

Úloha 3: Editace septa u *E.coli* pomocí systému CRISPR/Cas9 – seznámení s vektorem pdCas, úprava vektoru pro editaci septa v *E.coli*

1. Jaká je funkce genu *ftsZ* u *E. coli*, a jaký fenotypový projev očekáváte po vyřazení jeho funkce?

Geny *ftsA-ftsZ* se účastní regulace tvorby septa u *E. coli*. Před vlastním rozdělením buňky dochází k hromadění proteinů účastnících se tvorby septa ve středu buňky. Struktura se nazývá „Z-ring“. Z-ring slouží jako kostra pro 20 dalších známých proteinů. Celý tento komplex se nazývá „divisome“. Samotný „Z-ring“ je tvořen minimálně šesti proteiny, včetně filamentárního proteinu FtsZ a membránových proteinů FtsA a ZipA. Buněčný obsah proteinu FtsZ musí být regulován. Jeho nedostatečná nebo naopak nadbytečná exprese vede k tvorbě buněk vláknitého tvaru s nadbytečným počtem kopií bakteriálního chromozomu. Takováto změna exprese je pro buňky *E. coli* letální.

2. Popište jednotlivé komponenty, které jsou nutné pro vytvoření fungujícího CRISPR/Cas9 vektoru pro editaci prokaryotických genomů.

i) expresní vektor se schopností se replikovat v buňkách *E. coli*

ii) vhodný selekční marker na vektoru pro možnou selekci úspěšných transformant

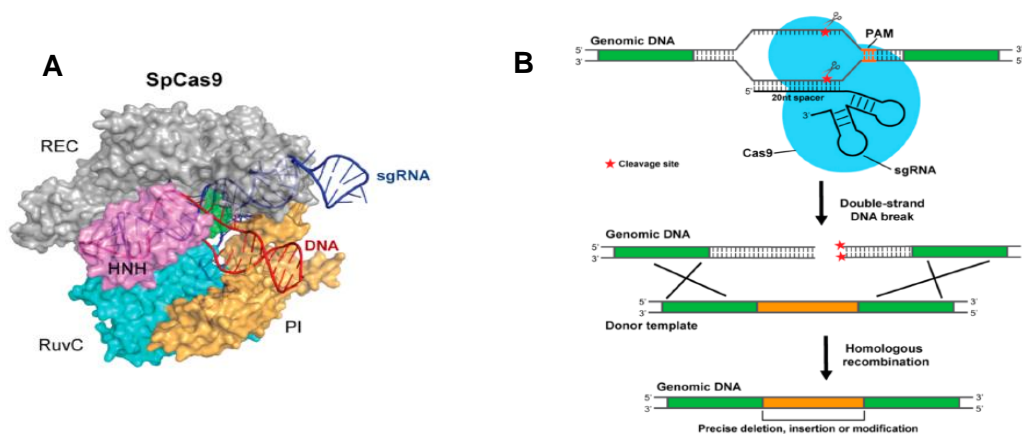
iii) pro expresi je ve vektoru nezbytná přítomnost regulačních sekvencí pro transkripci (promotor, terminátor) a translaci (RBS).

iv) vektor musí dále obsahovat tyto složky CRISPR/Cas9 systému: nukleáza Cas9 (v našem případě bez katalytické domény, pouze pro umlčení exprese genu, gRNA – obsahuje sekvenci mezerníku (crRNA) cílícího na upravovanou oblast, tracrRNA - krátká RNA tvořící komplex s crRNA navádějící Cas9 protein k cílovému místu editace

3. Z jakých funkčních domén se skládá Cas9 endonukleáza?

Nukleáza Cas9 se skládá ze dvou funkčních domén. Oblast s nukleázovou aktivitou (NUC) a oblast s rozpoznávací funkcí (REC) tvořená α -helix (**Obr. 1A**). Oblast NUC obsahuje tři domény: i) HNH nukleázová doména štěpící cílový (komplementární) řetězec DNA, ii) RuvC nukleázová doména štěpící „nontarget“ řetězec (nekomplementární) DNA, iii) Oblast REC obsahuje region rozpoznávající komplex tvořený gRNA/cílová DNA sekvence (**Obr. 1B**). Pro CRISPR/Cas9 je navíc nutná přítomnost PAM sekvence tzv. protospacer-adjacent motiv zajišťující specifické navedení Cas9 k cílové DNA sekvenci. PAM sekvence musí být součástí cílové sekvence DNA.

Obr. 1. Struktura proteinu Cas9. A. Struktura Cas9 proteinu *Streptococcus pyogenes*, **B.** Mechanismus působení CRISPR/Cas9 systému.



4. Navrhněte oliga pro vložení mezerníku do upraveného vektoru pdCas tak, aby mezerník cílil na gen *ftsZ*. V sekvenci genu *ftsZ* barevně znázorněte: a. sekvenční oblast na kterou cílí vámi navržený mezerník, b. PAM sekvenci.

Je nutné nejprve najít v naší cílové sekvenci PAM sekvenci (NGG) v blízkosti 3' konce editovaného genu, aby bylo možné expresi genu zastavit co nejdříve a nevznikaly potenciálně funkční zkrácené produkty.

V sekvenci je vyznačena oblast, která byla použita pro mezerník využívaný v našem konstruktu s označením pdCas9_bact_T7p.

```
>NC_000913.3:105305-106456 Escherichia coli str. K-12 substr. MG1655, complete genome
ATGTTTGAACCAATGGAACCTACCAATGACGCGGTGATTAAGTTCATCGGCGTCGGCGGGCGGCGGTAATGCTGTTG
AACACATGGTGC GCGAGCGCATTGAAGGTGTTGAATTCCTCGCGGTAAATACCGATGCACAAGCGCTGCGTAAACAGC
GGTTGGACAGACGATTCAAAATCGGTAGCGGTATCACC AAAGGACTGGGCGCTGGCGCTAATCCAGAAGTTGGCCGCAAT
GCGGCTGATGAGGATCGCGATGCATTGCGTGC GCGCGCTGGAAGGTGCAGACATGGTCTTTATTGCTGCGGGTATGGGTG
GTGGTACCGGTACAGGTGCAGCACCAGTCGTCGCTGAAGTGGCAAAGATTTGGGTATCCTGACCGTTGCTGTCGTCAC
TAAGCCTTTCAACTTTGAAGGCAAGAAGCGTATGGCATTCGCGGAGCAGGGGATCACTGAACTGTCCAAGCATGTGGAC
TCTCTGATCACTATCCCGAACGACAAACTGCTGAAAGTTCTGGGCCGCGGTATCTCCCTGCTGGATGCGTTTGGCGCAG
CGAACGATGTACTGAAAGGCGCTGTGCAAGGTATCGCTGAACTGATTACTCGTCCGGGTTTGATGAACGTGGACTTTGC
AGACGTACGCACCGTAATGTCTGAGATGGGCTACGCAATGATGGGTTCTGGCGTGGCGAGCGGTGAAGACCGTGCGGAA
GAAGCTGCTGAAATGGCTATCTCTTCTCCGCTGCTGGAAGATATCGACCTGCTGGCGCGCGGCGTGTGGTTAACA
TCACGGCGGGCTTCGACCTGCGTCTGGATGAGTTCGAAACGGTAGGTAACACCATCCGTGCATTTGCTTCCGACAACGC
GACTGTGGTTATCGGTACTTCTCTTGACCCGGATATGAATGACGAGCTGCGCGTAACCGTTGTTGCGACAGGTATCGGC
ATGGACAAACGTCTGAAATCACTCTGGTGACCAATAAGCAGGTTTCAGCAGCCAGTGATGGATCGCTACCAGCAGCATG
GGATGGCTCCGCTGACCCAGGAGCAGAAGCCGGTTGCTAAAGTCGTGAATGACAATGCGCCGCAAACCTGCGAAAGAGCC
GGATTATCTGGATATCCAGCATTCCTGCGTAAGCAAGCTGATTAA
```

Oligo 1_F: 5' GAAACTGGAAGATATCGACCTGTC 3'

Oligo 2_R: 5' AAACGACAGGTCGATATCTCCAG 3'

5. V bodech popište další kroky klonování až po funkční test pdCas.

```
5'...GGTCTC(N)1...3'
3'...CCAGAG(N)5...5'
```

Nejprve vektor pdCas9_bact_T7p štěpíme RE *BsaI*:

Naštěpený vektor zkontrolujeme pomocí ELFO a vyřezeme ho z gelu. Vektor pak přečistíme. Takto se zbavíme nenaštěpených fragmentů. Druhou možností je vektor po štěpení ihned defosforylovat, zabráníme tak znovuspojení štěpeného vektoru.

Připravíme si kompetentní buňky *Escherichia coli* DH5α pro transformaci upraveného vektoru dle protokolu.

Do naštěpeného vektoru budeme vkládat nasyntetizované oliga mezerníku cílíciho do sekvence genu *ftsZ*. Oligo je nutné spojit. Připravíme si směs olig, T4 ligační pufr, T4 polynukleotid ligázu dle návodu. Krátce zahřejeme na 95°C (denaturace) a následně pomalu ochlazujeme, tak aby došlo k spojení olig (renaturace).

Následně oliga a štěpený vektor spojíme ligací.

Takto připravený vektor transformujeme do buněk *Escherichia coli* DH5 α . Vektor izolujeme a připravený konstrukt ověříme sekvenací.

Ověřený konstrukt potom přeneseme transformací do expresních buněk např. *Escherichia coli* BL21.

V dalším kroku provedeme indukci exprese mezerníkové sekvence pomocí anhydrid-tetracyklinu. Nezapomeneme buňky s konstruktem nejprve inkubovat ve vhodném selekčním médiu, aby došlo k namnožení vektoru v buňkách (v našem případě se jednalo o přidavek chloramfenikolu).

Funkční test je proveden pomocí konfokální mikroskopie, buňky jsou nejprve fixovány na sklíčku plamenem a následně barveny bazickým fuchsinem.

- 6. V laboratoři máte 2 vektory pCasSA a p Δ Cas_bakteria, které jste používali na jiné experimenty. Vytvořte jeden vektor, který by obsahoval gen pro Δ Cas9 protein a gRNA, která by cílila na libovolný gen *E. coli*. Využijte k sestavení Vašeho vektoru informace, které jste obdrželi v teoretické části úlohy a které jsou uvedeny níže.**

Rozepište v jednotlivých krocích, jak budete při vytváření vektoru postupovat. Cílem je vytvořit plazmid, který bude schopný replikace a exprese v *E. coli* a bude obsahovat místo pro začlenění mezerníkové sekvence pro gRNA (aby se dalo měnit), dCas9 a další komponenty nezbytné pro správnou funkci vektoru. Promyslete, co je vhodnější přesunout do kterého vektoru a zda všechny expresní prvky patří organizmu, v kterém se bude celý systém exprimovat. Pro vizualizaci můžete využít volně dostupný program *SnapGene Viewer* (<https://www.snapgene.com/snapgene-viewer/>)

Využijte k úpravě tyto dva plazmidy:

pdCas9-bacteria: <https://www.addgene.org/44249/>

pCasSA: <https://www.addgene.org/98211/>

Námi upravený vektor vychází z vektoru pdCasSA, který byl původně vytvořen pro umlčování genů u druhu *Staphylococcus aureus* (Chen *et al.*, 2017). Tento vektor bylo nutné upravit tak, aby se naklonované části exprimovaly v buňkách *E. coli*. Do vektoru byl v první fázi vložen indukovatelný promotor T7, terminator a RBS pro translaci (vše pro transkripci a translaci v *E. coli*).

Součástí vektoru je potom oblast pro vkládání mezerníkové oblasti restriktázou *BsaI*. Nejprve jsme ale celou kazetu pro vkládání mezerníkové sekvence museli do vektoru vložit níže popsáním způsobem.

Sekvence oblasti plazmidu pro vkládání CRISPR mezerníkové sekvence (vkládá se restriktázou *BsaI*) má tyto hlavní části:

promotor.....**ATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAA**.....sgRNA

Kompletní sekvence námi vložené kazety do našeho vektoru pdCas9_bact_T7p:

Kazeta ve směru 5-3:

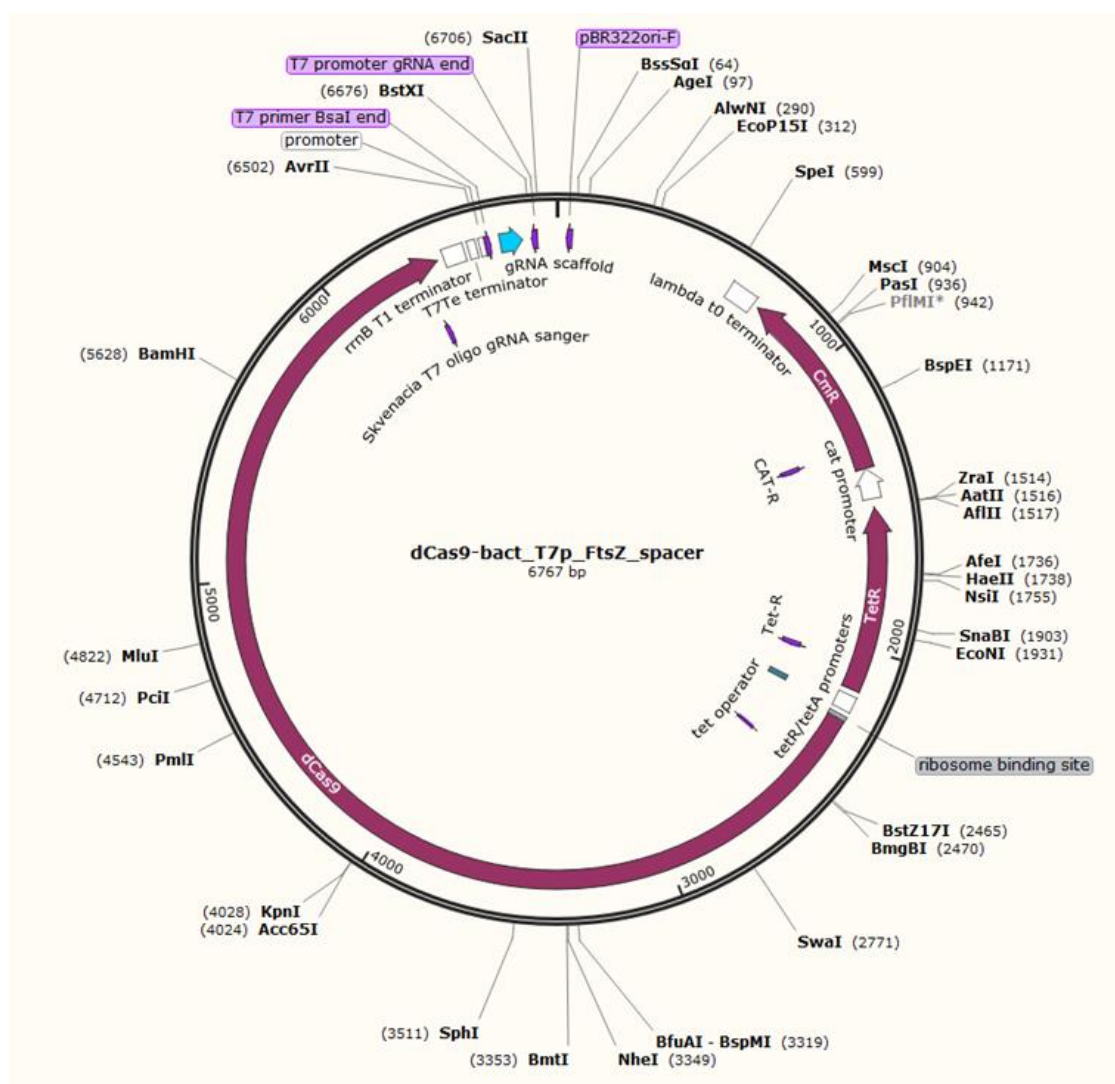
TCAT**CCTAGG**TAATACGACTCACTATAGGGAATATACAGGGGATTATATATA**ATGGAAACGAGACCATTGGTCTCAGTTTTAGAGCTAGAAA**TAGCAAGTTAAAATAAGGCTAGTCCGTTATCAACTTGAAAAAGTGGCACCGAGTCGGTGCTTTTTTTGAGATCTGTCCATACCCATGGTCTAGAATGCTCGAGTCAGAAA**CCGCGG**
GAGA

Na koncích kazety jsou restriční místa *AvrII* CCTAGG a *SacII* CCGCGG, kterými byla kazeta vložena do vektoru. Následně byl pomocí *BsaI* restriktázy vložen mezerník cílící na gen *ftsZ* (do oblasti zvýrazněné žlutě).

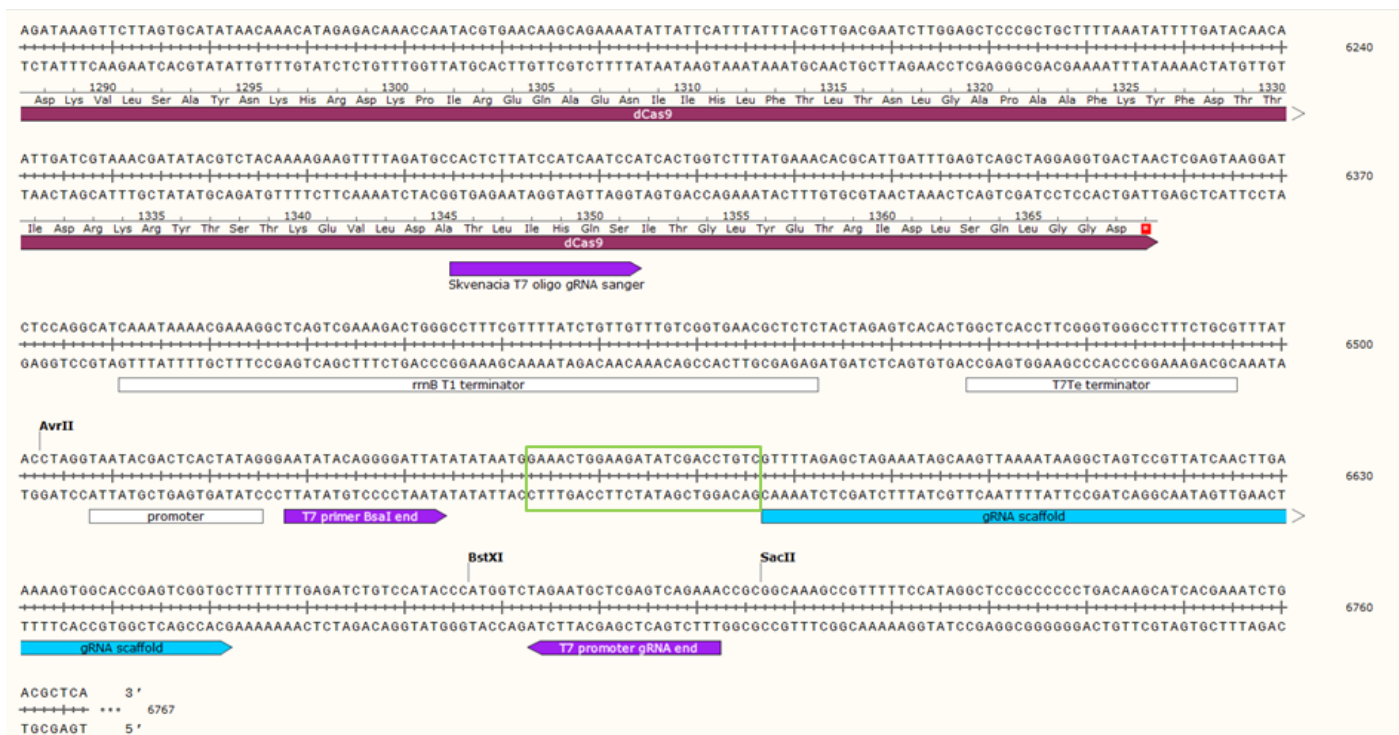
Mapa námi vytvořeného vektoru **pdCas9_bact_T7p** (Obr. 2).

Obr. 2: Vektor pΔCas9_T7 s naklonovaným mezerníkem pro editaci tvorby septa cílicí na gen *ftsZ*. A. Schématická mapa vektoru s hlavními funkčními částmi. **B.** Detail sekvence vkládaného mezerníku (zelený obdélník) a gRNA.

A.



B.

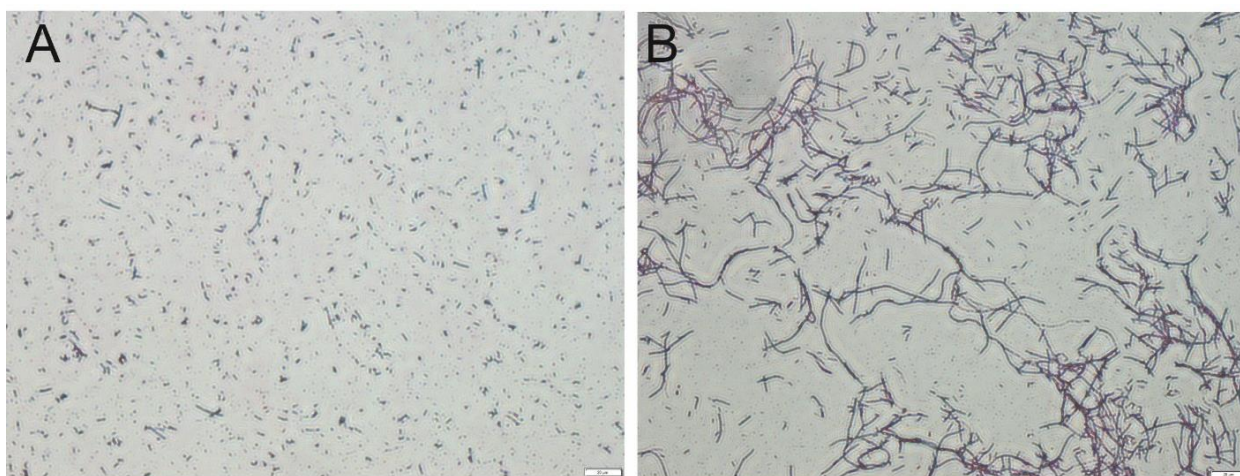


----- otázky k praktické části -----

7. Doložte a popište foto z mikroskopu.

V mikroskopu po indukcii exprese editačního systému a obarvení buněk bazickým fuchsinem je možné pozorovat buňky *E. coli* filamentárního tvaru (**Obr. 3B**). Protože tato změna je letální, je nutné mikroskopii provádět bezprostředně po indukcii.

Obr. 3: Funkční ověření editačního systému CRISPR/Cas9 u *E. coli*. A. Buňky *E. coli* bez editace tvorby septa. B. Buňky *E. coli* po umlčení genu *ftsZ*.



A. buňky *E. coli* bez editace septa, **B.** buňky *E. coli* po umlčení genu *ftsZ* (světelný mikroskop, barveno bazickým fuchsinem).