

LuK-tutkielma

***blaTEM-1C- ja
blaTEM-52B-antibioottiresistenssigeenien
sammuttaminen CRISPR-Cas9-systeemillä***

Tiia Eklund ja Hanna Elomaa



**JYVÄSKYLÄN YLIOPISTO
UNIVERSITY OF JYVÄSKYLÄ**

Bio- ja ympäristötieteiden laitos

Solu- ja molekyylibiologia

27.4.2018

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Tekijät: Tiia Eklund ja Hanna Elomaa
Tutkielman nimi: *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-antibioottiresistenssigeenien sammuttaminen CRISPR-Cas9-systeemillä
English title: Turning off *blaTEM-1C* and *blaTEM-52B* antibiotic resistance genes by using CRISPR-Cas9 system
Päivämäärä: 27.4.2018 **Sivumäärä:** 20+3

Laitos: Bio- ja ympäristötieteiden laitos
Oppiaine: Solu- ja molekyylibiologia
Tutkielman ohjaajat: Matti Jalasvuori, Reetta Penttinen ja Pilvi Ruotsalainen

Tiivistelmä:

Bakteeri-infektiot hoidetaan nykyään pääasiassa antibiooteilla. Antibioottien käytön aiheuttama valintapaine on johtanut antibioottiresistenttien bakteereiden runsastumiseen, mikä hankaloittaa infektioiden hoitoa. Antibioottiresistenssi onkin maailmanlaajuinen kasvava ongelma. β -laktamaasit ovat entsyymejä, jotka hajottavat β -laktamirenkaan estäen näin β -laktami-antibiootin toiminnan. β -laktami-antibiootit, kuten penisilliinit ja kefalosporiinit, ovat yleisesti käytettyjä antibiootteja, joiden käyttö on aiheuttanut β -laktamaaseja tuottavien laajakirjoisten β -laktamaasibakteerien (ESBL, *engl. extended spectrum β -lactamase*) yleistymistä. ESBL-bakteerit tuottavat β -laktamaaseja, jotka antavat laajakirjoisen resistenssin useita β -laktameja vastaan. CRISPR-Cas9-systeemi on alun perin bakteerien luonnollinen puolustusmekanismi vierasta DNA:ta vastaan. CRISPR-Cas9-systeemiä hyödynnetään geenien katkaisemisessa targetoimalla kohdegeeni sille komplementaarisen crRNA-sekvenssin (*engl. CRISPR RNA*) avulla. Kohdegeeni katkaistaan Cas9-entsyymillä avulla, jolloin geenin transkriptio estyy. Tässä työssä oli tavoitteena katkaista pEC3- ja pEC15-plasmideissa olevat *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-antibioottiresistenssigeenit CRISPR-Cas9-systeemillä. Kohdegeenit tuottavat ampicilliinia hajottavia TEM-tyyppin β -laktamaaseja ja niiden sekvenssit eroavat toisistaan muutaman aminohapon osalta. Tavoitteena oli tutkia, kuinka hyvin TEM-entsyymien konservoitunutta kohtaa targetoivaksi suunniteltu crRNA-sekvenssi toimii. *E. coli* BL21 Gold (pEC3)- ja BL21 Gold (pEC15)-bakteerikantoihin transformoitiin CRISPR-Cas9-systeemin sisältävä crRNA-plasmidi. Systeemin toimiessa Cas9-entsyymi pilkkoi resistenssigeenin. Kontrollisoluihin transformoitiin kontrolliplasmidi, josta puuttui crRNA-sekvenssi. Systeemin tehokkuutta arvioitiin vertaamalla crRNA:n sisältävien solujen ja kontrollisolujen bakteerimääriä antibioottialtistuksen jälkeen. CRISPR-Cas9-systeemin crRNA:lla kohdennettiin hyvin molempia *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-resistenssigeenejä. Solut menettivät ampicilliiniresistenssin ja kuolivat ampicilliiniselektiomaljalla. *blaTEM-52B*-resistenssigeenin katkaisemisessa saavutettiin hieman parempi tulos kuin *blaTEM-1C*-resistenssigeenin katkaisemisessa, sillä pEC3-linjan solumäärä laski 10^2 cfu/ml ja pEC15-linjan 10^3 cfu/ml. Pesäke-PCR:llä ja agarosigeelielektroforeesilla (AGE, *engl. agarose gel electrophoresis*) tarkistettiin, oliko crRNA pysynyt eloonjääneissä transformoiduissa soluissa. Tuloksista huomattiin, että suurimmasta osasta bakteereista crRNA oli kadonnut mahdollisesti jonkun mutaation seurauksena. Näytteissä, joissa crRNA oli tallella, CRISPR-Cas9-systeemi ei ollut jostain muusta syystä kuin puuttuvan crRNA:n vuoksi toiminut. Vielä tarvitaan lisätutkimusta, jotta voidaan selvittää minkä vuoksi käytetyn crRNA:n avulla ei saatu poistettua ampicilliiniresistenttiyttä kokonaan bakteerikasvustoissa.

Avainsanat: ampicilliiniresistenssi, ESBL, CRISPR-Cas9, *blaTEM-1C*, *blaTEM-52B*, β -laktamaasi

University of Jyväskylä

Abstract of Bachelor's Thesis

Faculty of Mathematics and Science

Authors: Tiia Eklund ja Hanna Elomaa
Title of thesis: Turning off *blaTEM-1C* and *blaTEM-52B* antibiotic resistance genes by using CRISPR-Cas9 system
Finnish title: *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-antibiottiresistenssigeenien sammuttaminen CRISPR-Cas9-systeemillä
Date: 27.4.2018 **Pages:** 20+3

Department: Department of Biological and Environmental Science
Chair: Cell and Molecular Biology
Supervisors: Matti Jalasvuori, Reetta Penttinen and Pilvi Ruotsalainen

Abstract:

Antibiotics are nowadays the main treatment against bacterial infections. Antibiotic resistance is an increasing problem and it complicates the treatment of infections. Especially β -lactams, such as penicillins and cephalosporins, are commonly consumed antibiotics and their use has enhanced the spreading of ESBL-bacteria. Those bacteria have resistance against many β -lactam antibiotics. The reason is that they produce β -lactamase enzymes which can degrade various β -lactams. CRISPR-Cas9 system is a natural bacterial defense mechanism against foreign DNA. The system can be used for genetic modification. The CRISPR RNA (crRNA) of CRISPR-Cas9 system binds complementary to the target gene. The target gene is then cut by Cas9 enzyme, resulting in the interruption of the transcription of the gene. The aim of this experiment was to degrade ampicillin resistance genes *blaTEM-1C* (pEC3) and *blaTEM-52B* (pEC15) by using a targeted CRISPR-Cas9 system. The pEC3 and pEC15 plasmids were in *E. coli* BL21 Gold host bacteria. These host bacteria were transformed with a crRNA-plasmid expressing CRISPR-Cas9 system. Transformed bacteria were cultured in ampicillin selection plate. When the system was functional, the expression of resistance genes was stopped and the bacteria died in the ampicillin selection. The control bacteria were transformed with a control plasmid without crRNA. By comparing the amount of viable bacteria transformed with crRNA or control plasmid, the efficiency of CRISPR-Cas9 system was estimated. According to our results, the bacteria quantity of BL21 Gold (pEC3) dropped off 10^2 cfu/ml and BL21 Gold (pEC15) 10^3 cfu/ml. These results indicate that the crRNA of the CRISPR-Cas9 system cut efficiently both targeted resistance genes, but slightly better the *blaTEM-52B* gene. These cells lost the resistance to ampicillin and did not survive in ampicillin selection. Viable cells were analyzed by using colony PCR and agarose gel electrophoresis (AGE) to see if crRNA was still present in these cells. The results showed that crRNA was lost from the majority of samples probably as a consequence of mutation. Some of the transformed samples still contained crRNA, which indicate that the CRISPR-Cas9 system did not work in these cells for some other reason than missing crRNA. It is necessary to find out why CRISPR-Cas9 system with crRNA used in this experiment did not target all the bacteria carrying pEC3 and pEC15 plasmids.

Keywords: ampicillin resistance, ESBL, CRISPR-Cas9, *blaTEM-1C*, *blaTEM-52B*, β -lactamase

SISÄLLYSLUETTELO

1. JOHDANTO.....	6
1.1. ESBL-ominaisuus.....	7
1.2. CRISPR-Cas9-systeemi.....	9
1.3. Työn tarkoitus.....	11
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT.....	11
2.1. Työssä käytetyt bakteerikannat ja plasmidit.....	11
2.2. Sekvenssilinjaus.....	13
2.3. Bakteerien kasvatus.....	14
2.4. Transformaatio.....	14
2.5. Transformoitujen solujen maljaus.....	15
2.6. Bakteeripesäkkeiden laskeminen ja puhdasviljelmä.....	16
2.7. Pesäke-PCR ja AGE.....	17
3. TULOKSET.....	18
3.1. Sekvenssilinjaus.....	18
3.2. Bakteerien määrä nestekasvatuksissa.....	18
3.3. PCR ja AGE.....	20
4. TULOSTEN TARKASTELO.....	22
4.1. Sekvenssilinjaus.....	22
4.2. Kasvatusmaljat: Elektroporaation ja antibioottien vaikutukset.....	23
4.3. Pesäke-PCR ja AGE.....	24
4.4. crRNA:n avulla onnistuttiin sammuttamaan blaTEM-resistenssigeenit.....	25
KIITOKSET.....	26
LÄHDELUETTELO.....	27

LYHENTEET

AGE	Agaroosigeelielektroforeesi (<i>engl. agarose gel electrophoresis</i>)
cfu	Pesäkkeen muodostava yksikkö (<i>engl. colony forming unit</i>)
crRNA	<i>engl. CRISPR RNA</i>
ESBL	Laajakirjoinen β -laktamaasi (<i>engl. extended spectrum β-lactamase</i>)
HGT	Horisontaalinen geeninsiirto (<i>engl. horizontal gene transfer</i>)
PAM	PAM-sekvenssi (<i>engl. protospacer adjacent motif</i>)
TracrRNA	Transaktiivinen CRISPR RNA (<i>engl. trans-activating CRISPR RNA</i>)

1. JOHDANTO

Bakteerien aiheuttamia infektioita hoidetaan tällä hetkellä lähes ainoastaan antibiooteilla. Bakteerien jatkuvasti laaja-alaisemmaksi ja tehokkaammaksi kehittyvä kyky hajottaa antibiootteja on alkanut kuitenkin viime vuosina tuottaa suuria ongelmia sairaanhoidon piirissä. Yhä useammassa tapauksissa antibiootit eivät enää tehoa bakteri-infektioihin. Antibioottien heikkous on myös se, että ne tappavat epäspesifisesti useita eri bakterilajeja, myös elimistölle hyödyllisiä, inhiboimalla solun kasvuun liittyviä toimintoja (Lange ym., 2014). Antibioottien käyttäminen kohdistaa bakteripopulaatioihin voimakkaan evolutiivisen valintapaineen, joka suosii antibiootteja hajottavia entsyymejä tuottavia yksilöitä (ks. yleiskatsaus Davies ja Davies, 2010). Hallin ja Barlowin (2004) mukaan antibioottiresistenssi ei ole uusi ilmiö, vaan sitä on ollut olemassa maapallolla yhtä kauan kuin luontaisia antibiootteja, mutta mainitun valintapaineen vuoksi resistenssi on yleistynyt. Antibiooteille yritetäänkin jatkuvasti kehittää uusia toimivampia vaihtoehtoja.

Wintersdorffin ym. (2016) mukaan antibioottiresistenssi kehittyi bakteereissa mutaatioiden seurauksena ja leviää yhteisössä horisontaalisen geeninsiirron (HGT, *engl. horizontal gene transfer*) avulla bakteerista toiseen. Resistenssigeeni siirtyy myös solunjakautumisessa seuraavalle sukupolvelle, mutta tällainen vertikaalinen geeninsiirto ei ole yhtä tehokasta kuin HGT. HGT:lla tarkoitetaan bakteerin kykyä ottaa ympäristöstä geneettistä materiaalia sisäänsä ja se voi tapahtua konjugaation, transformaation tai transduktion avulla (Stokes ym., 2011). Geneettinen materiaali on yleensä peräisin bakteriofagista tai toisesta bakteerista, joka ei välttämättä ole sukua vastaanottavalle bakteerille (ks. yleiskatsaus Brolund, 2014 ja Wintersdorff ym., 2016). Kyky vaihtaa geneettistä materiaalia muiden bakteerien kanssa yli lajirajojen tehostaa geenien leviämistä bakteripopulaatiossa merkittävästi. Antibioottiresistenssin leviämisen kannalta olennaisin HGT:n muoto on konjugaatio, jossa luovuttajabakteerista siirtyy geneettistä materiaalia vastaanottajabakteeriin piluksen tai adheesiovuorovaikutuksen avulla (Wintersdorff ym., 2016).

1.1. ESBL-ominaisuus

Nykyään sairaanhoidossa käytetään paljon β -laktaami-antibiootteja lähinnä virtsateiden, keuhkojen ja verenkierron bakteeritulehduksien hoidossa, sekä ennaltaehkäisemään leikkauksen aikana syntyviä infektioita (ks. yleiskatsaus Brolund, 2014). β -laktaameihin kuuluvat mm. penisilliinit, kefalosporiinit, monobaktaamit ja karbapeneemit (Pitout ym., 2005). Bakteerien keskuudessa viime aikoina lisääntyneen antibioottiresistenssin vuoksi etenkin karbapeneemit ovat olleet useissa infektiotapauksissa tähän mennessä ainoa toimiva vaihtoehto, mutta niiden runsastunut käyttö on johtanut myös karbapeneemeille resistenssien kantojen syntyyn (Nordmann ym., 2012). Tällä hetkellä huolenaiheena ovat erityisesti ESBL-ominaisuutta (*engl. extended spectrum β -lactamase*) kantavat bakteerit, jotka tuottavat β -laktaameja hajottavia β -laktamaasi-entsyymeitä. β -laktamaasit katalysoivat hydrolysointireaktiota, jossa β -laktaamit hajoavat toimimattomiksi molekyyleiksi (Eliopoulos ja Bush, 2001). Reaktiossa β -laktaamien rakenteessa olevaan β -laktaamirenkaaseen liittyy vesimolekyyli, mikä katkaisee rengasrakenteen sidoksen (Eliopoulos ja Bush, 2001).

β -laktamaasit voidaan luokitella joko funktion tai rakenteen mukaan (Bush ja Jacoby, 2010). Funktion perusteella ne jaetaan kapea- ja laaja-alaisen hydrolysointikyvyn entsyymeihin. Schultzin ym. (2012) mukaan kapea-alaiset entsyymit, kuten kefalosporinaasit, pystyvät hajottamaan vain muutamaa eri β -laktaamia. Laaja-alaiset β -laktamaasit, kuten edellä mainitut ESBL-entsyymit, taas hydrolysoivat lukuisia eri β -laktaameja.

ESBL-ominaisuutta on havaittu eniten enterobakteereilla, jotka aiheuttavat pääasiassa tulehduksia verenkierrossa, virtsa- ja hengitysteissä, keskushermostossa sekä ruoansulatuskanavassa. Sitä on etenkin *Klebsiella pneumoniae*- ja *Escherichia coli*-bakteerilajeilla, mikä on huolestuttavaa koska ihmisen suolistossa on tavallisesti paljon *E. coli*-bakteereita. Jos suolistoon päätyy tai siellä kehittyy mutaatioiden seurauksena ESBL-ominaisuutta kantavia *E. coli*-bakteereita, niiden aiheuttama mahdollinen tulehdus on usein kohtalokas isännälle antibioottien ollessa tehottomia.

Suoliston on havaittu olevan erityisen hyvä ympäristö bakteerien väliselle konjugaatiolle, mikä edesauttaa voimakkaasti ESBL-ominaisuuden leviämistä elimistössä (ks. yleiskatsaus Brolund, 2014).

ESBL-entsyymejä voidaan luokitella eri tavoin. Giske ym. (2009) esimerkiksi luokittelevat ESBL-entsyymit kolmeen ryhmään, $ESBL_A$, $ESBL_M$ ja $ESBL_{CARBA}$. Työssä käytetyt *blaTEM-1C* ja *blaTEM-52B*-resistenssigeenit tuottavat TEM-entsyymejä, jotka kuuluvat $ESBL_A$ -ryhmään. Tähän ryhmään kuuluvat lisäksi CTX-M- ja SHV-entsyymit. Nykyään TEM-entsyymistä on lukuisia erilaisia versioita, jotka ovat kaikki kehittyneet alun perin TEM-1- ja TEM-2-entsyymeistä aminohapposubstituutiomutaatioiden kautta (Pai ym., 1999). Bielakin ym. (2011) mukaan TEM-1- ja TEM-2-entsyymejä ei katsota luettavaksi varsinaisesti ESBL-entsyymeihin, koska ne ovat antibioottihajotuskyvyltään kapea-alaisia. Ne kykenevät hydrolysoimaan vain penisilliinejä ja ensimmäisen sukupolven kefalosporiineja, mutta eivät oksiiimikefalosporiineja, joiden rakenteessa on jäykkä oksiiimi-substituenttiryhmä suojaamassa β -laktaamirengasta (Shaikh ym. 2015 ja ks. yleiskatsaus Livermore, 2008). Mutaatiot TEM-1- ja TEM-2-entsyymien aktiivisissa kohdissa ovat mahdollistaneet myöhemmin kehittyneiden TEM-entsyymien laajemman β -laktaamien hajotuskapasiteetin (Eliopoulos ja Bush, 2001). Toinen työn kohdegeeneistä, *blaTEM-52* (variaatiot *blaTEM-52B* ja *blaTEM-52C*), on yksi yleisimmistä *blaTEM*-geeneistä ja se löydettiin ensimmäisen kerran Ranskassa vuonna 1998 (Carattoli, 2009 ja Poyart ym., 1998). Sen koodaama entsyymi on kehittynyt TEM-1-entsyymistä kolmen aminohapposubstituution, Glu104 \rightarrow Lys, Met182 \rightarrow Thr ja Gly238 \rightarrow Ser, seurauksena ja se eroaa *blaTEM-1*:n sekvenssistä kolmen hiljaisen pistemutaation osalta (Pai ym., 1999).

Brolundin (2014) mukaan ESBL-bakteerit ovat usein multiresistenttejä monia antibiootteja vastaan. ESBL-geeni sijaitsee yleensä bakteerin sytoplasmassa olevassa plasmidissa, joka on itsenäisesti replikoituva kaksijuosteinen DNA-rengas erillään isäntäsolun kromosomista (Nordmann ym., 2012). Brolundin ym. (2013) mukaan plasmideissa on usein resistenssi monia eri β -laktaameja vastaan. Lisäksi niissä voi

olla resistenssigeenejä myös muita antibiootteja, kuten aminoglykosideja tai fluorokinoloneja, vastaan. Monet plasmidit kykenevät siirtymään konjugaatiolla bakteerisolusta toiseen piluksen kautta ja siirtämään näin antibioottiresistenssigeenejä bakteeriyhteisössä edelleen. Konjugatiivisilla plasmideilla on usein laaja isäntäskala eli ne pystyvät siirtymään monien eri isäntien välillä (Pérez-Mendoza ja de la Cruz, 2009).

1.2. CRISPR-Cas9-systeemi

CRISPR-alue löydettiin bakteerin genomista ensimmäisen kerran vuonna 1989, mutta tutkimuskäyttöön systeemi saatiin muokattua onnistuneesti vasta vuonna 2012 useiden eri tutkijoiden yhteistyönä (Lander, 2016). CRISPR-systeemi on bakteerien ja arkeonien luontainen immuunipuolustusjärjestelmä, jonka avulla mikrobit tuhoavat niihin tunkeutuvaa vierasta DNA:ta (Lander, 2016). Kun bakteeriin tunkeutuu ensimmäisen kerran esimerkiksi tietyn bakteriofagin DNA:ta, bakteeri tallentaa genomissaan olevaan CRISPR-alueeseen sekvenssifragmentteja viruksen genomista. Fragmenteista muodostuu spacer-alueita, joita erottaa toisistaan toistojaksot. CRISPR-lokukseen kuuluu lisäksi leader-sekvenssi, Cas-proteiineja ja transaktiivinen crRNA (tracrRNA, *engl. trans-activating CRISPR RNA*) (Lander, 2016). Landerin (2016) ja Nunezin ym. (2016) mukaan Cas1-, Cas2- ja Cns2-proteiinit osallistuvat yhdessä leader-sekvenssin kanssa uusien spacer-alueiden luomiseen ja liittämiseen CRISPR-alueelle.

Kun saman bakteriofagin DNA:ta tunkeutuu uudelleen soluun, CRISPR-systeemi aktivoituu, jolloin bakteriofagin genomia vastaavasta spacer-alueesta ja toistojaksoista transkriboituu esiaste-crRNA (*engl. CRISPR RNA*), joka hybridisoituu tracrRNA:n kanssa komplementaaristen sekvenssien kohdalta. Cas9- sekä RNAase III-entsyymin tekemällä entsyymaattisella muokkauksella esiaste-crRNA:sta muodostuu lopullinen crRNA, joka muodostaa kompleksin Cas9-entsyymin ja tracrRNA:n kanssa. TracrRNA on crRNA:n muokkaukselle ja myöhemmin tapahtuvalle kohde-DNA:n katkaisemisen aktivoitumiselle tärkeä komponentti (Sorek ym., 2008, Deltcheva ym., 2011 ja Jinek ym., 2012). Cas9 on

nukleaasientsyymi, jonka tärkeimmät komponentit ovat HNH- ja RuvC-domeenit (Nishimasu ym., 2014). Entsyymin tehtävä on katkaista crRNA:lle komplementaarisen kohde-DNA:n kaksoisjuoste. Tarkemmin Cas9-entsyymin HNH-domeeni katkaisee crRNA:lle komplementaarisen juosteen ja RuvC-domeeni ei-komplementaarisen jättäen juosteisiin tylpät päät (Gasiunas ym., 2012).

CRISPR-Cas9-systeemin heikkous geenien muokkaamisen kannalta on, että se vaatii PAM-sekvenssin (PAM, *engl. protospacer adjacent motif*), jonka täytyy sijaita kolmen emäsparin päässä halutusta katkaisukohtasta komplementaarisessa kohde-DNA-juosteessa (Garneau ym., 2010, Jinek ym., 2012 ja Sternberg ym., 2014). Sen tehtävä on estää bakteerin oman DNA:n pilkkoutuminen ja avustaa CRISPR-Cas9-kompleksia tunnistamaan oikea leikkauskohta kohdesekvenssissä (Jinek ym., 2012). Cas9-proteiini tunnistaa PAM-sekvenssin, jolloin crRNA liittyy komplementaarisesti kohde-DNA-juosteeseen (Sashital ym., 2011 ja Jinek ym., 2012). PAM-sekvenssejä löytyy DNA:sta vain tietyistä kohdista ja ne koostuvat yleisesti NGG-sekvenssistä, jossa N tarkoittaa mitä tahansa emästä (Jinek ym., 2012 ja Sternberg ym., 2014).

CRISPR-Cas9-systeemi on huomattavasti tarkempi kuin epäspesifisesti kaikkia bakteereita tappavat antibiootit. Systemistä on olemassa kolme tyyppiä (I, II ja III) (Makarova ym., 2011), joista tyyppi II systeemi on tutkimuskäytössä yleisin (Lander, 2016). Se on rakenteensa vuoksi tehokas ja toimii lukuisissa eri organismeissa (Chylinski ym., 2014). CRISPR-Cas9-systeemillä voidaan katkaista ja muokata geenejä esimerkiksi sammuttamalla tai aktivoimalla niitä ja lisäksi muokata geeniekspression tasoa sekä paikallistaa tunnettuja geenejä (Lander, 2016). Landerin (2016) mukaan tutkimuskäytössä välttämättömiä CRISPR:n komponentteja ovat Cas9, tracrRNA, toistojaksot sekä crRNA/spacer. Genomin muokkaaminen vaatii kohdegeeneille komplementaaristen spacer-sekvenssien kehittämistä. Spacer-sekvenssien avulla CRISPR-Cas9-systeemillä pystytään targetoimaan halutut geenit (Lander, 2016). Spacer-sekvenssi(t) liitetään yhdessä muiden tarvittavien

CRISPR-Cas9-systeemin komponenttien kanssa rekombinanttiplasmidiin, joka viedään kohdesoluun. Kohdesolussa systeemi aktivoituu ja katkaisee kohdegeenin.

Tällä hetkellä CRISPR-Cas9-systeemiä on pyritty hyödyntämään muun muassa antibioottiresistenssi- tai virulenssigeenejä sisältävien bakteerien hävittämisessä (Citorik ym., 2014). Systeemillä pyritään kohdentamaan plasmidissa sijaitseva resistenssigeeni ja inhiboimaan sen transkriptio, jolloin bakteeri menettää resistenssin ja tulee jälleen sensitiiviseksi antibiootille. CRISPR-Cas9:n avulla voidaan myös targetoida bakteerin kromosomaalisia geenejä, mistä seuraa sytotoksisia vasteita solussa ja solukuolema (Citorik ym., 2014).

1.3. Työn tarkoitus

Tämän työn tarkoituksena oli poistaa antibioottiresistenssi bakteereilta CRISPR-Cas9-systeemin avulla. Työssä tutkittiin, onko *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-kohdegeenien ampicilliiniresistenssi mahdollista poistaa katkaisemalla geenit spesifisesti tietyn crRNA-sekvenssin avulla. Työssä käytettiin kahta pEC-kohdeplasmidia, jotka koodasivat mainittuja kohdegeenejä. Sekvenssilinjauksen perusteella oletettiin, että käytetty crRNA targetoi molempien kohdegeenien sekvensseissä tiettyä aluetta, mikä mahdollisti geenien katkaisemisen CRISPR-Cas9-systeemillä. Resistenssin menetys teki bakteerit sensitiivisiksi antibiootille ja ne kuolivat antibioottiselektiomaljalla. Kyseiset geenit koodaavat ampicilliinia hajottavia β -laktamaaseja. Tämän vuoksi ne ovat uhka sairaanhoidolle aiheuttaessaan infektion.

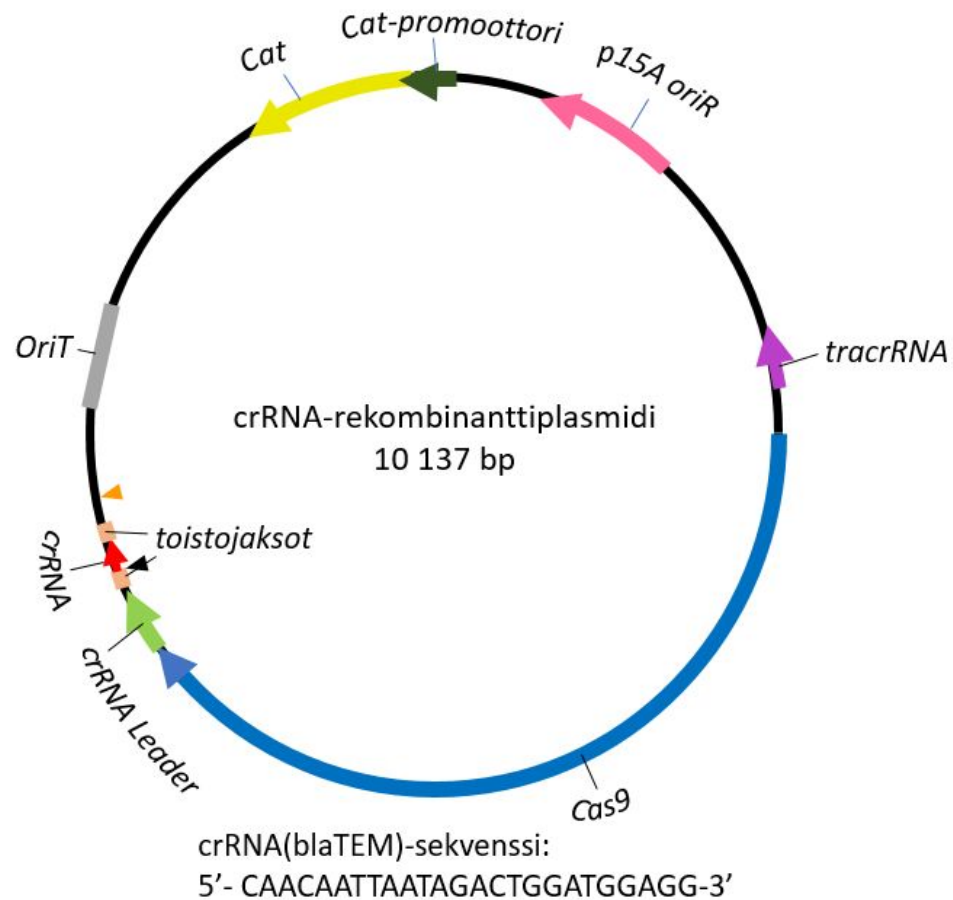
2. MATERIAALIT JA MENETELMÄT

2.1. Työssä käytetyt bakteerikannat ja plasmidit

Työssä käytettiin *E. coli* BL21 Gold-bakteereita, joihin oli konjugoitu *blaTEM-1C* ja *blaTEM-52B*-ampicilliiniresistenssigeenejä koodaavat pEC3- ja pEC15-kohdeplasmidit. Käyttämällä kahta eri kohdeplasmidia saatiin selvitettyä, targetoiko käytetty crRNA mahdollisesti useita eri geenejä. Plasmidit oli eristetty

Turun yliopistollisen sairaalan potilaista saaduista infektiivisistä *E. coli*-bakteereista (Mattila ym., 2017).

Työssä crRNA-plasmidina oli kuvan 1 mukainen kloramfenikolille resistentti pCas9-oriT-crRNA(blaTEM)-rekombinanttiplasmidi, jonka crRNA(blaTEM):lla oli tarkoitus targetoida pEC-plasmideissa olevat blaTEM-resistenssigeenit. crRNA-plasmidissa (kuva 1) oli sen toiminnan kannalta tärkeimmät geenit ja niiden lukusuunnat sekä CRISPR-Cas9-systeemiin kuuluvat komponentit eli crRNA, toistojaksot, tracrRNA, crRNA Leader, Cas9-entsyymi lukuun ottamatta RNAasia. RNAasin ja Cas9:n entsyymaattista muokkausta, jossa eri crRNA:t erotetaan toisistaan ei tarvittu, koska crRNA-plasmidissa oli vain yksi crRNA. CRISPR-Cas9-systeemin PAM-sekvenssinä käytettiin CGG-sekvenssiä, josta varsinainen targetoitu sekvenssi sijoittui 5' suuntaan kohdejuosteessa. crRNA:n transkriptio vastasi muutoin luonnollisen CRISPR-Cas9-systeemin mekanismia, mutta crRNA-plasmidin CRISPR-alueella oli vain yksi crRNA ja kaksi toistojaksoa. Kontrolliplasmidina oli pCas9-oriT-rekombinanttiplasmidi, josta puuttui crRNA-sekvenssi, mutta se oli muuten samanlainen kuin crRNA-plasmidi.



Kuva 1. **crRNA-plasmidin rakenne.** Kuvassa näkyy 10 137 bp pituisen crRNA-plasmidin replikoitumiseen ja kohdeplasmidin targetoimiseen tarvittavat geenit ja niiden lukusuunnat sekä crRNA:n (blaTEM) sekvenssi. CRISPR-Cas9-systeemin osia ovat tracrRNA, Cas9, crRNA Leader, toistojaksot ja crRNA (blaTEM). Lisäksi plasmidissa on konjugaation tunnistuskohta (oriT), kloramfenikoliresistenssigeeni (Cat) ja sen promoottori (Cat-promoottori) sekä plasmidin replikaation aloituskohta (p15A oriR). Musta nuoli osoittaa forward- ja oransi reverse-alukkeen sitoutumiskohdan plasmidissa.

2.2. Sekvenssilinjaus

Kohdegeenit sisältävien pEC3- ja pEC15-plasmidien sekvenssit haettiin GenBank-tietokannasta koodeilla KU932021.1 (pEC3I) ja KU932031.1 (pEC15II) ja linjattiin crRNA-sekvenssin kanssa Clustal Omega-työkalulla (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Linjauksella haluttiin selvittää, löytyykö kohdegeneistä komplementaarinen alue käytetyille crRNA-sekvenssille.

2.3. Bakteerien kasvatus

BL21 Gold (pEC3)- ja BL21 Gold (pEC15)-bakteerikantojen yksittäispesäkkeistä tehtiin 5 ml nestekasvatukset. Kasvatusliemenä oli ampisilliinia (150 µg/ml) sisältävä L-liemi. Kasvatuksia inkuboitiin yön yli 220 rpm, 37 °C.

Nestekasvatuksista laimennettiin 50 ml:n 1:50 kasvatukset L-liemeen, jossa ei ollut antibiootteja. Kasvatuksia inkuboitiin 220 rpm, 37 °C (Excella E24 Incubator Shaker Series, New Brunswick Scientific), kunnes OD₆₀₀-arvot (Ultrospec 10, Amersham Biosciences) olivat 0.35. Inkuboinnin jälkeen kasvatuksia pidettiin jäällä. Molemmista kasvatuksista pelletoitettiin 25 ml:ä soluja sentrifugoimalla 4200 rpm, 12 min, 4 °C (Mega Star 1.6 R, VWR), minkä jälkeen solut resuspensoitiin 25 ml:n jääkylmää vettä. Sentrifugointi toistettiin vielä kaksi kertaa, minkä jälkeen solut resuspensoitiin 535 µl:n jääkylmää vettä.

Pestyistä solususpensioista tehtiin 1 ml alkutilalaimennossarja (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴ ja 10⁻⁵) steriiliin veteen, jotta nähtiin ovatko solut elinvoimaisia. Laimennosta maljattiin 100 µl ampisilliinimaljalle.

2.4. Transformaatio

Vedellä pestyistä BL21 Gold (pEC3)- ja BL21 Gold (pEC15)-bakteerikannoista tehtiin kolme rinnakkaista replikaattia sekä crRNA- että kontrolliplasmidin transformaatiota varten. Jokaiseen crRNA-soluja varten tehtyyn replikaattiin transformoitiin 20 ng crRNA-plasmidia. Vastaavasti kontrollisoluja varten tehtyihin replikaatteihin transformoitiin saman verran kontrolliplasmidia. Kontrollisolut kontrolloivat crRNA:n vaikutusta solujen kasvuun ja transformaation toimivuutta. Solukontrolleihin transformoitiin plasmidin sijaan vettä ja niistä tehtiin yksi replikaatti. Solukontrollit tehtiin, jotta nähtiin elektroporaation vaikutus solujen elinvoimaisuuteen.

Transformoitavien plasmidien konsentraatiot määritettiin fluorometriseen mittaamenetelmään perustuvalla Qubit 2.0-mittauslaitteella (Invitrogen Life Technologies).

Transformaatio tehtiin elektroporaatiolla antamalla soluille 1350 V, 10 μ F, 600 Ω sähköimpulssi (Gene Pulser Xcell Bio-Rad). Transformaation jälkeen soluille lisättiin 1 ml huoneenlämpöistä L-lientä ja inkuboitiin 45 min, 37 °C, 220 rpm. Solut sentrifugoitiin 6800 xg, 3 min (Centrifuge 5424 R, Eppendorf) ja resuspensoitiin 200 μ l L-lientä.

2.5. Transformoitujen solujen maljaus

Molempien bakteerikantojen crRNA- ja kontrollisolunäytteiden jokaisesta replikaatista tehtiin laimennossarja maljauksia varten. Solukontrolleista oli vain yhdet näytteet molemmista bakteerikannoista, joten niistä tehtiin vain yhdet 1 ml laimennokset taulukon 1 mukaisesti. 100 μ l laimennoksia maljattiin kloramfenikolia (25 μ g/ml) ja ampisilliinia (150 μ g/ml) sisältäville L-agarmaljoille sekä L-agarmaljoille, joissa ei ollut antibiootteja. Solukontrollit maljattiin myös kloramfenikoli-ampisilliinimaljoille, millä varmistettiin, etteivät tutkimuksessa käytetyt BL21 Gold (pEC3/15)-solut olleet valmiiksi resistenttejä kloramfenikolille. Maljoja inkuboitiin 37 °C, 16 h ajan (Termaks).

Taulukko 1. **crRNA-solujen, kontrollisolujen ja solukontrollinäytteiden maljauslaimennokset.** L- ja antibioottimaljoille maljattiin 100 µl joko laimentamatonta solususpensiota (10^0) tai laimennosta (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) taulukon mukaisesti.

Näyte	Kloramfenikoli-ampisilliini	L-liemi
pEC15-crRNA-solut	10^0 , 10^{-1}	-
pEC3-crRNA-solut	10^0 , 10^{-1}	-
pEC15-kontrollisolut	10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}	-
pEC3-kontrollisolut	10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}	-
pEC15-solukontrollit	10^0	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}
pEC3-solukontrollit	10^0	10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

2.6. Bakteeripesäkkeiden laskeminen ja puhtasviljelmä

Määritettiin pesäkkeitä muodostavien yksiköiden määrä (cfu, *engl. colony forming unit*) bakteerien nestekasvatuksessa maljojen erillispesäkkeiden lukumäärän perusteella. crRNA-solujen maljoja kutsuttiin crRNA-maljoiksi ja kontrolliplasmidin sisältävien bakteerien maljoja kontrollimaljoiksi. Jokaisen replikaatin crRNA-maljalta otettiin kahdeksan erillispesäkettä ja kontrollimaljalta neljä erillispesäkettä puhtasviljelmiin siten, että jokainen pesäke levitettiin viljelysauvalla (Suomalainen Servant-tuote gammasteriloitu BERNER no 0013 200 nm pallokärki) omalle kasvatusmaljan sektorilleen. Puhtasviljelmiä inkuboitiin yön yli 37 °C. Puhtasviljelmien jokaisesta sektorista oli tarkoituksena ottaa yksi erillispesäke 96-kuoppalevyille, jossa kasvatusliuoksena oli 200 µl kloramfenikolia (25 µg/ml) ja ampisilliinia (150 µg/ml) sisältävää L-lientä. Tällä haluttiin varmistaa, että yhdessä kuoppalevyn kuopassa olevat solut olivat keskenään klooneja. Osalta sektoreilta ei kuitenkaan saatu erillispesäkettä. Kuoppalevyille laitettiin myös kaksi positiivista näytettä, joiden L-liemessä oli vain kloramfenikolia. Näytteissä oli crRNA-plasmidi,

muttei pEC-plasmidia. Kahteen kuoppaan laitettiin pelkkää L-lientä, jotta kuoppalevyn mahdollinen kontaminaatio huomattaisiin. Kasvatuksia inkuboitiin 37 °C yön yli.

2.7. Pesäke-PCR ja AGE

Pesäke-PCR:llä tarkistettiin, onko antibioottiselektiomaljalla selvinneissä bakteerikantojen crRNA-solunäytteissä jäljellä crRNA. PCR-reaktioliuokset tehtiin uudelle 96-kuoppalevylle, jossa jokainen 20 µl:n PCR-reaktio sisälsi 1x mastermix-liuosta (2x Phusion HS II mastermix, Thermo Scientific), 0,5 µM forward-aluketta (10 µM F-Primer), 0,5 µM reverse-aluketta (10 µM R-Primer) ja 1 µl bakteerikasvatusta. Negatiiviseen kontrolliin laitettiin näytteen sijaan vettä. Taulukossa 2 on esitetty alukkeiden sekvenssit ja niiden kiinnittymiskohdat rekombinanttiplasmidissa. Forward-aluke kiinnittyi plasmidissa crRNA:han, jos sitä oli näytteessä ja reverse-aluke 200 nukleotidin päähän crRNA:sta, jolloin syntyi 208 bp mittaista PCR-tuotetta.

Taulukko 2. **crRNA:ta monistavan PCR-reaktion alukkeet ja kiinnittymiskohdat crRNA-plasmidissa.** Taulukossa on PCR:ssä käytettyjen alukkeiden sekvenssit ja liittymiskohdat rekombinanttiplasmidissa. Forward-aluke kiinnittyi crRNA:han ja reverse-aluke 200 emäsparin päähän crRNA:sta.

Aluke	Sekvenssi	Kiinnittymiskohta rekombinanttiplasmidissa
Forward	5' - [Phos]AAACCAACAATTAAT AGACTGGATGGAGGG-3'	6520-6544 bp
Reverse	5' -TCACACTACTCTTCTTTTGCC TATTATAACAT-3'	6759-6728 bp

PCR-reaktio ajettiin C1000 Thermal Cycler-PCR-laitteella (Bio-Rad) seuraavan ohjelman mukaisesti: denaturaatiovaihe (98 °C; 8 min 30 s), 34 kertaa toistettava synteessivaihe (98 °C; 10 s, 68 °C; 15 s, 72 °C; 20 s) ja loppuekstensio (72 °C, 7 min).

PCR-ajon jälkeen näytteisiin lisättiin latauspuskuria (6x Loading dye, Thermo Scientific) niin, että sen loppukonsentraatio oli 1x. Näytteet ja kokostandardit GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder (Thermo Scientific) ajettiin 1 % agarosigeelielektroforeesilla (AGE, engl. agarose gel electrophoresis) (60 min, 180 mA, 100 V). Geelit kuvattiin geelinkuvauslaitteella (Bio-Rad Laboratories, ChemiDoc XRS, Raw 1-D Image).

3. TULOKSET

3.1. Sekvenssilinjaus

pEC3- ja pEC15-plasmidien *blaTEM-1C*- ja *blaTEM-52B*-geenien sekvenssit linjattiin crRNA-plasmidin crRNA-sekvenssin kanssa. Linjauksesta (kuva 2) nähdään, että molempien plasmidien kohdegeneissä on crRNA:lle täysin komplementaarinen alue, johon crRNA voi liittyä.

blaTEM52b	CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT	600
blaTEM1c	CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCT	600
crRNA	-----	0
blaTEM52b	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGC	660
blaTEM1c	TCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGCGGATAAAGTTGCAGGACCACCTTCTGCGC	660
crRNA	-----CAACAATTAATAGACTGGATGGAGG-----	25

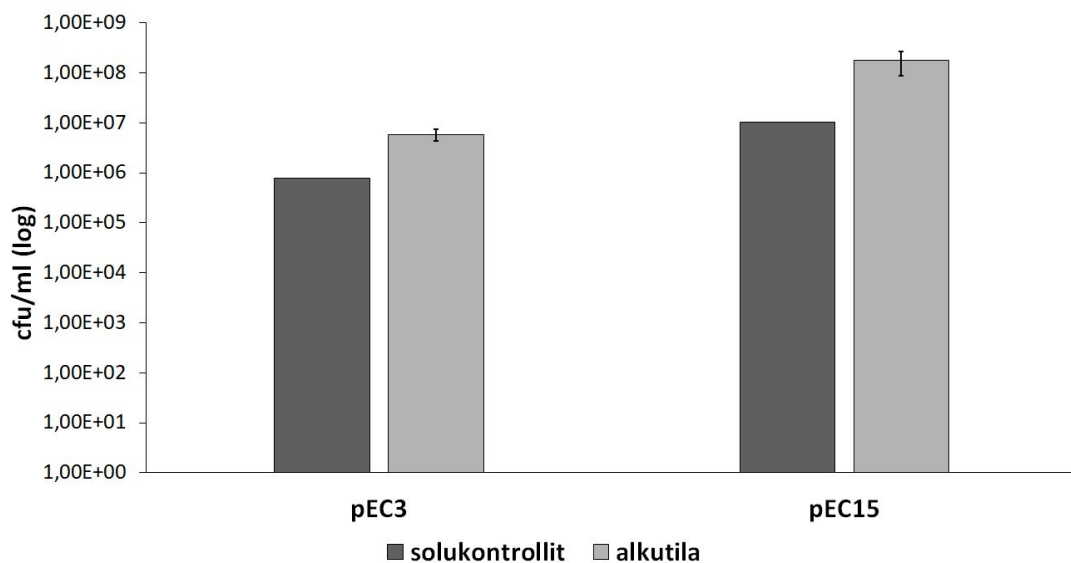
blaTEM52b	TCCGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCAGTGAGCGTGGGTCT	720
blaTEM1c	TCCGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCAGTGAGCGTGGGTCT	720
crRNA	-----	25

Kuva 2. crRNA-sekvenssin sekvenssilinjaus kohteena olevien *blaTEM-52B*- ja *blaTEM-1C*-geenien kanssa. Kuvasta nähdään, että kohdeplasmidien kohdegeneissä on crRNA-plasmidin crRNA-sekvenssille täysin komplementaariset alueet, joihin crRNA voi liittyä. Plasmidien sekvenssit haettiin GenBank-tietokannasta koodeilla KU932021.1 (pEC3I) ja KU932031.1 (pEC15II). Linjaus tehtiin Clustal Omega-työkalulla.

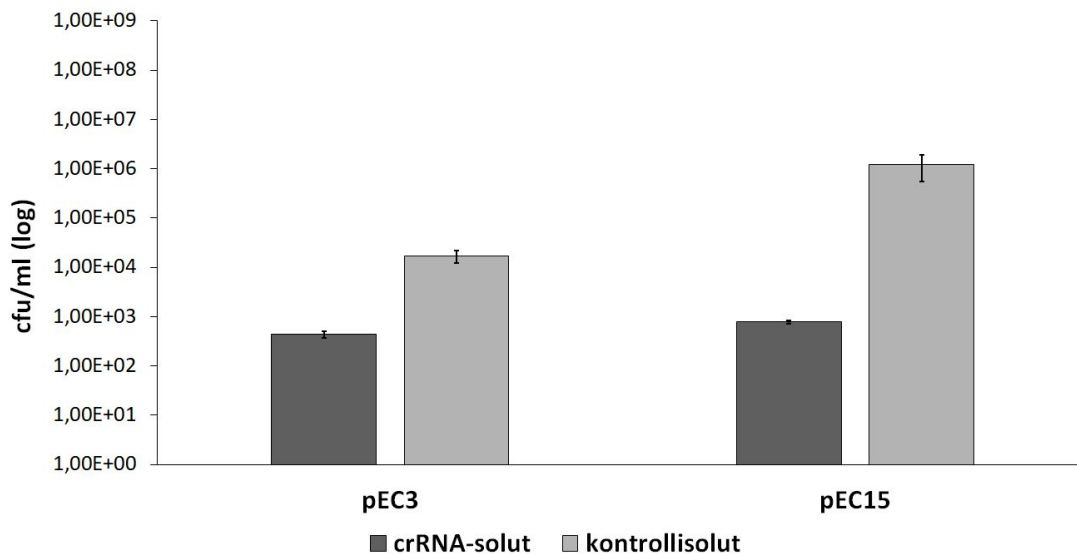
3.2. Bakteerien määrä nestekasvatuksissa

Bakteerien määrä määritettiin alkutila- ja solukontrollimaljoilla sekä kloramfenikoli-ampisilliinimaljoilla kasvavien crRNA-solujen ja kontrollisolujen erillispesäkkeiden määrän perusteella yksikössä cfu/ml. Ensin laskettiin laimennosten perusteella jokaisen replikaatin sisäinen keskiarvo. Sitten laskettiin yhteinen keskiarvo kaikkien kolmen replikaatin sisäisistä keskiarvoista, jolloin saatiin

bakteerien keskimääräinen määrä kussakin näytteessä yksikössä cfu/ml. Solukontrolli- ja alkutilamaljojen solumäärät on esitetty kuvassa 3. pEC3-kannan alkutilamaljojen solumäärä oli $5,88 \cdot 10^6$ cfu/ml ja solukontrollimaljan $7,70 \cdot 10^5$ cfu/ml. pEC15-kannan alkutilamaljojen solumäärä oli $1,78 \cdot 10^8$ cfu/ml ja solukontrollimaljan $1,02 \cdot 10^7$ cfu/ml. Kuvassa 4 on esitetty crRNA- ja kontrollimaljojen solumäärät. pEC3-kannan crRNA-maljojen solumäärä oli $4,33 \cdot 10^3$ cfu/ml ja kontrollimaljojen $1,69 \cdot 10^4$ cfu/ml. pEC15-kannan crRNA-maljojen solumäärä oli $7,73 \cdot 10^3$ cfu/ml ja kontrollimaljojen $1,23 \cdot 10^6$ cfu/ml. Vertailemalla kuvan 4 crRNA- ja kontrollisolujen nestekasvatusten solumääriä, saatiin tulokseksi, että CRISPR-Cas9-systeemin vaikutuksesta pEC3-linjan crRNA-solujen määrä laski noin 10^2 cfu/ml ja pEC15-linjan 10^3 cfu/ml antibioottiselektiomaljalla.



Kuva 3. BL21 Gold(pEC3) ja BL21 Gold(pEC15)-kantojen alkutila- ja solukontrollinestekasvatusten solumäärät. Solumäärät on ilmoitettu yksikössä cfu/ml, joka kertoo kasvatusmaljan erillispesäkkeiden määrän perusteella arvioidun keskimääräisen bakteerikonsentraation nestekasvatuksessa.



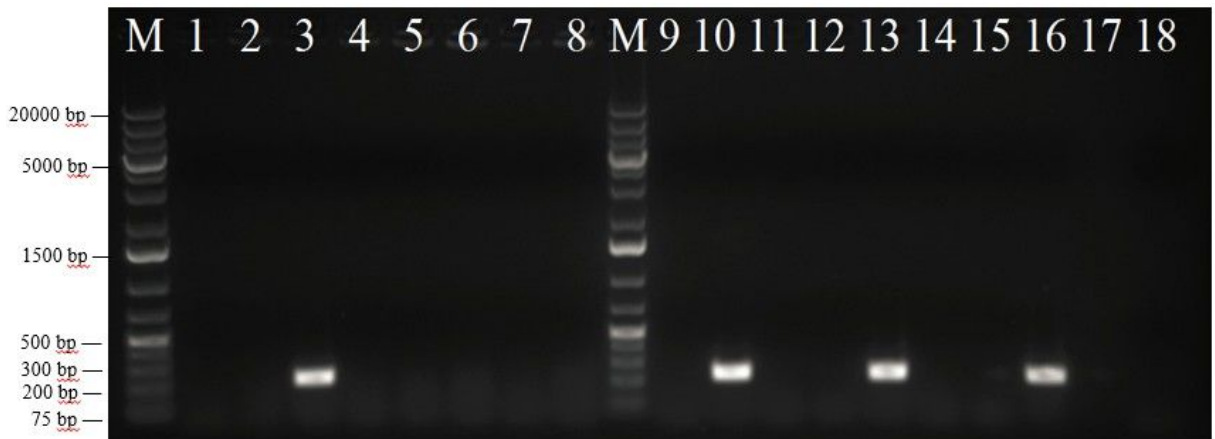
Kuva 4. **crRNA- ja kontrollisolumäärät nestekasvatuksissa.** Solumäärät on ilmoitettu yksikössä cfu/ml, joka kertoo kasvatusmaljan erillispesäkkeiden määrän perusteella arvioidun keskimääräisen bakteerikonsentraation nestekasvatuksessa.

3.3. PCR ja AGE

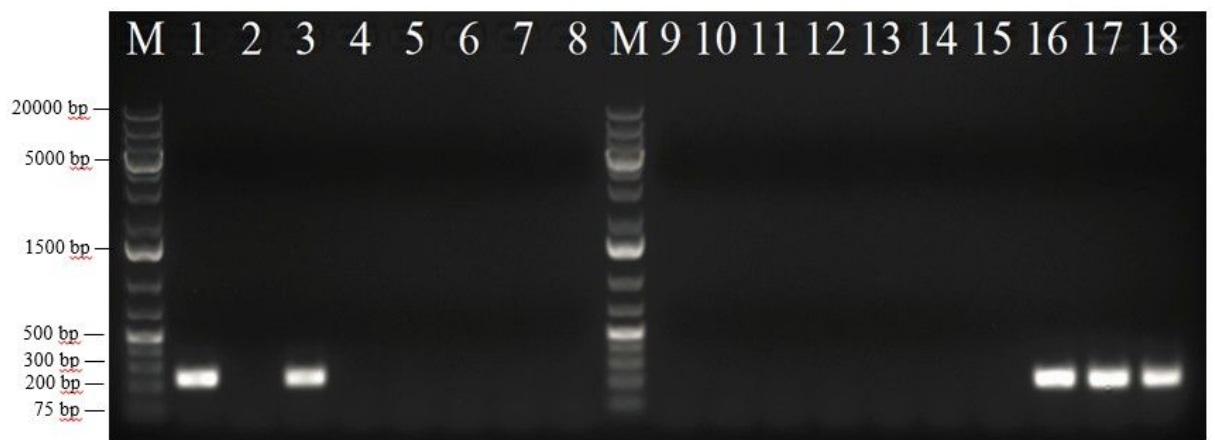
PCR-reaktiolla tarkistettiin, oliko crRNA säilynyt maljan ampicilliniselektiosta selvinneissä soluissa. Kontaminaation poissulkemiseksi myös kontrolleista tarkistettiin, ettei niistä löytynyt crRNA:ta. Näissä näytteissä CRISPR-Cas9-systeemi ei ollut jostain syystä toiminut ja katkaissut kohdegeenejä, minkä vuoksi crRNA-solut selvisivät antibioottimaljalla. Pesäke-PCR:n tulokset tarkistettiin AGE-geelillä. Koska reverse-alue kiinnittyi rekombinanttiplasmidiin 200 bp päähän crRNA:sta ja forward-alue crRNA:han, PCR-tuote muodostui ja näkyi geelillä vain, jos crRNA oli jäljellä plasmidissa.

AGE-ajon tulokset ovat kuvissa 5-8. Suurimmassa osassa geelillä ajetuista näytteistä ei näkynyt vyöhykettä, mikä tarkoittaa, että näytteessä ei ollut crRNA:ta. Geelikuvien perusteella laskettiin niiden näytteiden osuus, joissa crRNA oli jäljellä. pEC3-linjan crRNA-soluista (kuvat 5 ja 6) 25,0 % ja pEC15-linjan crRNA-soluista (kuvat 6 ja 7) 20,8 % sisälsi crRNA:n. Kontrollisolunäytteissä (kuvat 7 ja 8) ei oletetusti näkynyt crRNA-vyöhykkeitä, koska soluihin transformoitiin kontrolliplasmidi ilman crRNA:ta. Positiivisissa kontrolleissa (Kuva 6, näytteet 17 ja

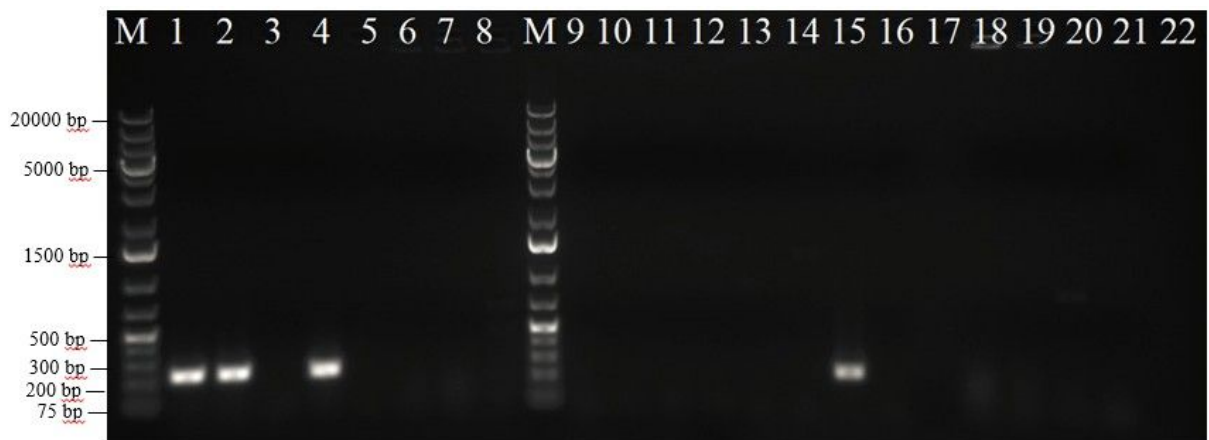
18) näkyi crRNA-vyöhykkeet ja negatiivisessa kontrollissa (kuva 5, näyte 18) ei näkynyt vyöhykkeitä. Kahdessa 96-kuoppalevyn pelkkää L-lientä sisältävässä näytteessä ei havaittu kontaminaatiota.



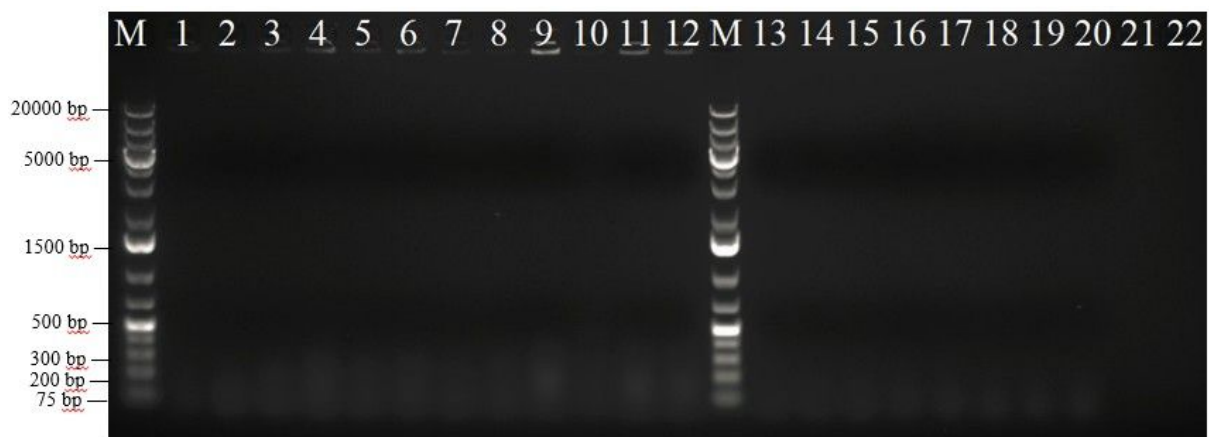
Kuva 5. PCR-näytteiden 1%-AGE (60 min, 180 mA, 100 V). Näytejärjestys geelillä: 1.-8. pEC3-crRNA-solut, replikaatista 1 kerätyt pesäkkeet, 9.-16. pEC3-crRNA-solut, replikaatista 2 kerätyt pesäkkeet, 17. - 18. negatiivinen kontrolli. Kuvasta nähdään, että crRNA löytyi yhdestä pEC3-crRNA-solujen replikaatin 1 ja kolmesta replikaatin 2 näytteestä. Negatiivisesta kontrollista crRNA:ta ei löytynyt. M on kokostandardi (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder)



Kuva 6. PCR-näytteiden 1%-AGE (60 min, 180 mA, 100 V). Näytejärjestys geelillä: 1.-8. pEC3-crRNA-solut, replikaatista 3 kerätyt pesäkkeet, 9.-16. pEC15-crRNA-solut, replikaatista 1 kerätyt pesäkkeet, 17.-18. positiivinen kontrolli. crRNA löytyi kahdesta pEC3-crRNA-solujen replikaatin 3 ja yhdestä pEC15-crRNA-solujen replikaatin 1 näytteestä. Molemmista positiivisista kontrollinäytteistä löytyi crRNA. M on kokostandardi (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder).



Kuva 7. PCR-näytteiden 1%-AGE (60 min, 180 mA, 100 V). Näytejärjestys geelillä: 1.-8. pEC15-crRNA-solut, replikaatista 2 kerätyt pesäkkeet, 9.-16. pEC15-crRNA-solut, replikaatista 3 kerätyt pesäkkeet. 17. -, 18.-21. pEC3-kontrollisolut, replikaatista 1 kerätyt pesäkkeet, 22. -. Kuvasta nähdään, että crRNA löytyi kolmesta pEC15-crRNA-solujen replikaatin 2 ja yhdestä replikaatin 3 näytteestä. pEC3-kontrollisolujen näytteistä ei löytynyt crRNA:ta. M on kokostandardi (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder).



Kuva 8. PCR-näytteiden 1%-AGE (60 min, 180 mA, 100 V). Näytejärjestys geelillä: 1.-4. pEC3-kontrollisolut, replikaatista 2 kerätyt pesäkkeet, 5.-8. pEC3-kontrollisolut, replikaatista 3 kerätyt pesäkkeet, 9.-12. pEC15-kontrollisolut, replikaatista 1 kerätyt pesäkkeet, 13.-16. pEC15-kontrollisolut, replikaatista 2 kerätyt pesäkkeet, 17.-20. pEC15-kontrollisolut, replikaatista 3 kerätyt pesäkkeet, 21.-22. -. Kaikki geelillä ajetut näytteet olivat pEC3- tai pEC15-kontrollisolunäytteitä. Mistään näytteestä ei löytynyt crRNA:ta. M on kokostandardi (GeneRuler 1 Kb Plus DNA Ladder).

4. TULOSTEN TARKASTELU

4.1. Sekvenssilinjaus

Molemmista kohdegeneistä, *blaTEM-1C* ja *blaTEM-52B*, löytyi sekvenssilinjauksessa komplementaarinen alue käytetylle crRNA:lle. Koska kohdegeneistä löytyi vain yksi komplementaarinen alue, crRNA voisi olla

sekvenssilinjauksen perusteella riittävän pitkä saavuttaakseen spesifisen sitoutumisen. Sen pitäisi onnistua sitoutumaan kohdegeeneissä vain yhteen kohtaan. Linjauksen perusteella käytetyllä crRNA:lla on mahdollista targetoida *blaTEM-1C* ja *blaTEM-52B*-resistenssigeenejä.

4.2. Kasvatusmaljat: Elektroporaation ja antibioottien vaikutukset

Transformaation jälkeen crRNA- ja kontrollisolut viljeltiin ampicilliini-kloramfenikolikasvatusmaljoille. Kloramfenikolilla selektoitiin crRNA- sekä kontrolliplasmidia ja ampicilliinilla pEC-plasmideja. crRNA- ja kontrollisolujen tiheyksiä (kuva 4) vertailemalla pääteltiin, että CRISPR-Cas9-systeemi katkaisi toimiessaan pEC-plasmideissa olevat ampicilliiniresistenssigeenit, jolloin niiden luenta keskeytyi ja plasmidi linearisoitui. Bakteerit eivät voineet enää transkriboida resistenssigeeniä ja ne kuolivat ampicilliinia sisältävillä maljoilla. pEC3-kannan crRNA-solunäytteiden bakteerimäärä laski 10^2 cfu/ml ja pEC15-kannan 10^3 cfu/ml. Solutiheyksien muutokset olivat hyvin suuret, joten systeemi toimi tehokkaasti. crRNA-solunäytteiden bakteerimäärät olivat odotetusti pienempiä kuin kontrollisolunäytteiden. crRNA-maljoilla eloon jäivät ne bakteerit, joissa systeemi ei ollut jostain syystä toiminut.

Alkutilamaljauksilla varmistettiin, että BL21 Gold(pEC3/pEC15)-kannat olivat elinvoimaisia. Lähtökohtaisesti maljojen pesäkemäärästä huomattiin pEC15-kannan solujen kasvaneen pEC3-kannan soluja paremmin. Solukontrolleille tehtiin elektroporaatiokäsittely, mutta niihin ei transformoitu kloramfenikoliresistenssigeenin sisältävää rekombinanttiplasmidia. Koska pEC-plasmideilla oli resistenssigeeni vain ampicilliinia vastaan, kloramfenikoli-L-agarmaljoilla varmistettiin solukontrollien sensitiivisyys kloramfenikolille. Tulokset olivat odotetunlaisia, koska kloramfenikolimaljoilla ei kasvanut soluja ja L-maljoilla solut kasvoivat hyvin. Alkutilanäytteiden ja solukontrollien solumäärissä ei ollut huomattavia eroja, joten elektroporaatio ei vaikuttanut työn kannalta merkittävästi solujen elinvoimaisuuteen (kuva 3).

4.3. Pesäke-PCR ja AGE

Pesäke-PCR:llä selvitettiin, onko käsittelystä selvinneissä bakteerisoluihin edelleen jäljellä crRNA. PCR:n avulla monistettiin näytteistä mahdollisesti löytyvää crRNA:ta ja AGE:lla nähtiin, oliko crRNA monistunut PCR:ssä.

crRNA- ja kontrollisolujen puhdasviljelmämaljoilta poimittiin edelleen pesäkkeet nestekasvatukseen 96-kuoppalevylle PCR-reaktioita varten. Kaikki poimitut pesäkkeet eivät olleet erillispesäkkeitä. Ne valittiin puhdasviljelmämaljoilta kuitenkin mahdollisimman vähän muiden pesäkkeiden kanssa kontaktissa olevista kohdista, mikä pienensi riskiä saada geneettisesti erilaisia bakteereita näytteisiin. 96-kuoppalevyltä otettiin solunäytteet edelleen PCR-reaktioihin. PCR-reaktion yhdessä näytteessä olevien solujen olisi tullut olla klooneja, ellei puhdasviljelmän soluissa ollut tapahtunut mutaatioita tai elleivät eri pesäkkeet olleet jostain muusta syystä sisältäneet geneettisesti erilaisia yksilöitä. PCR-reaktiota varten tehtiin myös kaksi positiivista kontrollinäytettä, joissa oli varmasti crRNA sekä negatiivinen kontrollinäyte, jossa sitä ei ollut. Molemmissa positiivisissa kontrolleissa näkyi geelillä oikeankokoinen vyöhyke suhteessa kokostandardiin, mikä varmisti PCR-reaktion toimivuuden ja alukkeiden kiinnittymisen oikeaan sekvenssiin. Lisäksi näytteiden, positiivisen kontrollin ja kokostandardin vyöhykkeitä vertaamalla varmistettiin näytteiden vyöhykkeiden olevan peräisin crRNA:sta. Negatiivisessa kontrollissa ei näkynyt geelillä mitään, joten reaktiossa ei ollut tapahtunut kontaminaatioita. Kontrollinäytteissä oli kontrolliplasmidi ilman crRNA:ta. Odotusten mukaisesti näissä näytteissä ei näkynyt crRNA-vyöhykkeitä, mikä osoitti käytetyn forward-alukkeen kiinnittyvän spesifisesti crRNA:han.

Harvasta pesäkkeestä löytyi crRNA. Näissä soluissa CRISPR-Cas9-systeemin olisi tullut crRNA:n kohdentamana katkaista pEC-plasmidien resistenssigeenit. Syy miksei näin käynyt, saattoi johtua jostain mutaatiosta crRNA- tai pEC-plasmidissa. Citorik ym. (2014) targetoivat tutkimuksessaan β -laktamaasia tuottavia *blaSHV-18*- ja *blaNDM-1*-geenejä CRISPR-Cas9-systeemin avulla. Kaikki solut eivät kuitenkaan kuolleet, sillä ne olivat menettäneet kohdegeenille komplementaarisen

crRNA-sekvenssin deleetiossa jonkin puolustusmekanismin johdosta. Tutkimuksen perusteella voidaan pohtia, olisiko tämän työn crRNA voinut vastaavasti deletoitua bakteereista, joista sitä ei löytynyt. Huomionarvoista on myös, että CRISPR-Cas9-systeemin aiheuttama valintapaine antaisi valintaedun bakteereille, jotka pystyvät selviytymään elossa jonkun puolustusmekanismin avulla. Näytteissä, joissa crRNA oli säilynyt, oli vastaavasti saattanut tapahtua tracrRNA:n deleetio tai RuvC-domeenin inaktivaatio, kuten Citorikin ym. (2014) tutkimuksessa. Periaatteessa mutaatio on voinut tapahtua missä vain systeemin toiminnan kannalta olennaisessa osassa. Sekvensoimalla sekä crRNA että pEC-plasmidien *blaTEM*-geenit ampisilliiniselektiosta eloonjääneistä soluista, voitaisiin tutkia, onko niissä tapahtunut mutaatioita ja jos on, niin millaisia. crRNA-plasmidin crRNA-sekvenssissä tapahtuneen mutaation seurauksena crRNA ei olisi kyennyt enää sitoutumaan kohdegeeneihin. Mahdollinen crRNA:ssa tapahtunut missense- tai neutraali pistemutaatio, ei näy geelillä.

4.4. crRNA:n avulla onnistuttiin sammuttamaan *blaTEM*-resistenssigeenit

Vertaamalla crRNA- ja kontrollisolujen bakteeripesäkemääriä, saatiin selville, että CRISPR-Cas9-systeemillä pystytään targetoimaan ja katkaisemaan *blaTEM-IC*- ja *blaTEM-52B*-antibioottiresistenssigeenit käytetyn crRNA-sekvenssin avulla. Sekvenssilinjauksesta huomattiin molemmissa *blaTEM*-kohdegeeneistä olevan vain yksi crRNA:lle komplementaarinen alue, joten kyseisellä crRNA:lla voisi olla mahdollista katkaista eri *blaTEM*-geenejä. Tämä voitaisiin selvittää jatkotutkimuksilla käyttämällä eri kohdegeenejä.

Työ oli osa laajempaa tutkimusta, jonka tarkoitus on testata vastaavasti yksi kerrallaan erilaisten crRNA-sekvenssien toimivuutta antibioottiresistenssigeenien katkaisemisessa. Kun erilaisia tehokkaita crRNA-sekvenssejä on lopulta löydetty riittävästi, yhteen rekombinanttiplasmidiin voitaisiin liittää eri crRNA-sekvenssejä ja katkaista CRISPR-Cas9-systeemillä useita eri antibioottiresistenssigeenejä bakteereista. Tällöin tulisi varmistaa, ettei plasmidista valmisteta liian pitkää ja, että kaikki crRNA:t transkriboituvat yhtä tehokkaasti. Päämääränä on kehittää tällaisesta

systemistä bakteeri-infektioita ennaltaehkäisevä hoitomuoto, jonka avulla pyrittäisiin hävittämään bakteeripopulaatioista ESBL-ominaisuutta kantavat bakteerit jo ennen mahdollisen infektion syntymistä. Tulevaisuuden haasteena on myös hoidon käytännön toteuttaminen. Yksi vaihtoehto olisi seuloa ESBL-bakteerien kantajat terveiden joukosta ja hoitaa menetelmällä ainoastaan heidät. Esimerkiksi leikkaukseen menevät potilaat tutkittaisiin antibioottiresistenttien bakteerien varalta ja hoidettaisiin tarvittaessa ennen leikkausta, jotta välttyttäisiin jälkikomplikaatioilta. Lisäksi ennen hoitokeinon käyttöönottoa olisi selvitettävä mahdolliset haittavaikutukset elimistölle. Jos hoitomuoto saadaan toimimaan, sen yleistyminen maailmanlaajuisesti vie paljon aikaa. Toimivan menetelmän kehittäminen olisi ihmiskunnan kannalta erittäin merkittävää, sillä antibioottien hiipuva tehokkuus bakteeri-infektioita vastaan tulee johtamaan kasvavaan kuolleisuuteen ilman korvaavan hoitokeinon löytymistä.

KIITOKSET

Haluamme kiittää ohjaajiamme Reetta Penttistä ja Pilvi Ruotsalaista sekä Matti Jalasvuorta.

LÄHDELUETTELO

- Bielak, E., R.D. Bergenholtz, M.S. Jorgensen, S.J. Sorensen, L.H. Hansen, ja H. Hasman. 2012. Investigation of diversity of plasmids carrying the blaTEM-52 gene. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67:786. doi: 10.1093/jac/dkr559.
- Brolund, A. 2014. Overview of ESBL-producing Enterobacteriaceae from a Nordic perspective. *Infection Ecology & Epidemiology*. 4:24555-9.
- Brolund, A., P.J. Edquist, B. Mäkitalo, B. Olsson-Liljequist, T. Söderblom, K.T. Wisell, C.G. Giske, and R. Cantón. 2014. Epidemiology of extended-spectrum β -lactamase-producing *Escherichia coli* in Sweden 2007–2011. *Clinical Microbiology and Infection*. 20:O352. doi: 10.1111/1469-0691.12413.
- Bush, K., and G.A. Jacoby. 2010. Updated Functional Classification of β -Lactamases. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54:969. doi: 10.1128/AAC.01009-09.
- Carattoli, A. 2009. Resistance plasmid families in Enterobacteriaceae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 53:2227-2238. doi: 10.1128/AAC.01707-08.
- Chylinski, K., K.S. Makarova, E. Charpentier, and E.V. Koonin. 2014. Classification and evolution of type II CRISPR-Cas systems. *Nucleic Acids Research*. 42:6091-6105. doi: 10.1093/nar/gku241
- Citorik, R.J., M. Mimee, ja T.K. Lu. 2014. Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases. *Nature Biotechnology*. 32:1141-1145. doi: 10.1038/nbt.3011.
- Davies, J., and D. Davies. 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 74:417-433. doi: 10.1128/MMBR.00016-10.
- Deltcheva, E., K. Chylinski, C.M. Sharma, K. Gonzales, Y. Chao, Z.A. Pirzada, M.R. Eckert, J. Vogel, and E. Charpentier. 2011. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature*. 471:602. doi: 10.1038/nature09886.
- Dupuis, M., M. Villion, C. Fremaux, P. Horvath, A.H. Magadán, D.A. Romero, R. Barrangou, S. Moineau, P. Boyaval, and J.E. Garneau. 2010. The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. *Nature*. 468:67-71. doi: 10.1038/nature09523.
- Eliopoulos, G., ja K. Bush. 2001. New β -Lactamases in Gram-Negative Bacteria: Diversity and Impact on the Selection of Antimicrobial Therapy. *Clinical Infectious Diseases*. 32:1085-1089. doi: 10.1086/319610.
- Gasiunas, G., R. Barrangou, P. Horvath, and V. Siksnys. 2012. Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109:E2586. doi: 10.1073/pnas.1208507109.
- Giske, C.G., A.S. Sundsfjord, G. Kahlmeter, N. Woodford, P. Nordmann, D.L. Paterson, R. Cantón, ja T.R. Walsh. 2009. Redefining extended-spectrum β -lactamases: balancing science and clinical need. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 63:1-4. doi: 10.1093/jac/dkn444.
- Hall, B.G., and M. Barlow. 2004. Evolution of the serine β -lactamases: past, present and future. *Drug Resistance Updates*. 7:111-123. doi: 10.1016/j.drug.2004.02.003.
- Jinek, M., K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, ja E. Charpentier. 2012. A Programmable Dual-RNA-Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity. *Science*. 337:816. doi: 10.1126/science.1225829.
- Lander, E. 2016. The Heroes of CRISPR. *Cell*. 164:18-28. doi: 10.1016/j.cell.2015.12.041.

- Lange, R., H. Locher, P. Wyss, and R. Then. 2007. The Targets of Currently Used Antibacterial Agents: Lessons for Drug Discovery. *Current Pharmaceutical Design*. 13:3140-3154. doi: 10.2174/138161207782110408.
- Livermore, D. 2008. Defining an extended-spectrum b-lactamase. *Clin. Microbiol. Infect.* 14:3-10.
- Makarova, K.S., S.J.J. Brouns, ja v.d. Oost J. 2011. Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems. *Nature Reviews Microbiology*. 9:467-477. doi: 10.1038/nrmicro2577.ut
- Mattila, S., P. Ruotsalainen, V. Ojala, T. Tuononen, T. Hiltunen, ja M. Jalasvuori. 2017. Conjugative ESBL plasmids differ in their potential to rescue susceptible bacteria via horizontal gene transfer in lethal antibiotic concentrations. *Journal of Antibiotics*. 70:805. doi: 10.1038/ja.2017.41.
- Nishimasu, H., F.A. Ran, P.D. Hsu, S. Konermann, S.I. Shehata, N. Dohmae, R. Ishitani, F. Zhang, ja O. Nureki. 2014. Crystal structure of Cas9 in complex with guide RNA and target DNA. *Cell*. 156:935-949. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.001.
- Nordmann, P., L. Dortet, and L. Poirel. 2012. Carbapenem resistance in Enterobacteriaceae: here is the storm. *Trends in Molecular Medicine*. 18:263-272. doi: 10.1016/j.molmed.2012.03.003.
- Nunez, J.K., L. Bai, L.B. Harrington, T.L. Hinder, ja J.A. Doudna. 2016. CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Molecular Cell*. 62:824-833. doi: 10.1016/j.molcel.2016.04.027.
- Pai, H., S. Lyu, J.H. Lee, J. Kim, Y. Kwon, J. Kim, ja K.W. Choe. 1999. Survey of Extended-Spectrum b-Lactamases in Clinical Isolates of Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae: Prevalence of TEM-52 in Korea. *J Clin Microbiol*. 37(6):1758-1763.
- Pérez-Mendoza, D., and F. De la Cruz. 2009. Escherichia coli genes affecting recipient ability in plasmid conjugation: are there any? *BMC Genomics*. 10:71. doi: 10.1186/1471-2164-10-71.
- Pitout, J.D.D., P. Nordmann, K.B. Laupland, ja L. Poirel. 2005. Emergence of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum β -lactamases (ESBLs) in the community. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 56:52. doi: 10.1093/jac/dki166.
- Poyart, C., P. Mugnier, G. Quesne, P. Berche, and P. Trieu-Cuot. 1997. A Novel Extended-Spectrum TEM-Type b-Lactamase (TEM-52). Associated with Decreased Susceptibility to Moxalactam in Klebsiella pneumoniae. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 42:108-113.
- Sashital, D.G., M. Jinek, ja J.A. Doudna. 2011. An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. *Nature Structural & Molecular Biology*. 18:680-687. doi: 10.1038/nsmb.2043.
- Schultsz, C., ja S. Geerlings. 2012. Plasmid-Mediated Resistance in Enterobacteriaceae. *Drugs*. 72:1. doi: 10.2165/11597960-000000000-00000.
- Shaikh, S., J. Fatima, S. Shakil, S.M.D. Rizvi, ja M.A. Kamal. 2015. Antibiotic resistance and extended spectrum beta-lactamases: Types, epidemiology and treatment. *Saudi Journal of Biological Sciences*. 22:90-101. doi: 10.1016/j.sjbs.2014.08.002.
- Sorek, R., V. Kunin, and P. Hugenoltz. 2008. CRISPR - a widespread system that provides acquired resistance against phages in bacteria and archaea. *Nature Reviews Microbiology*. 6:181-186. doi: 10.1038/nrmicro1793.
- Sternberg, S.H., S. Redding, M. Jinek, E.C. Greene, and J.A. Doudna. 2014. DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature*. 507:62. doi: 10.1038/nature13011.

Stokes, H.W., ja M.R. Gillings. 2011. Gene flow, mobile genetic elements and the recruitment of antibiotic resistance genes into Gram-negative pathogens. *FEMS Microbiology Reviews*. 35:790-819. doi: 10.1111/j.1574-6976.2011.00273.x.

Wintersdorff, Christian J H, J. Penders, J.M. van Niekerk, N.D. Mills, S. Majumder, L.B. van Alphen, P.H.M. Savelkoul, ja P.F.G. Wolfs. 2016. Dissemination of Antimicrobial Resistance in Microbial Ecosystems through Horizontal Gene Transfer. *Frontiers in Microbiology*. 7:173. doi: 10.3389/fmicb.2016.00173.