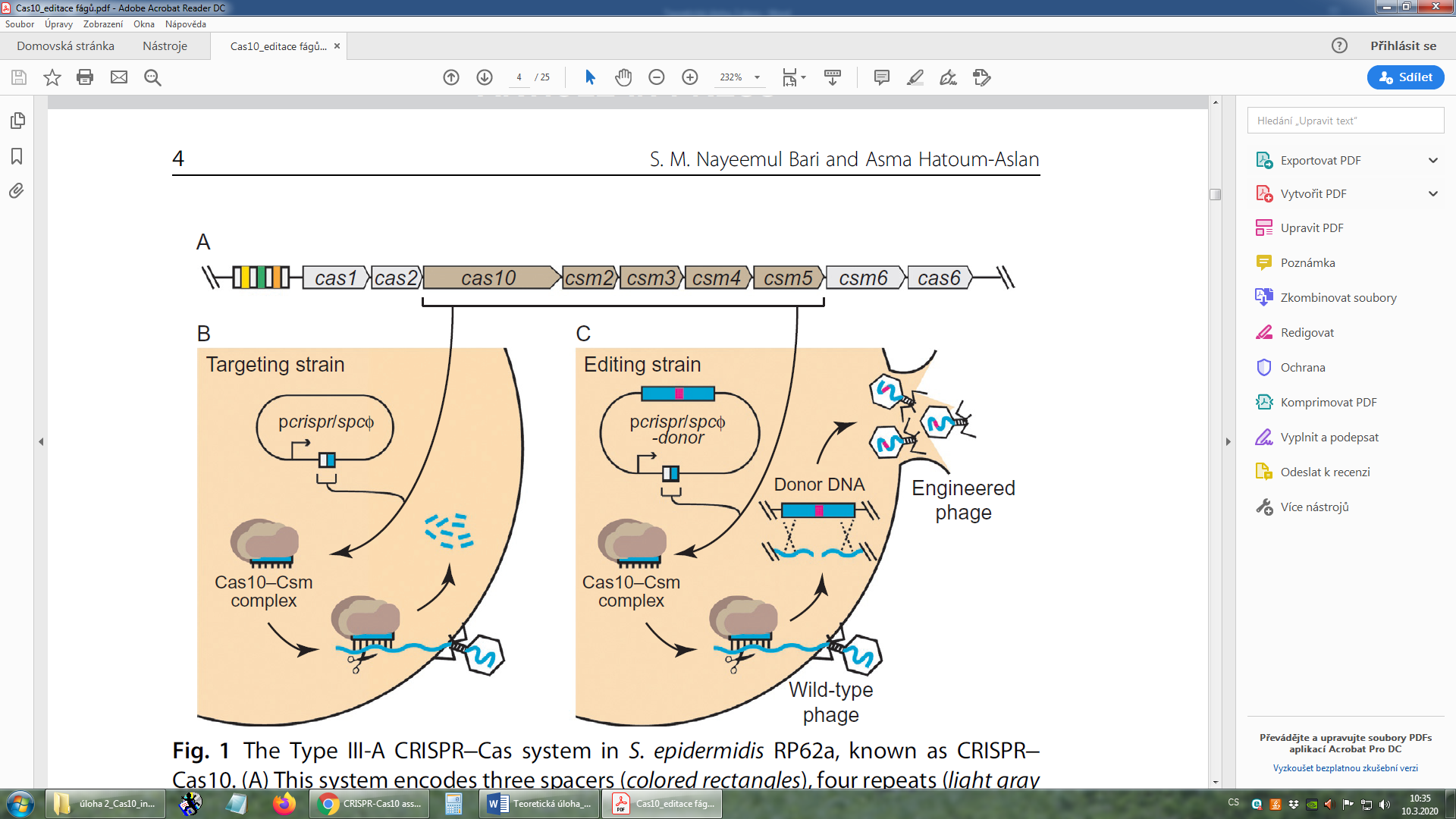
# Editace fágového genomu pomocí systému CRISPR/Cas10 – seznámení s více vektorovým systémem využívajícím CRISPR/Cas10 pro inaktivaci fága

**Cílem teoretické úlohy je podrobně se seznámit s možnostmi editace genomů bakteriofágů pomocí systému CRISPR/Cas10. Bakteriofágy jako viry bakterií mají řadu praktických aplikací a cílené změny jejich genomu mají využití v biotechnologiích i medicíně. Efektivní metoda umožňující editaci fágových genomů také přispívá významně k jejich výzkumu.**

# CRISPR/Cas10 editační systém a jeho využití pro inaktivaci/editaci fágových genomů

CRISPR/Cas10 systém označovaný jako Type III-A CRISPR/Cas systém byl poprvé identifikován u grampozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis.* V úloze využijeme tento systém jako nástroj pro editaci lytických fágů *Staphylococcus aureus*.

Bakteriofágy cílí na bakteriální hostitele druhově specificky, proto je editaci nutné provést v příslušném hostiteli. Fágy injikují svou DNA do hostitele a s využitím jeho replikačního aparátu se množí a následně lyzují hostitelskou buňku během několika desítek minut. Způsob editace fágový genomů popisuje **Obr. 1** (Bari *et al*., 2019).



**Obr. 1: CRISPR/Cas systém typu III-A (Cas10) u *S. epidermidis*. A.** systém kóduje tři spacery (barevně) ohraničené repetitivními sekvencemi a 9 *cas/csm* genů. Efektorový komplex proteinů Cas10-Csm je znázorněn hnědou barvou. Systém je využit pro editaci fágových genomů: **B.** kmen s plazmidem cílícím na fágovou sekvenci. V prvním kroku se ověří, zda navržený spacer cílí na cílového fága a inhibuje jeho replikaci. **C.** V druhé fázi je zkonstruovaný vektor tak, že kromě spaceru nese také donorovou DNA s danou mutací s dostatečně dlouhými přesahy umožňujícími rekombinaci. Fágy, které rekombinací získají požadovanou mutaci, se stávají imunní k původnímu spaceru v navrženém systému.

CRISPR/Cas10 systém je kromě mezerníků tvořen efektorovým komplexem, který se skládá z 5 proteinových podjednotek (Cas10, Csm2, Csm3, Csm4 a Csm5) a crRNA. Nukleáza Cas6 a protein Csm6 hrají roli při sestřihu pre-crRNA na crRNA a komplex degraduje transkripty bakteriofága. Systém pro editaci fágů zahrnuje dvou-krokový postup popsaný ve schématu (**Obr. 2**). V prvním kroku je vytvořen kmen obsahující plazmid, který nese mezerník a efektorový komplex pro cílení na esenciální gen bakteriofága. Tento kmen slouží jako kontrolní, ověřuje správnost návrhu mezerníku. V druhém kroku se využívá editační kmen, který obsahuje na plazmidu nebo více plazmidech cílící mezerník a donorovou DNA. Donorová DNA je sekvence, která obsahuje mutovanou sekvenci fága a je ohraničena z obou stran 500-1000 nt dlouhou sekvencí fága. Bakteriofágy jsou pomnoženy na tomto editačním kmeni, úspěšně se pomnoží pouze „mutantní“ potomstvo, které obsahuje mutovanou sekvenci (homologní rekombinace) a uniká CRISPR/Cas systému. Genomovou sekvenci fágů, u nichž proběhla rekombinace nebo přestavba genomu ověřujeme sekvenováním.

Výběr vhodného spaceru pro editaci fágového genomu v blízkosti genu, který má být mutován.

Vložení spaceru do plazmidového vektoru pro vytvoření pcrispr/φ.

Přenos plazmidu pcrispr/φ do kmene s funkčním CRISPR/Cas10 systémem – tzv. „cílící kmen“

Potvrzení funkčnosti spaceru. Infikování kmene bakteriofágem.

Imunita?

Ne

Kontrola navrženého spaceru/konstruktu.

# 1. Cílení na bakteriofága

Návrh a vložení donorové DNA obsahující požadovanou mutaci do vektoru pcrispr/φ a vytvoření pcrispr/φ-donorDNA

Ano

Pomnožení fága na editačním kmeni. Purifikace plak a ověření vzniku rekombinantních fágů.

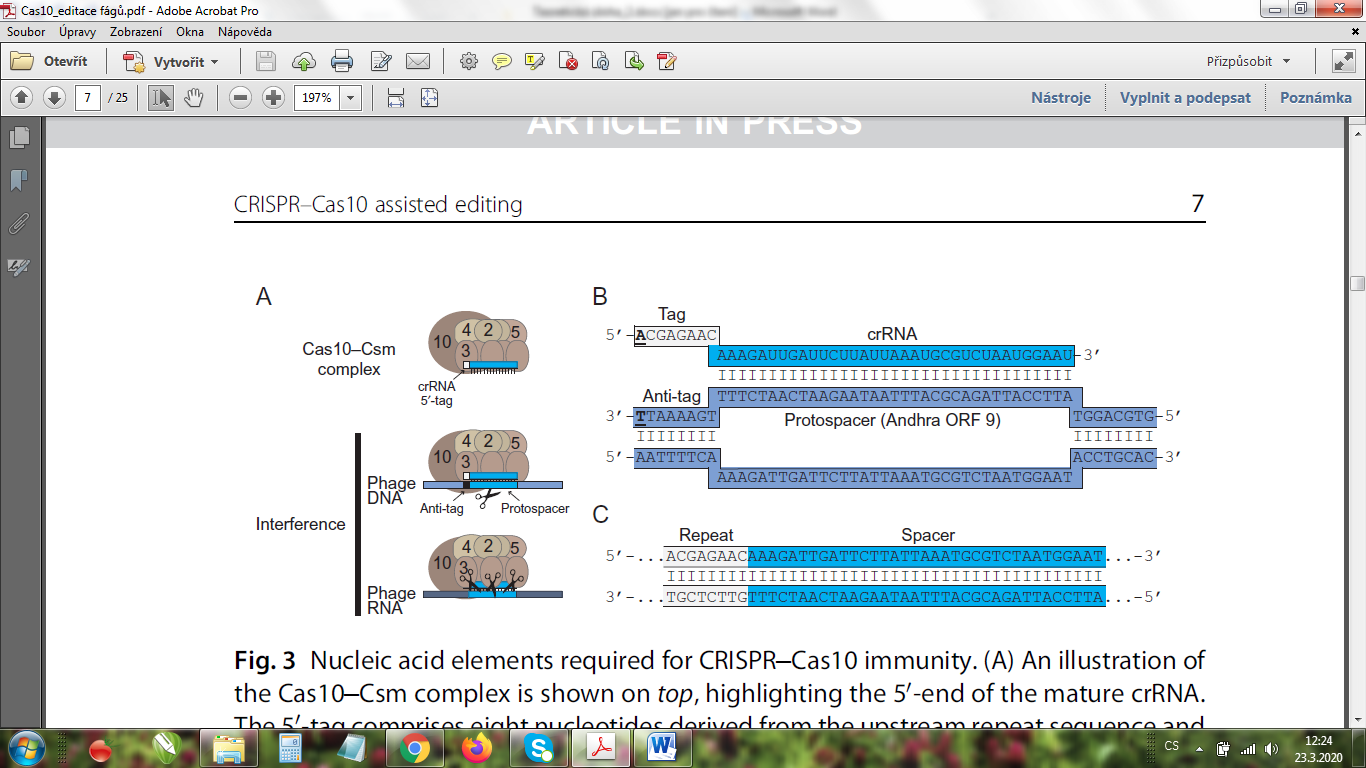
# 2. Editace fága

Přenos plazmidu pcrispr/φ-donorDNA do kmene s funkčním CRISPR/Cas10 systémem – tzv. „editační kmen“

**Obr. 2: Schématický postup editace:**

Aby bylo možné systém CRISPR/Cas10 použít na editaci fága, je nutné seznámit se také s principem imunity vůči systému CRISPR/Cas10 **(Obr. 3)**. Jak bylo uvedeno výše, crRNA jsou zpracovávány endoribonukleázou Cas6. Další non-Cas nukleázy přispívají k tvorbě crRNA, a není jasné, zda jsou důležité-pro imunitu. Zralé crRNA jsou vázány Cas10, Csm2, Csm3, Csm4, a Csm5 za vzniku Cas10 – Csm complexu. Tento efektorový komplex detekuje a ničí cílové DNA a RNA molekuly způsobem, který je závislý na transkripci, což vyžaduje komplementaritu crRNA ke kódujícímu řetězci cílové DNA a také k odpovídající mRNA. Csm6 nukleáza degraduje fágový transkript.

Při výběru protospaceru (protospacer= sekvence plazmidové nebo virové DNA, která je následně začleněna do CRISPR lokusu a tvoří nový mezerník/spacer) je nutné počítat ještě s 8-nukleotidovou sekvencí, která je před protospacerem a označuje se jako **anti-tag** sekvence. Tato sekvence by měla mít malou nebo žádnou komplementaritu s 5´koncem crRNA. Pokud není splněn tento požadavek a sekvence anti-tag je komplementární k tag sekvenci na 5´konci crRNA, nedochází ke štěpení cílové fágové sekvence. Tato jedinečná funkce systémů typu III chrání hostitelskou buňku proti cílení lokusu CRISPR na chromozom hostitele **(Obr. 3A).**



**Obr. 2: Anti-tag sekvence a imunita vůči CRISP/Cas10 systému. A**. Efektorový komplex Cas10 – Csm je zobrazen nahoře (hnědá barva), nasedá na 5´konec crRNA. Osm nukleotidů (bílá barva) odvozených od „upstream“ sekvence nemá podobnost s cílovou nukleovou kyselinou. Během interference efektorového komplexu s fágovou komplementární DNA a RNA dochází k degradaci fágových nukleových kyselin. Důležitým požadavkem je absence komplementarity mezi „tag“ 5´crRNA a protilehlou oblastí sousedící s protospacerem, nazvaná „anti-tag“. **B.** Příklad permisivního protospaceru vORF9 fága Andhra, kde „anti-tag“ sdílí pouze jeden nukleotid komplementarity s „tag“ sekvencí (podtržené nukleotidy). **C**. Je zobrazen mezerník, který odpovídá „protospaceru“ **(B),** společně s repetitivně oblastí, která odpovídá 5´ crRNA-tag

## Požadavky na protospacer pro editaci fágových genomů CRISPRCas10:

* Protospacer musí nasedat na kódující řetězec DNA.
* Řetězec musí být přepisován.
* Sekvence sousedící s protospacerem proti směru transkripce (anti-tag) nesmí vykazovat komplementaritu s 5´tag crRNA sekvencí.
* Protospacery by měly mít délku 35 nukleotidů a ideálně by se měly 100% shodovat s oblastí fágového genomu, který chceme upravovat.
* Protospacer by neměl být od místa, které chceme cíleně mutovat ve vzdálenosti větší než 500 nt.

K návrhu protospacerů slouží skript vytvořený pro program Python:

Python nejnovější verze: <https://www.python.org/downloads/>

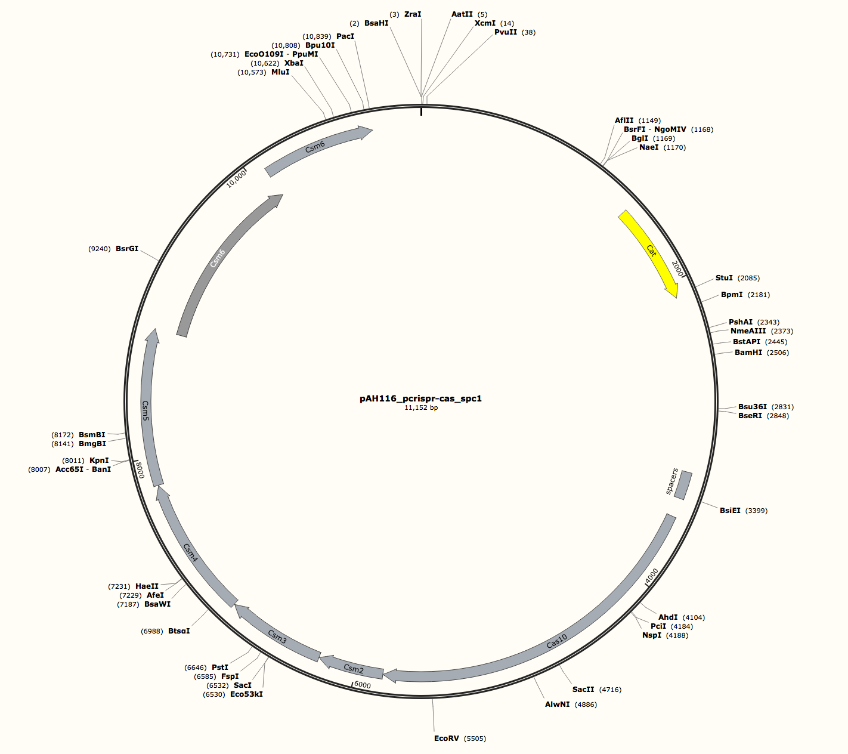
Skript a návod, jak ho spustit: <https://github.com/ahatoum/CRISPR-Cas10-Protospacer-Selector>

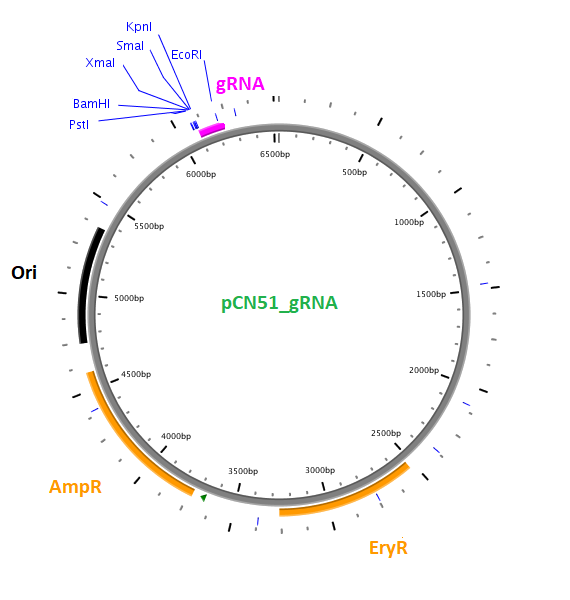
Návod na použití skriptu naleznete v článku Bari *et al.*, 2019, který je k dispozici ve studijních materiálech.

## **PRACOVNÍ POSTUP K ÚLOZE**: Editace fágového genomu pomocí systému CRISPR/Cas10

## Postup práce v bodech:

1. Výchozím materiálem je plazmidová DNA **pCN51\_gRNA a vektor pAH116\_spc1** (vektor pCN51\_gRNA obsahuje gRNA a místo pro vložení mezerníku cílícího na fága 812 pomocí *Bsa*I, vektor pAH116\_spc1 obsahuje efektorový komplex proteinů zajišťující štěpení cílové sekvence na fágovém genomu **Obr. 3**), kompetentní buňky ***E. coli* DH5α** a ***E. coli* BL21**, ***S. aureus* RN4220 pAH116\_spc1**
2. Vložení mezerníku do **pCN51\_gRNA**: štěpení vektoru, vyřezání z gelu, spojení olig (mezerník), ligace
3. Transformace upraveneho vektoru do *E. coli* TOP10F, selekce transformant
4. Ověření transformant pomocí „colony PCR“
5. Izolace vektoru s vloženým mezerníkem, jeho přenos elektroporací do buněk ***S. aureus*** **RN4220 pAH116\_spc1**
6. Test připraveného systému pomocí plakové metody na dvouvrstvém soft agaru





**Obr. 3: Schématické znázornění vektorů pAH116\_spc1 a pCN51\_gRNA.**

# 1. Příprava kompetentních buněk *E. coli* pro transformaci

Jako recipientních kmenů pro klonování cizorodé DNA se nejčastěji využívá kmenů *E. coli*, které byly mutacemi a metodami genového inženýrství upraveny tak, aby byly schopny s vysokou účinností přijímat externí DNA (většinou plazmidovou), umožňovaly její replikaci a udržovaly její původní strukturu (tj. nezpůsobovaly vyštěpování naklonované DNA) a dovolovaly selekci rekombinantních plazmidů. Podrobná charakteristika těchto kmenů (zejména jejich genotyp) bývá uváděna v katalozích firem a praktických příručkách.

Vlastní navození kompetence spočívá v pomnožení buněk příslušného kmene *E. coli* v tekutém živném mediu (např. LB bujonu) do exponenciální fáze růstu, převedení buněk do roztoku CaCl2, v němž se buňky ponechají několik hodin, během nichž dojde k jejich vyhladovění a určitým změnám v buněčné stěně, umožňujícím přijmout externí DNA.

Takto připravené buňky lze použít buď bezprostředně, nebo se převedou do roztoku CaCl2 s přídavkem glycerolu, v němž je možné buňky zamrazit na -70°C a použít později (takto připravené buňky lze uchovávat několik měsíců nebo i déle).

Organismy: Bakteriální kmen *E. coli* Top10F´, *E. coli* BL21 (DE3)

Materiál: LB bujon, sterilní roztok 0,05 M CaCl2 sterilní centrifugační zkumavky, denzitometr s příslušenstvím, chlazená centrifuga T23

**Postup**

1. 50 ml LB bujonu v Erlenmayerově baňce naočkujeme 2 ml bujonové kultury (18 hod/37°C) a inkubujeme při 37 °C na třepačce do hustoty suspenze OD600 = 0,3. (Kultivace cca 2 hod.)

2. Buněčnou kulturu vytemperujeme na 4 °C v ledové vodní lázni a centrifugujeme 10 min/3000 rpm při 4 °C. Od této chvíle nesmí teplota překročit 4°C!

3. Sediment buněk resuspendujeme v polovině objemu (25 ml) ledového roztoku CaCl2 a ponecháme v lednici při 4 °C přes noc.

4. Buňky centrifugujeme jako v bodě 2) a sediment resuspendujeme v 5 ml (obecně v 1/10 výchozího objemu kultury) roztoku CaCl2.

5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchovávání se k buněčné suspenzi přidá 1/10 objemu sterilního glycerolu (4 °C!) a suspenze se zmrazí na -70 °C.

# 2. Příprava kompetentních buněk *S. aureus* pro transformaci

1. LB bujon (25 ml) zaočkujeme 1/10 objemu noční kultury (2,5 ml) a kultivujeme do OD600 = 0,4 - 0,7 za třepání (160 rpm) při teplotě 37 °C (asi 4 hod).
2. Chladíme cca 30 min na ledě.

*Od této chvíle pracujeme při 4 °C, všechny zkumavky udržujeme na ledě a předchladíme centrifugy!*

1. Centrifugujeme 10 min/4500 rpm. /4 °C.
2. Odlejeme supernatant, resuspendujeme pelet v 20 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
3. Odlejeme supernatant, resuspendujeme pelet v 10 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
4. Odlejeme supernatant, resuspendujeme pelet v 5 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
5. Odlejeme supernatant, resuspendujeme pelet v 125 µl sacharózy (0,5 M).

*Buňky můžeme ihned použít, nebo uchováváme alikvoty kultury (50 µl) při -80 °C. Buňky připravené tímto způsobem jsou elektrokompetentní přibližně jeden rok.*

# 3. Příprava plazmidového vektoru pCN51 ke klonování spaceru cílícího na fága 812

Jako hostitelské kmeny pro tento plazmidový vektor jsou používány kmeny *E. coli* a *S. aureus*. K selekci transformant v kmenech *S. aureus* se jako selekční marker používá erytromycin (výsl. konc. 10 µg/ml) a v *E. coli* je selekčním markerem ampicilin (výsl. konc. 100 µg/ml).

K izolaci DNA vektoru je možné použít několika metod, poskytujících DNA o různém množství a čistotě. Optimální je připravit DNA purifikovanou přes kolonku (spin columns) s využitím některého komerčního kitu. Je možné však vycházet i z preparátů, připravených mikrometodou alkalické lyze, při níž se získá DNA v množství několika µg s dobrou citlivostí ke štěpení restrikčními endonukleázami a účinně spojovaná ligázou.

# 4. Naštěpení vektoru restrikční endonukleázou

Složení restrikční směsi pro jednu reakci:

DNA plazmidu 1 µg

Restriktáza (BsaI) 1 µl

Pufr pro restriktázu (2×) 2 µl

H2O doplnit do objemu 20 µl

Postup:

1. Smícháme všechny reagencie, restriktázu přidáváme jako poslední.
2. Dobře promícháme a inkubujeme při 37 °C 16 hod.
3. Deaktivujeme zahřátím na 65 °C po dobu 10 min.

Poznámky:

1. V průběhu práce udržujeme restriktázu v chladícím stojánku, ihned vracíme do -20 °C!
2. Pokud chceme vektor použít pro klonovací účely, restriktázu nedeaktivujeme, ale buď ihned defosforylujeme, nebo přečistíme extrakcí z agarózového gelu (pro odstranění nenaštěpené kontaminanty).

# 5. Výběr spaceru

Zdrojem spaceru pro selekci byla zvolena následující oblast genu ORF190 fága 812, která není přítomna v mutantní variantě 812a.

>MH844528.1:130545-130832 Staphylococcus phage 812, complete genome

ATGAATAAAGCAGTAGAACAAGCAAGTAATGCATTAGGTCAAGGATTTTCAGCTATGGTATGGCATCAAGTATTAGTAGGGTTAGGGTTTATTTTATTAGGATTGGTATTATCTTTACTGGTTTGGGTATTAGTAAAAAAATTCCATGTACCTTTTAATCACCCGACAGCTTTTGTAGTGTACTCAATTATGTTAGTGAGTATTGTTGCTAGTTTTATTTGGGGCGGTTTACATGTAATTAACCCTGAGTATTATGCTATTTTAGAACTTAAAGGTTTTATAAAGTAG

**Sekvence spaceru**

CTAATACTTGATGCCATACCATAGCTGAAAATCCT

**Oligonukleotidy**

CR\_812\_Cas10\_F:

GTTACCGATCGATACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAACCTAATACTTGATGCCATACCATAGCTGAAAATCCTG

CR\_812\_Cas10\_R:

AATTCAGGATTTTCAGCTATGGTATGGCATCAAGTATTAGGTTCTCGTCCCCTTTTCTTCGGGGTGGGTATCGATCG

# 6. Spojení oligonukleotidů a ligace

Přiložení mezerníků:

**Reagenční směs:**

1 µl oligo I (100 µM)

1 µl oligo II (100 µM)

5 µl 10X T4 Ligační pufr (NEB)

1 µl T4 Polynukleotid kináza (NEB)

42 µl ddH2O

Finální objem = 50 µl

1. Smícháme reagencie a inkubujeme 1 hodinu v termocycleru při teplotě 37 °C.
2. Zastavíme běh a přidáme 0,5 µl 5M NaCl, jemně promícháme pipetou.
3. Inkubujeme 5 min v termobloku nebo termocykleru při 95 °C. Vypneme termoblok a necháme pomalu postupně zchladnout až na laboratorní teplotu (*několik hodin!*), nebo pomalu ochlazovat v termocykleru na 25 °C s rychlostí poklesu teploty o 1 °C/min.
4. Přidáváme 1µl do ligační směsi.

**Ligační reakce:**

2 µl ligační pufr

0.25 µl NEB ligáza

50-75 ng vektor

1µl spárované oligo

Doplnit do 20 µl H2O

Promícháme, necháme inkubovat při pokojové teplotě 1-1,5 hodiny. Inaktivujeme zahřátím na 65°C/10 min.

#### Pozor – ligační pufr obsahuje BSA, zkontrolovat, zda je úplně rozpuštěný. Pokud ne, zahřát v ruce nebo krátce na 50 °C, promíchat.

7. Transformace kompetentních buněk  *E.coli*

1. Kompetentní buňky necháme rozmrznout na ledu.
2. 5 µl ligační směsi promícháme s 5 µl TE pufru (pH = 8.0) a přidáme ke kompetentním buňkám.
3. Promícháme poklepáním na epinku, nemícháme špičkami a  nevortexujeme!
4. Necháme 30 min na ledu.
5. Epinky vložíme do plováku, umístíme do vodní lázně vytemperované na 42 °C na 1 min.
6. Ochladíme 2 min na ledu.
7. Přidáme 1 ml LB na kompetentní buňky a lehce promícháme.
8. Inkubujeme 1 hod / 37 °C / 390 rpm.
9. Centrifugace 6000 g / 4 min
10. Odlijeme supernatant – na dně zkumavky zůstane vlivem povrchového napětí – asi 100 µl – v tomto objemu pelet resuspendujeme pipetou.
11. Vysejeme na selekční misky se selekční půdou.
12. Druhý den pozorujeme jednotlivé kolonie transformant, několik vybereme a přečárkujeme na nové selekční misky.

**Kontroly**:

Pozitivní kontrola – vektor bez inzertu, kontrolujeme, zda funguje transformace a kompetentní buňky.

Negativní kontrola – ligační směs s vektorem bez inzertu.

Kontrola ligace – ligační směs s vektorem naštěpeným jen jednou restriktázou. Tento vektor by měl lehce ligovat a měli by vznikat transformanty s vysokou frekvencí. Pokud nevyrostou kolonie transformant, pravděpodobně nefunguje ligace.

## 8. Ověření transformant pomocí „colony PCR“

Používáme primery na amplifikaci klonovaného inzertu. Používamé Taq polymerázu. Připravíme jednu mastermix pro více vzorků, potom rozpipetujeme po 25/50 µl na reakci. Templát se v každé reakci liší, přidáváme až po rozpipetování.

Reagencie na 25 µl reakci:

2,5 µl 10x Taq buffer (without MgCl2)

1,5-2,5 µl 25mM MgCl2 sollution

0,5 µl 10 mM dNTPs – (ze zásobních roztoků NTP ředěním v nuclease-free H2O)

0,5 µl 10 uM Forward primer

0,5 µl 10 uM Reverse primer

0,25 µl Taq DNA pol (5U/µl)

0,75 µl DMSO (pokud GC poměr primerů > 60 %, jinak nepřidáváme)

Nuclease-free H2O doplnit do 25 µl

Jako templát použijeme kolonii transformant. Sterilní 100 µl špičkou se jemně dotkneme kolonie (nenabrat agar) a resuspendujeme v reakční směsi.

Thermocycling conditions:

1. Počáteční denaturace 95 °C/10 min (nutné, varem dojde k lyzi buněk)
2. Denaturace 94 °C/1 min
3. Annealing Tm(primers) - 5 °C (45-72 °C)/30 s
4. Extension 72 °C - 1 min/kb

Kroky 2 až 4 opakujeme 30 - 35 krát

1. Final extension 72 °C/5 min
2. Hold 4 °C

*Vždy použijeme pozitivní kontrolu (templátová DNA pro originální amplifikaci inzertu, pro ověřeni účinnosti PCR). Jako negativní kontrolu můžeme použít transformantu prázdného vektoru, pokud jsme používali prázdný vektor jako kontrolu transformace.*

*Pokud nevychází colony PCR, použijeme na izolaci plazmidu kit.*

Přítomnost plazmidu a naklonovaného inzertu se ověří na ELFO.

9. Izolace plazmidové DNA

Plazmidová DNA kompletního vektoru pCN51\_gRNA (s vloženým spacerem) je izolována komerčním kitem dle manuálu výrobce kitu.

10. Transformace kompetentních buněk *S. aureus* elektropolací

1. Připravit DNA pro elektroporaci do sterilních 1,5 ml mikrozkumavek (5 ng – 2 μg ne ve větším objemu než 20ul). Je možno vyzkoušet různé koncentrace/objemy elektroporované DNA (5μl, 10μl a 20μl).

2. Rozmrazit kompetentní buňky při pokojové teplotě. Přidat 50 μl buněk ke každému vzorku DNA, opatrně promíchat pipetou. Inkubace vzorků při pokojové teplotě/30 minut. Připravit pro každý vzorek 1 ml BHI média a 0,2 cm kyvety (vše při pokojové teplotě).

3. Nastavení přístroje Gene Pulser Xcell:

a. Zapnout přístroj, připojit modul pro kyvety

b. Otevřít „Pre‐Set protocol“; Bacteria protocol screen (zmáčknout 4; potom dvakrát Enter).

c. Pro výběr protokolu pro buňky *S.* *aureus* zmáčknout 6; potom šipkami vybrat *S.* *aureus.*

4. Přenést směs kompetentních buněk a DNA do 0,2 cm kyvety a uzavřít kyvetu víčkem.

5. Umístit kyvetu do modulu pro kyvety. Zmáčknout červené tlačítko „Pulse“.

6. Následně přidat do kyvety 1 ml BHI média a opatrně přepipetovat směs do sterilní mikrozkumavky vhodného objemu.

7. Inkubovat 1 h./37°C/250 rpm. Vyset příslušné objemy elektroporovaných buněk (50 μl, 100 μl, 200 μl v triplikátech) na TSA misky s příslušnou selekční látkou.

8. Inkubace 36 – 48 h./37 °C.

9. Selekční test pomocí plakové metody

1. Na MPA misky s příslušnými selekčními látkami (erythromycin, chloramfenikol) vysejeme 100 μl noční kultury modifikovaného kmene ***S. aureus* RN4220 [pCN51\_gRNA, pAH116\_spc1]**.

2. Kapkovou metodou infikujeme bakteriální vrstvu fágy 812 a 812a, inkubujeme při 37 °C přes noc.