

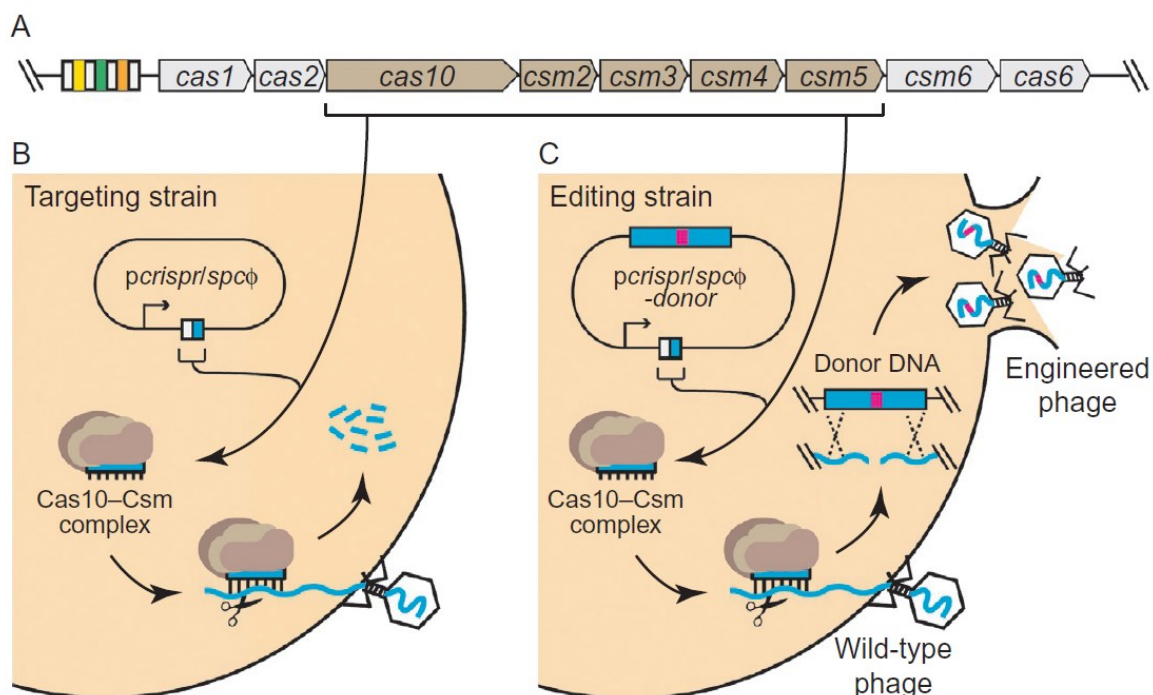
Editace fágového genomu pomocí systému CRISPR/Cas10 – seznámení s více vektorovým systémem využívajícím CRISPR/Cas10 pro inaktivaci fága

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

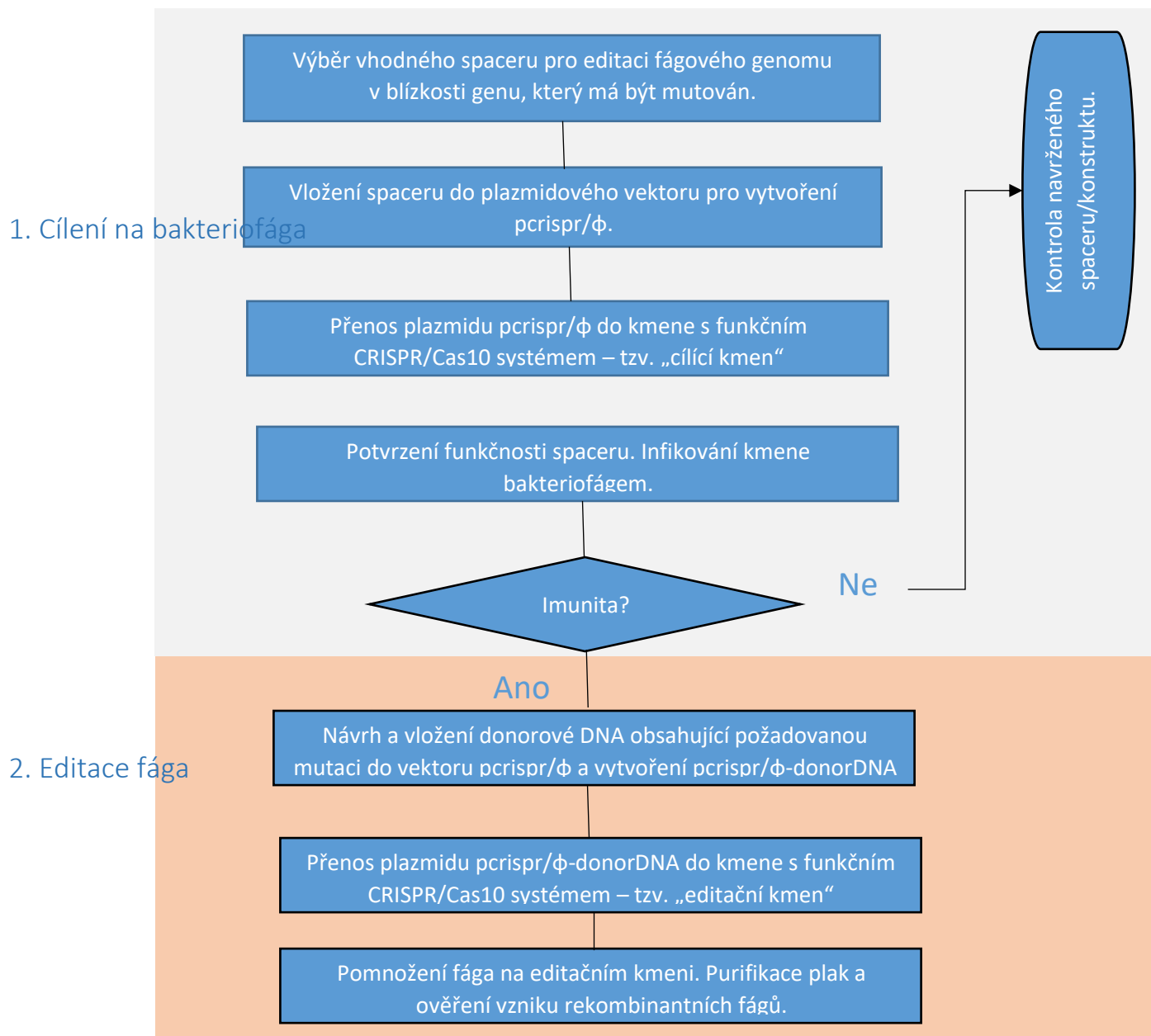
CRISPR/Cas10 systém označovaný jako Type III-A CRISPR/Cas systém byl poprvé identifikován u gram pozitivní bakterie *Staphylococcus epidermidis*. V úloze využijeme tento systém jako nástroj pro editaci lytických fágů *Staphylococcus aureus*.

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 lyžují hostitelskou buňku během několika desítek minut. Způsob editace fágových 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.

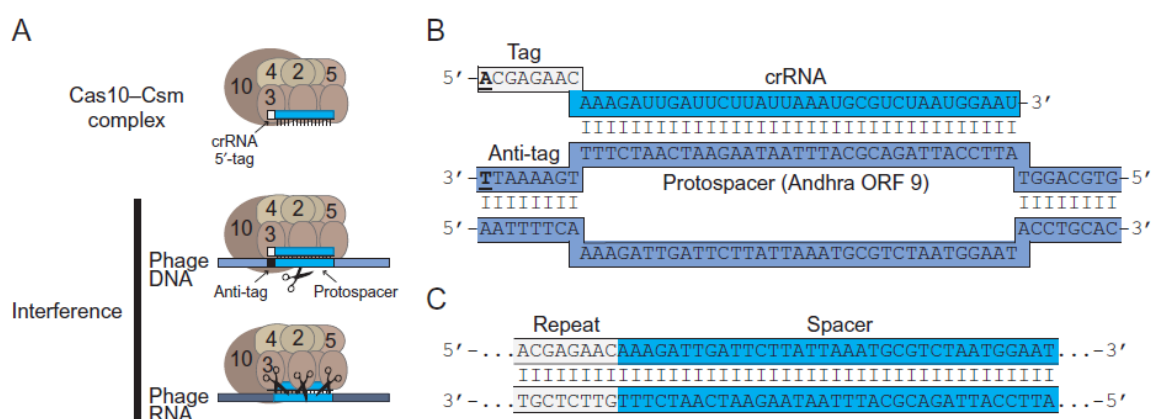
CRISPR/Cas10 systém je kromě mezerníků tvořen efektorovým komplexem, který se skládá z 5 proteinových podjednotek (Cas10, Csm2, Csm3, Csm4 a Csm5) a crRNA. Nukleáza Cas6 a protein Csm6 hrají roli při sestřihu pre-crRNA na crRNA a komplex degraduje transkripty bakteriofága. Systém pro editaci fágů zahrnuje dvou-krokový postup popsáný 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 cílicí 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.



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 CRISPR/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 permissivního 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/>

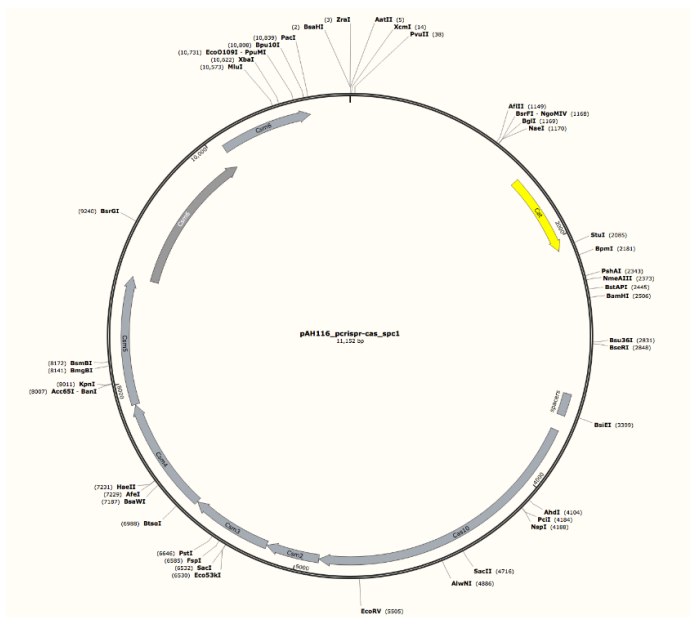
Skript a návod, jak ho spustit: <https://github.com/ahatoum/CRISPR-Cas10-Protospacer-Selector>

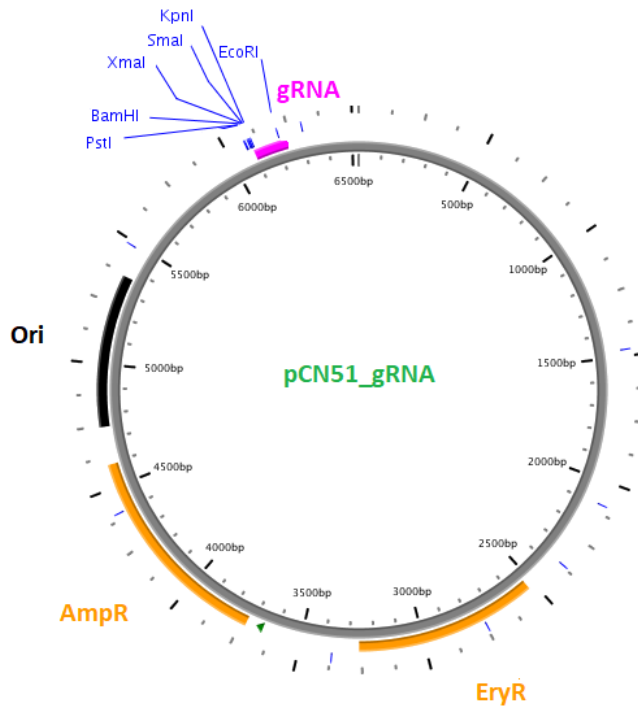
Návod na použití skriptu naleznete v článku Bari *et al.*, 2019, který je k dispozici ve studijních materiálech.

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

Postup práce v bodech:

- I. Výchozím materiálem je plazmidová DNA **pCN51_gRNA** a **vektor pAH116_spc1** (vektor pCN51_gRNA obsahuje gRNA a místo pro vložení mezerníku cílicího na fága 812 pomocí *BsaI*, vektor pAH116_spc1 obsahuje efektorový komplex proteinů zajišťující štěpení cílové sekvence na fágovém genomu **Obr. 3**), kompetentní buňky *E. coli* DH5 α a *E. coli* **BL21**, *S. aureus* RN4220 **pAH116_spc1**
- II. Vložení mezerníku do **pCN51_gRNA**: štěpení vektoru, vyřezání z gelu, spojení olig (mezerník), ligace
- III. Transformace upraveného vektoru do *E. coli* TOP10F, selekce transformant
- IV. Ověření transformant pomocí „colony PCR“
- V. Izolace vektoru s vloženým mezerníkem, jeho přenos elektroporací do buněk *S. aureus* RN4220 **pAH116_spc1**
- VI. 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 katalogích 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 CaCl_2 , 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 CaCl_2 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 CaCl_2 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 $OD_{600} = 0,3$. (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 $CaCl_2$ 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 $CaCl_2$.
5. Takto připravené kompetentní buňky lze používat přibližně jeden týden. Pro dlouhodobé uchování 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 $OD_{600} = 0,4 - 0,7$ 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!

3. Centrifugujeme 10 min/4500 rpm. /4 °C.
4. Odlejíme supernatant, resuspendujeme pelet v 20 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
5. Odlejíme supernatant, resuspendujeme pelet v 10 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
6. Odlejíme supernatant, resuspendujeme pelet v 5 ml sacharózy (0,5 M), centrifugujeme 10 min/5500 rpm. /4 °C.
7. Odlejíme supernatant, resuspendujeme pelet v 125 μ l sacharózy (0,5 M).

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

3. Příprava plazmidového vektoru pCN51 ke klonování spaceru cílicího 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 μ g/ml) a v *E. coli* je selekčním markerem ampicilin (výsl. konc. 100 μ g/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 restričními endonukleázami a účinně spojovaná ligázou.

4. Naštěpení vektoru restriční endonukleázou

Složení restriční směsi pro jednu reakci:

DNA plazmidu	1 μg
Restriktáza (Bsal)	1 μl
Pufr pro restriktázu (2 \times)	2 μl
H ₂ O	doplnit do objemu 20 μl

Postup:

1. Smícháme všechny reagensy, 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:

- a) V průběhu práce udržujeme restriktázu v chladícím stojánku, ihned vracíme do -20 °C!
- b) 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
ATGAATAAAGCAGTAGAACAAGCAAGTAATGCATTAGGTCAAGGATTTTCAGCTATGGTATGGCATCA
AGTATTAGTAGGGTTAGGGTTTATTTTATTAGGATTGGTATTATCTTTACTGGTTTGGGTATTAGTAA
AAAAATTCCATGTACCTTTTAATCACCCGACAGCTTTTGTAGTGTACTCAATTATGTTAGTGAGTATT
GTTGCTAGTTTTATTTGGGGCGGTTTACATGTAATTAACCCGTGAGTATTATGCTATTTTAGAACTTAA
AGGTTTTATAAAGTAG
```

Sekvence spaceru

CTAATACTTGATGCCATACCATAGCTGAAAATCCT

Oligonukleotidy

CR_812_Cas10_F:

GTTACCGATCGATACCCACCCCGAAGAAAAGGGGACGAGAACCTAATACTTGATGCCATACC
ATAGCTGAAAATCCTG

CR_812_Cas10_R:

AATTCAGGATTTTCAGCTATGGTATGGCATCAAGTATTAGGTTCTCGTCCCCTTTTCTTCGG
GGTGGGTATCGATCG

6. Spojení oligonukleotidů a ligace

Přiložení mezerníků:**Reagenční směs:**1 μ l oligo I (100 μ M)1 μ l oligo II (100 μ M)5 μ l 10X T4 Ligační pufr (NEB)1 μ l T4 Polynukleotid kináza (NEB)42 μ l ddH₂OFinální objem = 50 μ l

1. Smícháme reagenie a inkubujeme 1 hodinu v termocykleru při teplotě 37 °C.
2. Zastavíme běh a přidáme 0,5 μ l 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 1 μ l 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 rozmraznout 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. Používáme 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 MgCl_2)
1,5-2,5 μl	25mM MgCl_2 solution
0,5 μl	10 mM dNTPs – (ze zásobních roztoků NTP ředěním v nuclease-free H_2O)
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 H_2O 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 $T_m(\text{primers}) - 5\text{ °C}$ (45-72 °C)/30 s
4. Extension 72 °C - 1 min/kb

Kroky 2 až 4 opakujeme 30 - 35 krát

5. Final extension 72 °C/5 min
6. Hold 4 °C

Vždy použijeme pozitivní kontrolu (templátová DNA pro originální amplifikaci inzertu, pro ověření 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 mikrozkmavek (5 ng – 2 µg ne ve větším objemu než 20µl). 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 mikrozkmavky vhodného objemu.
7. Inkubovat 1 h./37°C/250 rpm. Vyšet 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 μ l 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.