

2022 年臺灣國際科學展覽會 優勝作品專輯

作品編號 080007

參展科別 生物化學

作品名稱 利用 CRISPR/Cas 技術重建複雜的 DNA 修復機制

得獎獎項 二等獎

就讀學校 臺北市私立復興實驗高級中學

指導教師 馬瑪宣、呂毓蘋

作者姓名 梁芯語、李佳璇

關鍵詞 Synthetic biology、CRISPR/Cas、PRISM(Perturbing Regulatory Interactions by Synthetic Modulators)

作者簡介



我是李佳璇，是台北市私立復興實驗高級中學的高中一年級學生。自從在學校接觸生物與化學科後，我便對此產生了興趣。後來，我有幸能進入實驗室去學習生物化學相關的研究與知識，希望未來能往生物與化學科的方向發展，也非常感謝實驗室裡的教授、學長姊以及學校裡的指導老師。



我是梁芯語，就讀台北市私立復興實驗高級中學的十年級學生。從小在學校接觸了許多生物相關的實驗和知識，產生了極大的熱忱和興趣，並立定志向，希望有朝一日能進行生物化學的專題研究，就此踏上生物研究的道路。九年級時加入專題研究小組，感謝老師和實驗室的教授及學長姊的教導與鼓勵，一同規劃研究進度與實驗流程，全程參與此計畫，使我更加確立未來的發展藍圖。

摘要

本研究利用合成生物學技術開發的創新基因組篩檢平台 *PRISM(v2.0)*，採用合成轉錄因子(crispr-TF)辨認 DNA 但不進行剪切，透過修改 CRISPR/Cas 的 PAM-interacting (PI) domain 序列打破其辨認限制，由原本 NGG 序列變成可以結合 NAG 的序列，提升 crispr-TF 在高通量基因組的篩選能力，期待未來可以做出辨認 NNN 序列，以此技術初步成功建構 Chk2/Rad53 所參與的基因網絡，讓失去 Chk2/Rad53 功能的酵母菌能在 DNA 損傷的情況生存。Chk2/Rad53 蛋白磷酸酶在 DNA 修復的訊息傳遞中調控龐大的基因網絡，其中潛在大量不同調控路徑聯結的組合性，過去的研究都無法有效地分析且重建完整的 DNA 修復機制。未來將進一步探討 Chk2/Rad53 調控的下游基因組，並以此新技術和研究應用於複雜腫瘤與老化疾病的預防及治療。

Abstract

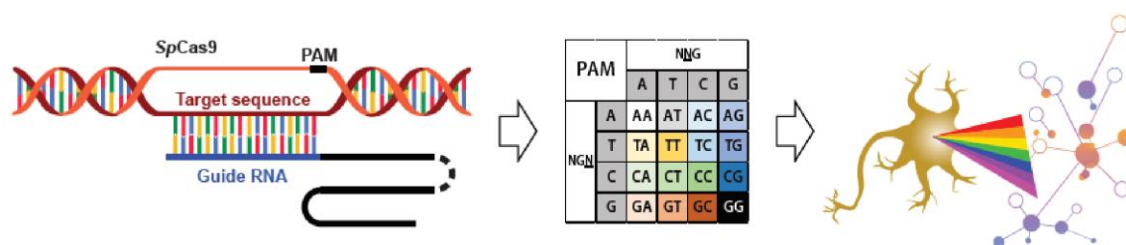
DNA damage checkpoint is conserved signaling pathways that ensure genome integrity. Upon replication stress or DNA damage, an essential kinase Rad53 (the ortholog of mammalian Chk2 kinase) stalls DNA replication and inhibits cell cycle progression. Here, we aimed to systematically probe the genetic interaction of Chk2/Rad53 in order to elucidate of the Rad53 functions and its regulatory networks. Current methods of perturbing genetic networks rely mainly on targeted single-gene overexpression, knockout, and knockdown. However, these approaches are labor-intensive and it is challenging to modulate the combinatorial or global regulatory networks involved in complex diseases. To overcome these limitations, we have developed a novel technology platform called *PRISM* (Perturbing Regulatory Interactions by Synthetic Modulators). *PRISM* introduces global perturbations to cellular transcriptional networks using CRISPR/Cas based transcription factors (crisprTFs). Here, we added the screening power to *PRISM v2.x* by engineering the PAM-interacting (PI) domain of Cas9. We demonstrated that the reprogrammed networks by *PRISM v2.x* rebuilt the Rad53/Chk2-dependent checkpoint signaling in DNA damage induced yeast cells. These approaches are expected to deepen our understanding of the fundamental mechanisms that underlie checkpoint signaling and to open up new therapeutic strategies for complex disorders, such as cancers and aging.

壹、前言

一、研究動機

在細胞複製及分裂的過程中，Chk2/Rad53 作為重要的檢查點訊號傳訊者 (checkpoint signaling) 將 DNA 損傷的訊息傳遞給下游基因，當 Chk2/Rad53 發生突變，細胞週期和修復系統將無法獲得協調，常導致細胞的不正常增生或細胞的提早死亡。Chk2/Rad53 蛋白磷酸酶在 DNA 修復的訊息傳遞中調控龐大的基因網絡，其中潛在大量不同調控路徑聯結的組合性，傳統遺傳學和分子生物技術皆無法有效地分析且重建完整的 DNA 修復機制。

由於過去研究皆無法系統性地重建 Chk2/Rad53 所調控的基因網絡，本研究嘗試利用合成生物學中的 **PRISM** (Perturbing Regulatory Interactions by Synthetic Modulators) 技術，透過改良 CRISPR/Cas 對 PAM(NGG)序列的限制找尋 Chk2/Rad53 的下游基因組，此新技術和研究應用將可用於複雜疾病的預防及治療(圖 1)。

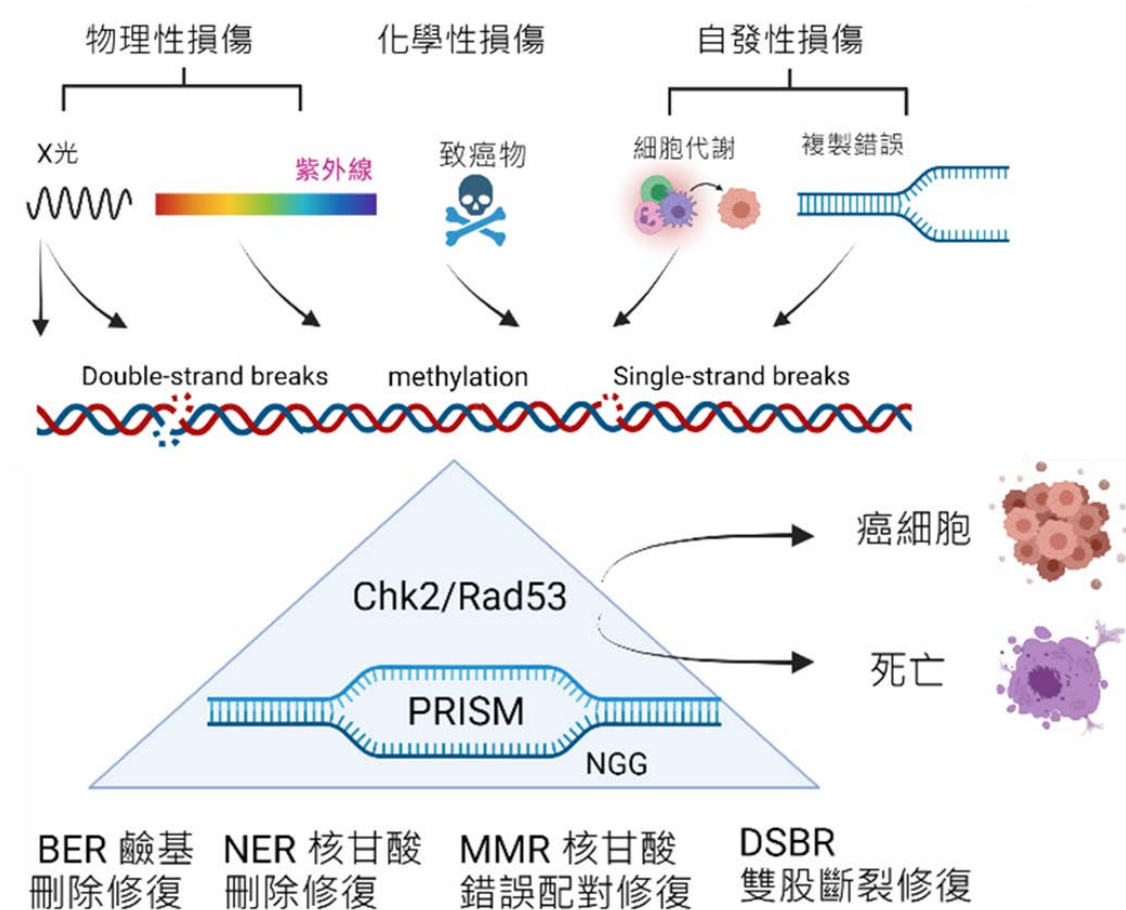


(圖 1): PRISM 技術建立於 CRISPR，透過 guide RNA 辨認目標基因，進而找出 chk2/rad53 的下游基因組，而我們藉由降低 PAM 的限制，提高 PRISM 技術的效率與擴大其辨認範圍，找到更多 chk2/rad53 的下游基因。

二、DNA 損傷的檢查點訊號傳遞 (DNA damage checkpoint signaling)

當 DNA 發生錯誤的時候，負責偵測錯誤訊息的蛋白 MRN 和 ATRIP 將訊號帶給下游負責傳遞訊息的蛋白質 ATM/ATR 再磷酸化其下游的 Chk2/Rad53，而

Chk2/Rad53 也是個激酶(kinase)，透過磷酸化下游的分子將訊號傳遞下去，並啟動複雜的 DNA 修復機制。例如 Chk2/Rad53 透過磷酸化 BRCA1 的 Ser988，使 BRCA1 脫離與 Chk2/Rad53 形成的複合體，之後 BRCA1 參與 DNA 的修復機制（homologous recombination repair and transcription-coupled repair）以及調控細胞週期，甚至引發細胞凋亡。Chk2/Rad53 還可磷酸化 p53 的 Ser20，穩定 p53 的結構，使 p53 可以調控細胞週期、細胞凋亡以及 DNA 的修復。或者，透過磷酸化 Cdc25A 或 Cdc25C，導致細胞週期暫停在 G2，避免進入細胞分裂。如果 Chk2/Rad53 發生基因突變，就有可能讓 DNA 複製時出現的錯誤無法被修復，細胞因為無法停止細胞週期而繼續分裂，也無法利用細胞凋亡的機制使細胞正常死去。上述這些現象都是正常細胞轉變成癌細胞時會出現的，由此可以推測 Chk2/Rad53 基因的完整與否跟腫瘤生成有非常密切的關係。有研究指出：Chk2/Rad53 的幾個特定位置若發生突變，例如 1100delC 和 I157T 突變的族群，比健康族群更高的機率罹患乳癌和前列腺癌，此外 I157T 也被測出是卵巢癌、淋巴癌、膀胱癌等等眾多癌症的高危險族群。透過這些研究，也可以知道 Chk2/Rad53 為癌症發育的指標基因，透過研究 Chk2/Rad53 便有機會對其作用有更深入的了解，進而給癌症的預防新的突破。



(圖 2): DNA damage 與 DNA repair 機制：由不同損傷如:物理性損傷、化學性損傷、自發性損傷，而導致多種 DNA damage，進而由 chk2/rad53 調控下游基因修復機制，PRISM 技術找出可以取代 chk2/rad53 重要角色的基因群，以探討參與 DNA repair 的基因網絡。

三、Chk2/Rad53 參與的 DNA 修復機制

當細胞受到 X 光、紫外線、細胞代謝、致癌物、複製錯誤，會使 DNA 產生單股斷裂(SSB)、雙股斷裂(DSB)、鏈間交聯、甲基化等，細胞會執行複雜的 DNA 修復機制，Chk2/Rad53 會針對損傷類型開啟不同下游訊息傳遞，例如 BER (Base excision repair) 鹼基刪除修復，NER (Nucleotide excision repair) 核甘酸刪除修復，MMR (Mismatch repair) 核甘酸錯誤配對修復，DSBR (Double-Strand Break Repair) 雙

股斷裂修復，但若是沒有修復成功，便會造成細胞凋亡或是突變，進而下一步地導致老化或是癌症。人類細胞中的 Chk2 (Checkpoint kinase 2)原先是在酵母菌遺傳學研究中所發現對輻射(radiation)敏感而得此命名為 Rad53，當酵母菌受到外界環境刺激讓 DNA 複製出現錯誤時，Rad53 作為訊號傳遞中樞可以透過磷酸化並同時活化下游基因，例如 BRCA1、E2F1、p53、Cdc25 等，這些下游基因所調控之機制包含 DNA 修復、細胞老化或細胞凋亡，以確保每次分裂後所產生之細胞是完整且健康的。

然而，關於 Chk2/Rad53 的完整功能到現在卻還沒有被全部釐清。目前僅知道 Rad53 在酵母菌中是扮演 transducer 的角色，Rad53 要被活化有兩種情況，第一種情況是 DNA 因為外界原因發生 DSB 時，會被 Tel1 (human ATM homolog)偵測到並磷酸化發生 DSB 附近的組蛋白 H2A，H2A 被磷酸化之後會招募 adaptor Rad9(human 53BP1/Classpin)，Rad9 也會被 Tel1 磷酸化而形成能與 Rad53 結合，此時 Tel1 再磷酸化 Rad53 將之活化，Rad53 被活化後才繼續引發下游蛋白的活化與功能。第二種則是發生在 DNA 複製之時，DNA 複製過程中有時會有出現錯誤的情況，若發生複製錯誤，則會被 Mec1 (human ATR homolog)發現，招募 adaptor Mrc1，並將之磷酸化，被磷酸化的 Mrc1 能與 Rad53 結合，因此有招募的作用，Rad53 被招募來後再被 Mec1 磷酸化，而繼續啟動下游基因表現。Rad53 能調控的基因非常廣泛，例如在 cell cycle arrest 部分，Rad53 能透過磷酸化，抑制 Cdc5 的功能，影響紡錘絲的形成。Rad53 也可以抑制 Exo1 的活性，Exo1 在細胞週期中的聯會互換中扮演極重要的腳色，當 Exo1 被抑制便會影響細胞週期的進行。除此之外，Rad53 還會影響 ATP-dependent DNA helicase Pif1 和 Rrm3 的活性對於 replication fork stability 非常重要。而在 transcriptional response 部分，Rad53 也會影響 Swi6 和 Nrm1 等 transcriptional factor 的活性，進而調控細胞週期中 G1/S phase 時的基因轉錄。另外，Rad53 也能抑制 Sld3 與 Dbf4 來影響 DNA 複製的修復。

過去研究試圖透過遺傳學和分子生物技術探討 Chk2/Rad53 下游調控的分子機制，卻始終無法達成這個目標，因為 Chk2/Rad53 同時調控「多項」細胞中的重要機制，因此過去所找到「單一」的下游基因無法修復或是取代其所扮演的角色。而我們

的研究希望能開發並運用合成生物學的 *PRISM* 技術，找出 Chk2/Rad53 調控的下游基因網絡，使我們對 DNA 複雜的修復機制有更完整的了解。

四、利用 CRISPR/Cas 分析基因網絡

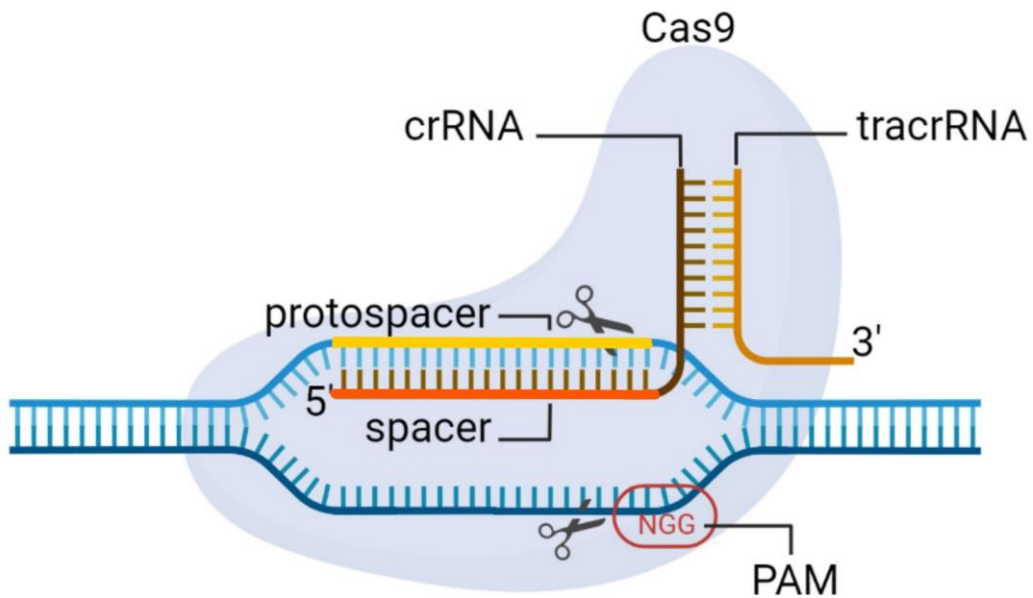
許多細菌都保留有 CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat) 功能，它是細菌免疫系統的一種機制，可以記憶曾經來犯的病毒。當病毒入侵細菌後，病毒會將自己的 DNA 留在細菌中，而細菌的 CRISPR 機制中的 Cas9 是一種可以剪切 DNA 的蛋白質，便會剪開病毒的一小段 DNA，並以病毒的 DNA 片段當模板，打造一條互補的 guide RNA (gRNA)，使病菌含有曾經攻擊過該細菌的病毒的基因片段。當病毒第二次入侵，細菌便能比對新病毒 DNA 片段，如果可以互補，表示新舊病毒相同，使細菌可以透過這些基因片段來偵測並抵抗相同病毒的攻擊，並摧毀其 DNA。CRISPR 透過複合體中的 gRNA 序列快速地辨認目標 DNA 的其中一股 protospacer 序列，在互補股中的 PAM 序列(protospacer adjacent motif)亦可輔助 Cas9 的切點辨認，之後 Cas9 酵素剪輯對應的 DNA。由於此特性的便利，近年來 CRISPR/Cas9 便成了一種基因編輯技術，使我們可以準確且有效地編輯生命體內的部分基因。

五、PRISM 基因篩選技術

我們的實驗主要建構在 *PRISM* 技術上，*PRISM* 的原理應用來自於 CRISPR 的 off-target 脫靶效應。在 CRISPR 編輯基因的過程，同時需要 gRNA 辨認目標 DNA 以及 Cas9 在互補股的 PAM 位置辨認結合，才可以造成 DNA 雙股的斷裂。其中 Cas9 以 PAM-interacting (PI) domain 辨識出一段三個核苷酸的序列 PAM (NGG) (Figure 3A)，gRNA (長度約 20bp) 貼附在 PAM sequence 的另外一股上面，如果能大致吻合，便會刺激剪切蛋白 (Cas9) 破壞這段序列。目前的研究指出 gRNA 只要部分序列 (長度

約 12bp) 吻合便可，於是會出現剪切不精確的問題稱之為 **off-target** 脫靶效應，*PRISM* 利用 **off-target** 辨認不精確的特性而達到辨認不同的序列。

(a)



(b)

| N | A | T | C | G |
|---|------------|-----|-----|------------|
| A | NAA | NTA | NCA | NGA |
| T | NAT | NTT | NCT | NGT |
| C | NAC | NTC | NCC | NGC |
| G | NAG | NTG | NCG | NGG |

(圖 3-a):CRISPR 透過 gRNA spacer 辨認 DNA 的其中一股 protospacer，而 PAM 序列可以輔助 Cas9 的切點辨認，剪輯互補股的 DNA，造成 DNA 的雙股斷裂。

(圖 3-b):原始的 Cas9 只會辨認 NGG 序列，而經過更改 PI domain 的氨基酸序列後，本研究成功找到辨認 NAG 序列的組合，希望未來能找到認 NGC、NCT、NAG... 等序列，甚至是 NNN 的 CRISPR 序列。

我們將 CRISPR 和轉錄因子(transcriptional factor; TF)結合，所設計的 crisprTF 系統不具有切割 DNA 功能但具有轉錄的功能，而 *PRISM* 正利用了 CRISPR 中 off-target 的特性使其可以認到多個基因，進而觀察是否有開啟到我們想要開啟的基因功能，這樣一來便可以用來探討與重建 Chk2/Rad53 調控的複雜基因網絡。目前 *PRISM* 技術仍有辨認基因數量與種類限制，譬如 PAM 必須為 NGG 序列，我們的研究的首要目標便是創造新一代的 *PRISM v2.x*，提高其基因篩選效率與規模。

六、研究問題與目的

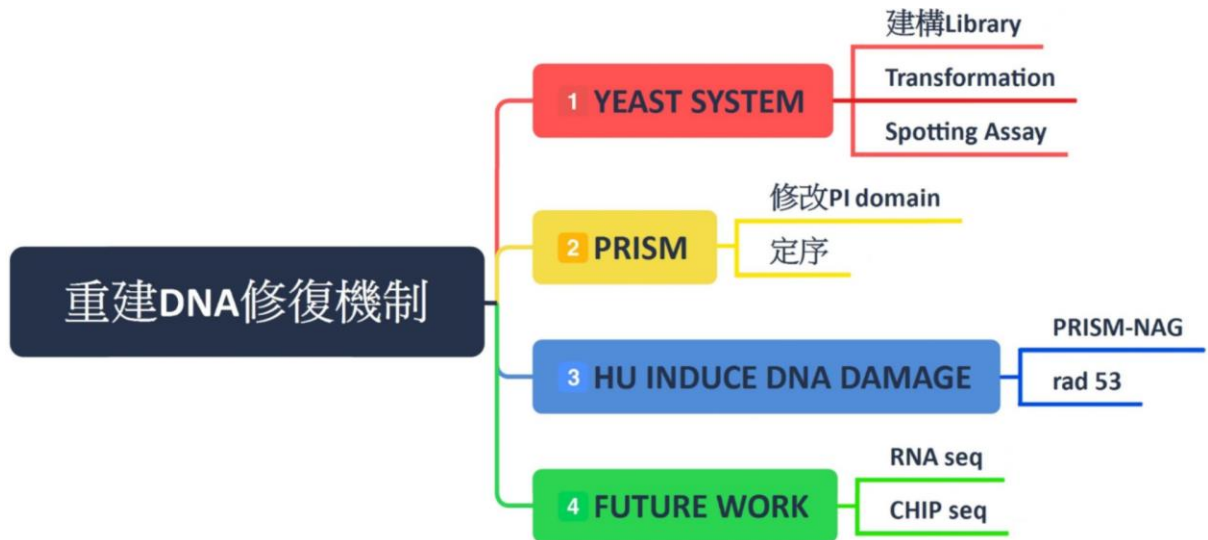
我們為了提高現有 *PRISM* 的功能，我們的首要目標是嘗試變換 PI domain 的氨基酸 1216~1221 及氨基酸 1333~1335，這些氨基酸是決定辨認 NGG 的重要位置，我們將此位置各種排列組合的 DNA 序列放入酵母菌，希望能合成辨認 NGC、NCT、和 NAG 的 CRISPR/Cas，降低基因篩選過程中 NGG 辨認的限制，最後再利用提高效率的 *PRISM v2.x* 找出 Chk2/Rad53 參與的 DNA 修復機制。

挑戰問題一：Chk2/Rad53 同時控制多種複雜的機制，因此傳統單一基因調控的分子技術無法重建其控制的基因網絡，我們將以 *PRISM* 技術課克服。

挑戰問題二：現有 *PRISM* 技術受到 NGG 序列的侷限，我們將增加 *PRISM* 技術的篩選能力。

貳、研究過程與方法

一、實驗流程圖



(圖 4):為重建 DNA 修復機制，Yeast system 中，先建構 Library，再將 Library Transformation，轉植於 Yeast 中，並將培養出的菌株進行 Spotting Assay，比較齊聲長效率的高低，而 PRISM(Perturbing Regulatory Interactions by Synthetic Modulators)中，修改 Cas 9 的 PI domain，並將其定序，為了探討 Rad53 所調控的基因網絡，加入 HU(Hydroxyurea)造成 DNA 損傷，探討更改成 PRISM-NAG 的系統是否能成功開啟修復機制，挽救 DNA 損傷。

二、研究設備與藥品

(一) 設備

| | | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------|----------------------------|-------------------------|
| Centrifuge 5424R, Eppendorf | Vortex, scientific industries | Suction machine, Rocker | Pipetman, Gilson | Low-temp incubator, TKS |
| Nanodrop Lite, Thermofisher Scientific | 1.5ml Eppendorf, ExtraGene | PCR tube, ExtraGene | PCR machine, Analytik Jena | Petri Dish, ExtraGene |
| Water Bath, TKS | | | | |

(二) 化學藥品

| | | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| Polyethylene Glycol 3350 (PEG 3350), Sigma | Lithium Acetate (LiAc), Sigma | Doxycycline (Dox), Sigma | Hydroxyurea (HU), Cyrus | Sodium Hydroxide (NaOH), Cyrus |
| 3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT), Sigma | | | | |

(三) 酵母菌菌種

| 菌株 | 基因型 | 來源 |
|------|---|------------------------|
| M555 | <i>MAT a trp1-901 leu2-3, -112 ura3-52 his3-200 gal4Δ gal80Δ LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2met2::GAL7-lacZ</i> | James et al., 1996 |
| M517 | <i>W303 MAT a rad53-1</i> | Cabrielse et al., 2006 |

(四) DNA 質體

| |
|---|
| pRS416-pTetON--dCas9-VP64-gRNA- NGG |
| pRS416-pTetON--dCas9-VP64-gRNA-NAG |
| pRS416-pTetON--dCas9-PI-1216-AfalII/ClaI-1221-VP64-gRNA |

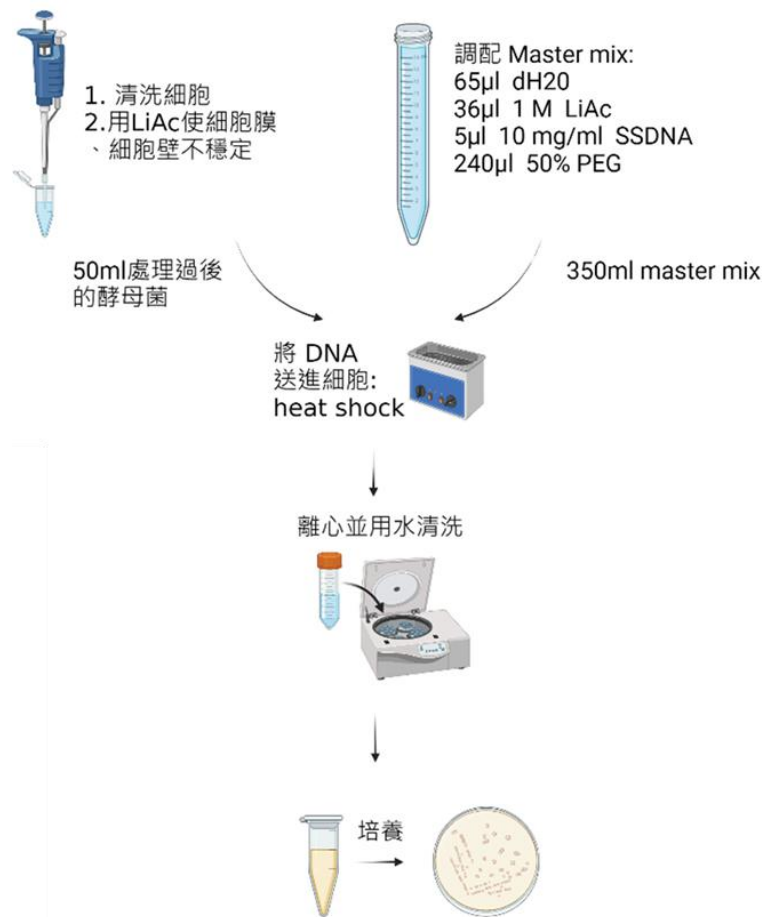
(五) 核酸引子

| | |
|---------------------|--|
| dCas9-Q1221-bb-F | 5'-AAGGGTAATGAATTGGCTTTGCC-3' |
| dCas9-S1216-bb-R | 5'-AGCCAACATTCTCTTTCTACCATTT TC-3' |
| dCas9-R1335-bb-F | 5'-TACACCTCTACCAAAGAAGTTTTGGAC-3' |
| Cas9-R1333-bb-R | 5'-GTCGATAGTGGTATCGAAATACTTAAAAGC-3' |
| Cas9-1216NNK1221_F2 | 5'GTTTGTTTCGAATTGGAAAATGGTAGAAAGAGAATGTTGGCTNNKNNKNNKNNKNNKNNKAA GGGTAATGAATTGGCTTTGCCATCCAAGTACGTTAATTT-3' |
| PI-1333NNK1335_F | 5'GTGCTCCAGCTGCTTTTAAGTATTTGATACCACTATCGACNNKAAGNNKTACACCTCTACCAA AGAAGTTTTGGACGCTACTTTGATCC-3' |

三、研究方法與步驟

(一) 酵母菌的轉型作 - Yeast transformation

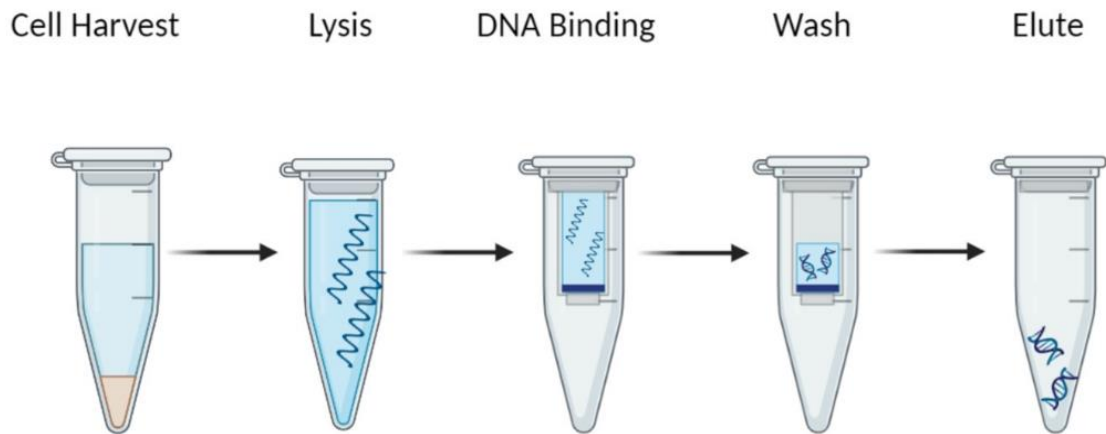
我們的研究中以出芽酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae*)為模式生物，利用 Lithium Acetate 鹼性的陰離子加上冷熱(42°heat-shock)快速地處理細胞，可使酵母菌的細胞外殼發生變化可將 *PRISM* 的質體 DNA 進入細胞外並表現之。



(圖 5)：將欲轉型之細胞以 40ml 液態培養基培養於 30 度隔夜，隔日將細胞以 4000rpm 離心 3 分鐘，並以二次水沖洗以及離心將液態培養基去除。接著加入 1ml 0.1M Lithium acetate (LiAc)培養 30 分鐘於 30 度溫箱。配置轉型所使用 MasterMix，內含 36mL 1M LiAc、5mL 10mg/mL ssDNA、以及 240mL 50% PEG 3350，並與 1µg/ul 之質體 DNA 以及 50ul 細胞混合，培養於 30 度之烘箱 40 分鐘。接著用 42 度水浴槽熱休克酵母菌 20 分鐘，並將菌均勻塗在選擇性培養基上。

(二) 抽取質體 DNA - Plasmid extract

我們利用 silica-based membrane spin column 從 *E. coli* 抽取質體 DNA，純化的 DNA 可直接用於酵素剪切、PCR、和定序等生物學實驗。



(圖 6):抽取質體 DNA 的順序為：蒐集完細胞後，將細胞破壞，使 DNA 離開細胞，並把 DNA 裝在管柱中，最後得到純化的 DNA。

(三) 限制酶剪切 *PRISM* 質體 DNA - Restriction enzyme digestion

我們以基因編輯技術置換 *PRISM* 質體上 PI domain 的氨基酸序列從 1216 到 1221 成 *Afl*III 和 *Cl*I 兩種限制酶切位，以以下列酵素反應建構 PI domain library 所需的 linear vector。

| DNA (1.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) | 2 μl (about 2.5 μg) |
|---------------------------------------|--|
| <i>Afl</i> III | 1 μl |
| <i>Cl</i> I | 1 μl |
| 10x cutsmart buffer | 2 μl |
| ddH ₂ O | 14 μl |
| Total | 20 μl |

(四) 聚合酶連鎖反應 - Polymerase chain reaction (PCR)

我們也同時設計專一性的 primers(dCas9-Q1221-bb-F & dCas9-Q1221-bb-R)以下列 PCR 反應準備 PI domain library 所需的 linear vector。首先以少量的 *PRISM* 質體以及 primers 升溫使其 DNA 打開，接著降溫使 primers 接到 DNA 上，最後再升溫到酵素活性最大的溫度，使其進行 extension，將此循環重複 n 次，得到 2^n 次方的 DNA。

| DNA (50µg/µl) | primer (25µM) | 2x Phusion master mix | ddH2O | Total | |
|---------------|---------------|-----------------------|--------|--------|------|
| 1 µl | 1 µl | 10 µl | 8 µl | 20 µl | |
| 98 °C | 98 °C | 60 °C | 72 °C | 72 °C | 4 °C |
| 1 min | 30 sec | 30 sec | 18 min | 18 min | ∞ |
| | 35 cycles | | | | |

(五) 酵母菌株 DNA 複製 - Colony PCR

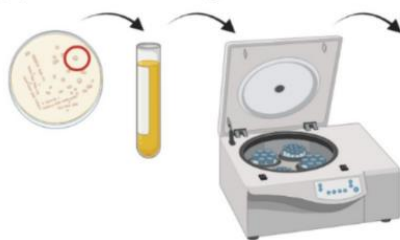
我們得到有高效率的 *PRISM v2.x* 後，我們必須將其 PI domain 的 DNA 以 PCR 反應獲得足夠的 DNA 以做定序。

| | | | | | |
|-----------|-------|------|-------|-------|------|
| 94 °C | 94 °C | 55°C | 72 °C | 72 °C | 4 °C |
| 3min | 5 sec | 1min | 1 min | 2 min | ∞ |
| 35 cycles | | | | | |

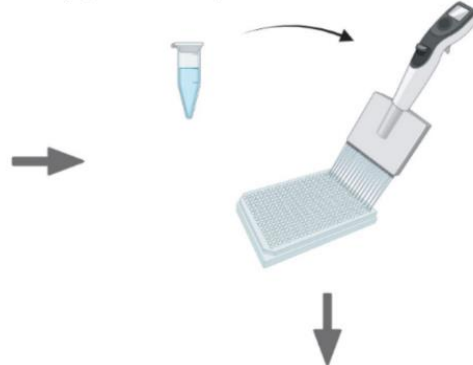
(六) 酵母菌的生長定量分析- Spotting assays

逐步稀釋培養的菌種，在每次稀釋中樣品及溶劑的比例相同，可產生呈幾何級數的稀釋濃度，再讓酵母菌點在不同的培養皿上生長，其目的在於測試與比較不同酵母菌株的生長性狀。

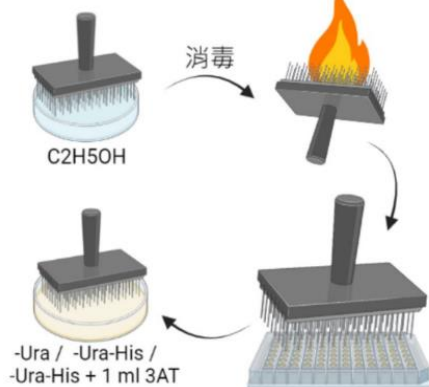
(1) 培養strain: overnight 並離心



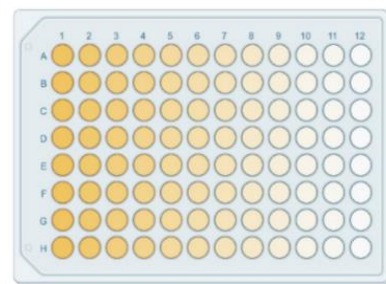
(2) 用水 resuspend 後，將 solution 移至 96 well plate



(4) 將 spotter 以 C₂H₅OH 消毒後，把 spotter 沾上 solution，蓋於各培養皿中



(3) 將第一列中取出 20µl 的 solution 到第二列，並立刻 pipetting 五次，第三列到第六列依此類推



(圖 7):Spotting assays 流程圖, 首先, 由培養中選好的菌株培養 overnight, 並離心, 其次, 用水使其沖洗後, 將混合後的液體移至含有 96 格的 plate 中, 並取出第一列 20 μ l 的混合液放到第二列中, 立刻 pipetting 五次, 避免菌株沉積於底部, 而第三列到第六列依此類推, 進行序列稀釋, 最後, 將 spotter 以酒精消毒後, 放入 96 格的 plate 中, 取出並蓋在培養皿(-Ura/-Ura-His/-Ura-His+1ml 3AT) 上。

(七) 酵母菌生長的培養基 - Synthetic complete medium (SCM)

酵母菌之選擇性培養基, 可依照 plasmid 所帶有的 selection marker 而調整胺基酸種類。添加 0.67% Bacto-yeast nitrogen base, 2% glucose 以及各種酵母菌之必須胺基酸, 若要配置固體培養基, 則再加入 2% Agar。經過高壓及高溫 121 度以上滅菌後, 此時待冷卻至 55 度左右時, 方可加入所需胺基酸與藥品 (如 3-AT, HU, Dox 等)。

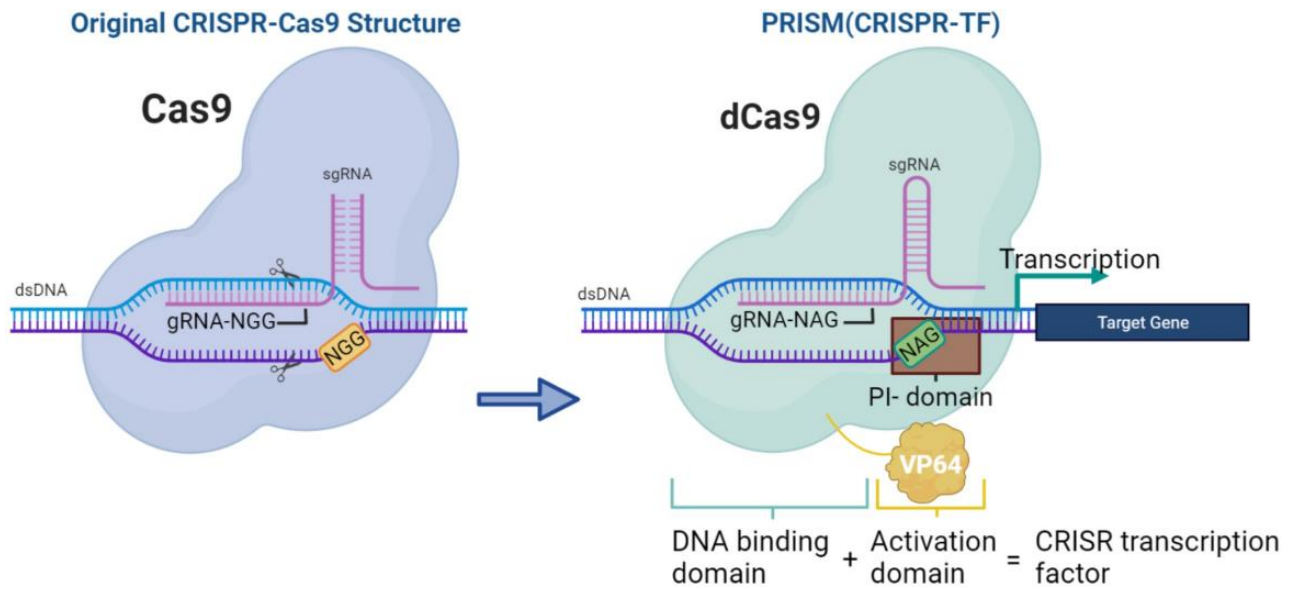
參、研究結果與討論

一、設計新一代的基因組篩選平台 *PRISM v2.x*

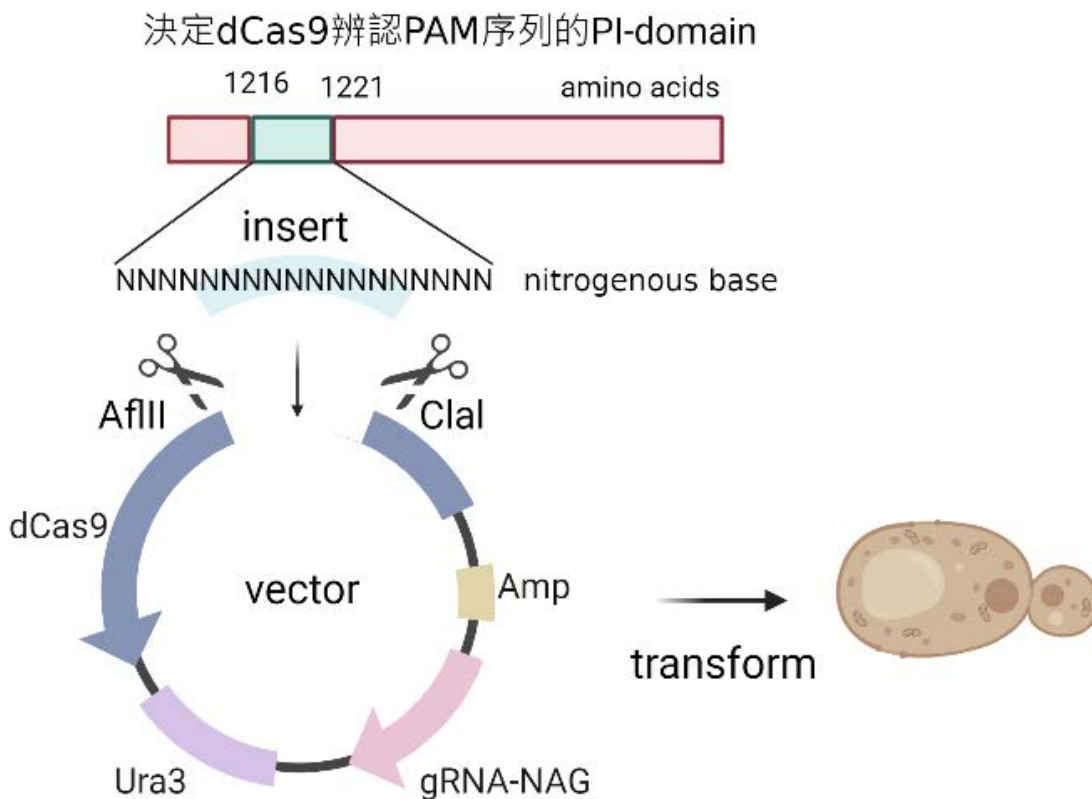
由於先前的 *PRISM1.0* 的技術在辨認 PAM 時有的 NGG 序列限制，因此我們希望能藉由更改 PI domain 的序列使 *crisprTF* 辨認其他 15 種的 PAM 序列(NNN)。本實驗中，我們將 Cas9 上的內切酶的功能移除(D10A & H841A)形成 dCas9 (dead Cas9)，其只具有 DNA binding 的能力，但無法剪切 DNA。此外並接上 VP64 轉錄因子的 activation domain，dCas9 與 VP64 兩者相輔形成的合成轉錄因子能啟動或抑制下游基因的表現，我們稱作 CRISPR transcription factors (*crisprTF*)。(圖 8)

為了使 *crisprTF* 能辨認到其他 PAM sequence，其中我們將 dCas9 辨認 PAM 序列的 PI-domain (1200-1368) 中重要位置 1216-1221 的氨基酸序列做系統性的更換，我們其稱為 PI domain library，為後續實驗所稱的“insert”。並將原先建構的 *PRISM* 質體分別利用 PCR 或 *AvrII* 與 *Clal* 酵素切成 linear DNA，此為實驗用之“vector”擁有合成 Uracil(Ura)的基因片段以及 *crisprTF* 的基因片段，我們將 insert 與 vector 送入酵母菌細胞連接為環狀的 *PRISM* 質體進行表現。(圖 9)

在質體上也包含本次實驗使用的 gRNA-NGG 或 gRNA-NAG，此兩種 gRNAs 皆可以辨認參與必需胺基酸 Histidine(His)合成基因的 promoter，但現有的 *crisprTF* 只能藉由 gRNA-NGG 去辨認 PAM-NGG，進而啟動 HIS3 基因的表現產生 histidine，當酵母菌再沒有 histidine(His)的培養基時仍可以生長。反之，*crisprTF* 則無法藉由 gRNA-NAG 去啟動 HIS3 基因，因此無法再 SCM-Ura-His 的培養基上生長。我們的實驗目的是希望藉由改變 PI domain 讓 *crisprTF* 能利用 gRNA-NAG 啟動 HIS3 基因的表現，最後能再 SCM-Ura-His 的培養基上生長。(圖 10)

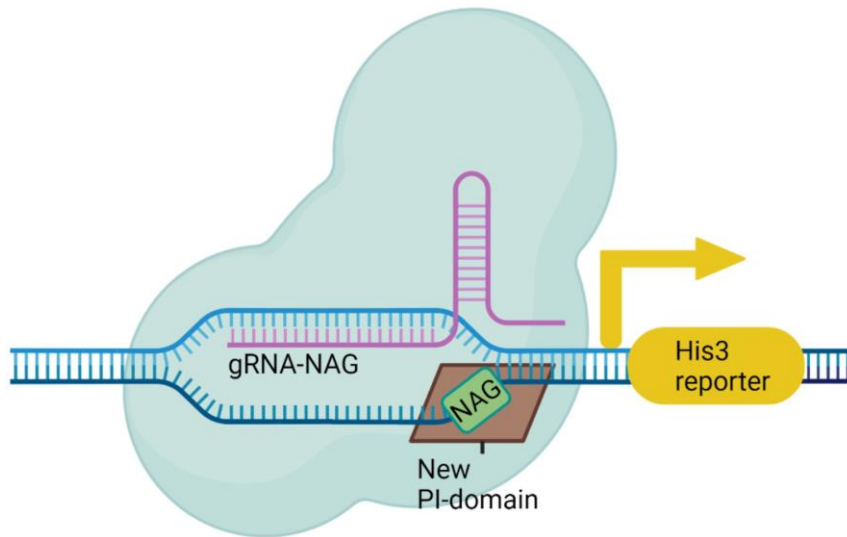


(圖 8)由 crisper/cas9 發展出 Crispr-TF(PRISM)的技術



(圖 9): vector: dCas9、Ura3、gRNA-NAG、Amp

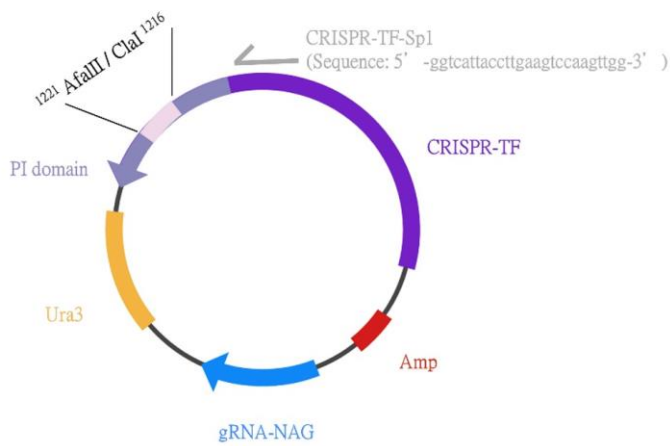
insert: 18 個含氮鹼基的隨機序列



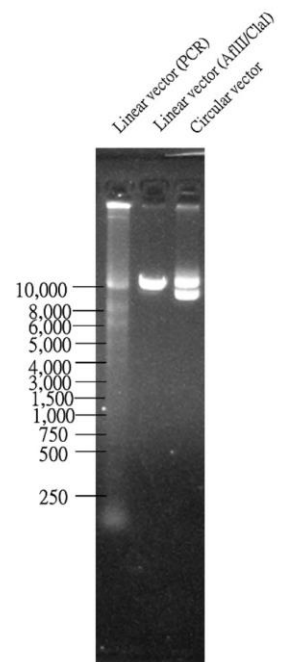
(圖 10):New PI domain 和 NAG 辨認的示意圖

實驗結果一：PRISM 質體的準備與測試

(a)



(b)

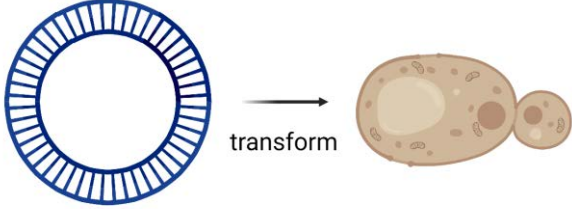
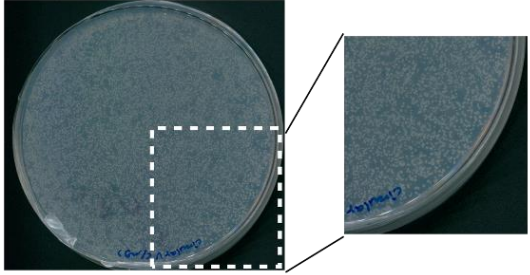
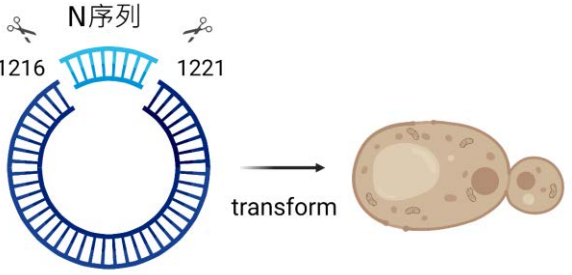
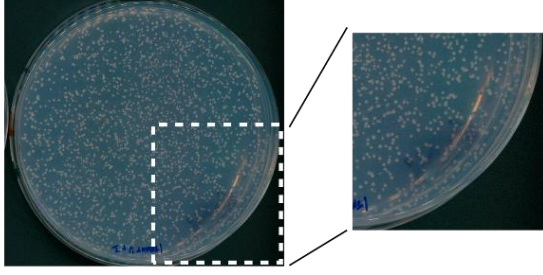


(圖 11-a): vector :Ura+CRISPR-TF* 及 insert: 新的 PI-domain 胺基酸位置 1216-1221 的各種隨機排列組合(random library)。

(圖 11-b): 跑膠確認 circular vector 大小為 10Kb、8Kb，以限制酶 AvrII 及 ClaI 處理後的 linear vector 大小為 10Kb。

實驗結果二：建構與篩選 PI domain library

為了測試是否成功建立 random library，將酵母菌放在沒有 Ura 的培養皿上，而在上一步驟，已把含有合成 Ura 基因的質體 transform 進酵母菌中，若成功獲得質體，便能在沒有 Ura 的培養基中長出菌落。

| | |
|---|--|
| <p>A 組: circular vector</p>  <p>將含有合成 Ura 的質體送進酵母菌</p> <p>The diagram shows a blue circular plasmid with a barcode-like pattern of vertical lines. An arrow labeled 'transform' points to a brown yeast cell with internal organelles. Below the diagram, the text reads '將含有合成 Ura 的質體送進酵母菌'.</p> |  <p>質體有順利送進細胞，長出菌落約為 500-1000 個。</p> <p>The image shows a petri dish with a dense lawn of yeast growth. A dashed white box highlights a section, which is magnified in an inset to the right, showing individual yeast colonies.</p> |
| <p>B 組: linear vector+insert</p>  <p>將用酵素切出的 vector(含有合成 Ura 的基因)與 1216-1221 胺基酸隨機序列的 insert 送進酵母菌</p> <p>The diagram shows a blue circular plasmid with a barcode-like pattern. Two scissors are shown cutting the plasmid at positions 1216 and 1221. A blue segment labeled 'N序列' is shown above the cut. An arrow labeled 'transform' points to a brown yeast cell. Below the diagram, the text reads '將用酵素切出的 vector(含有合成 Ura 的基因)與 1216-1221 胺基酸隨機序列的 insert 送進酵母菌'.</p> |  <p>由於質體有送進去酵母菌，insert 及 vector 也有成功連接，長出的菌落約為 100 個菌落。</p> <p>The image shows a petri dish with sparse yeast growth. A dashed white box highlights a section, which is magnified in an inset to the right, showing individual yeast colonies.</p> |

C 組: linear vector

將用酵素切出的 vector(linear DNA)送進酵母菌

此時有 self-ligation 的可能性，長出的菌落為 background，約為 10 個菌落。

D 組: Negative control

沒有將質體送進酵母菌

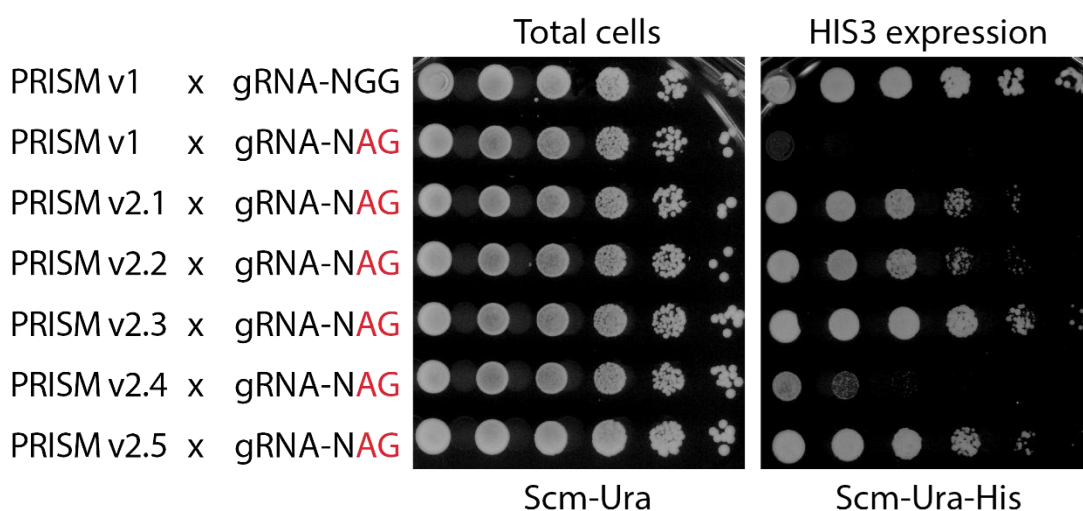
沒有 Ura 基因，無法生長出菌落，代表過程中沒有受到污染。

| | A 組 | B 組 | C 組 | D 組 |
|----------------|-------------|-----------|-----------|-----|
| insert | - | + | - | - |
| vector | +(circular) | +(linear) | +(linear) | - |
| colony -Ura | + | + | + | - |

(圖 12): A 組送進 circular DNA，長出 500-1000 個菌落。B 組送進 insert 與 vector，長出約 100 個菌落。C 組送進 linear DNA，長出約為 10 個菌落。D 組沒有質體，無碼長出菌落。

實驗結果三：驗證篩選出的 crisprTF 與 gRNA-NAG

在上一步驟中 -Ura -His 培養基中存活的酵母菌中，挑出五個做生存效率分析。從建立的 library 中挑出可存活的 candidates，以 1:10 序列稀釋的方式分析 5 個 candidate 生長的效率差異，每種菌塗 2 種培養盤，在 SCM-Ura 培養盤中，所有的酵母菌皆可存活(total cell)。在 SCM-Ura-His 培養盤中，序列稀釋的酵母菌的存活將因為有差異的結合效能而有所不同(detection)由此結果中挑出生長最好的酵母菌，抽出質體 DNA 後做定序。



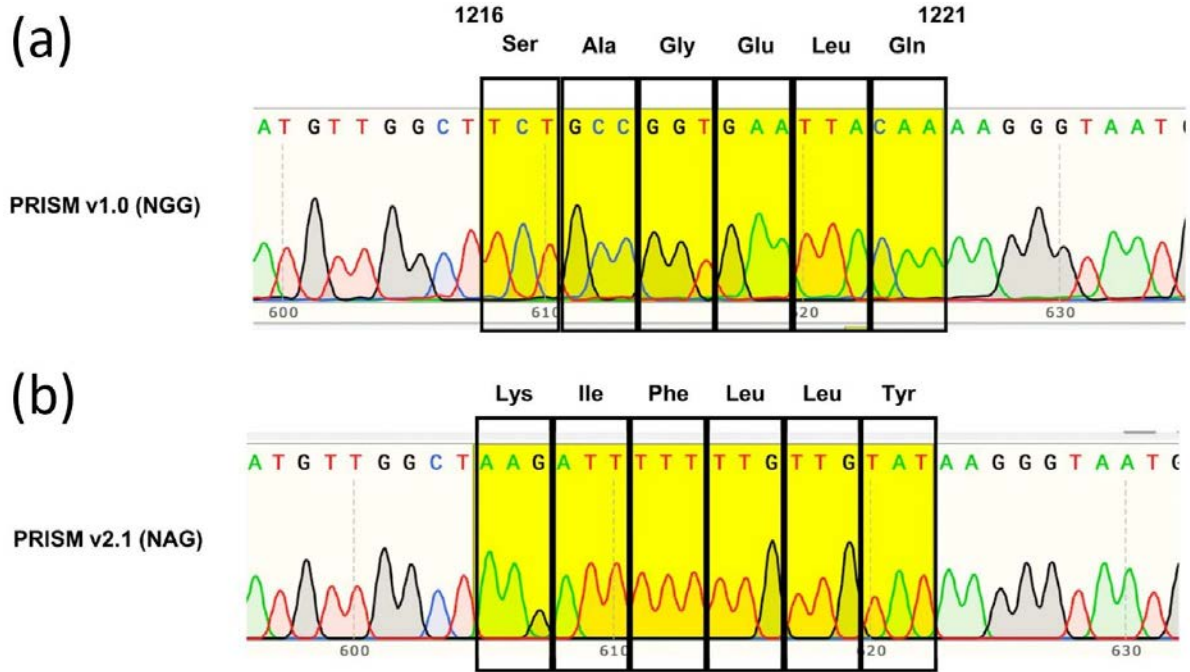
(圖 13): 1 組與 2 組分別為 positive 與 negative control，其後 3 到 7 組將會挑效率較高的定序

| | | | |
|-----|----------|---------------------------------------|--|
| 1 組 | gRNA-NGG | positive: Wild type-Cas9: PRISM v1 | dCas9 與 gRNA-NGG 共同辨認 PAM 序列-NGG，轉錄下游基因產生 His。 |
| 2 組 | gRNA-NAG | negative: | dCas9 辨認 NGG 而 gRNA-NAG 辨認 |

| | | | |
|-----|----------|--------------------------|--|
| | | Wild type-Cas9: PRISM v1 | NAG，無法共同辨認 PAM 序列-NGG 或是 NAG。 |
| 3 組 | gRNA-NAG | New-PI: PRISM v2.1 | 更改過 PI-domain 後，能與 gRNA-NAG 有效辨認到 NAG，轉錄下游基因 His。 |
| 4 組 | gRNA-NAG | New-PI: PRISM v2.2 | 更改過 PI-domain 後，能與 gRNA-NAG 有效辨認到 NAG，轉錄下游基因 His。 |
| 5 組 | gRNA-NAG | New-PI: PRISM v2.3 | 更改過 PI-domain 後，能與 gRNA-NAG 有效辨認到 NAG，轉錄下游基因 His。 |
| 6 組 | gRNA-NAG | New-PI: PRISM v2.4 | 更改過 PI-domain 後，無法與 gRNA-NAG 有效辨認到 NAG，轉錄下游基因 His。 |
| 7 組 | gRNA-NAG | New-PI: PRISM v2.5 | 更改過 PI-domain 後，能與 gRNA-NAG 有效辨認到 NAG，轉錄下游基因 His。 |

實驗結果四：Sanger 定序結果

Spotting 的結果中挑出存活效率佳的酵母菌，經過 DNA 萃取定序後，我們可以看到 *dcas9* 在位於 PAM 互動區的 PI domain 胺基酸 1216-1221 經過更改後的序列為：KIFLLY，此改變能結合在 NAG 序列的 PAM 上。圖 14-a 是未經改過 *dCas9* 的 1216-1221 的氨基酸序列，圖 14-b 為改過的 18 的含氮鹼基序列及其對應的 6 個胺基酸序列：KIFLLY。而我們的下個步驟便是去探討此序列如何與 NAG 結合並檢驗使否此經過修改的變體能確實有效率的結合在互補股中的 PAM 序列- NAG。

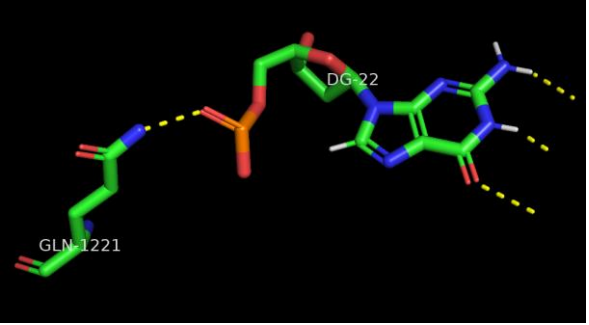
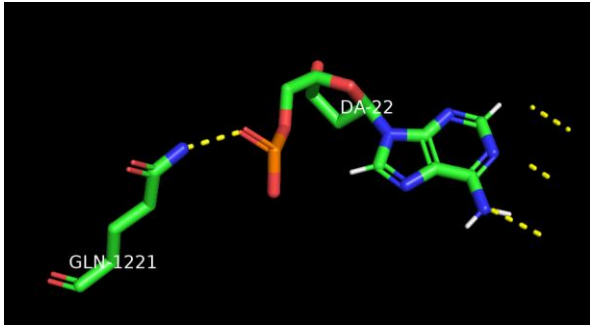
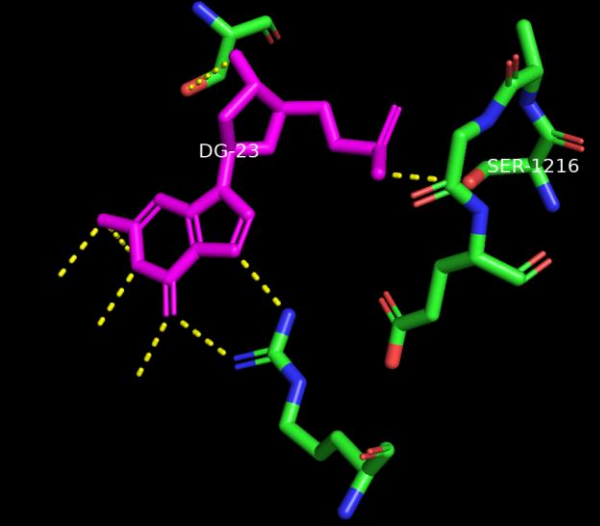
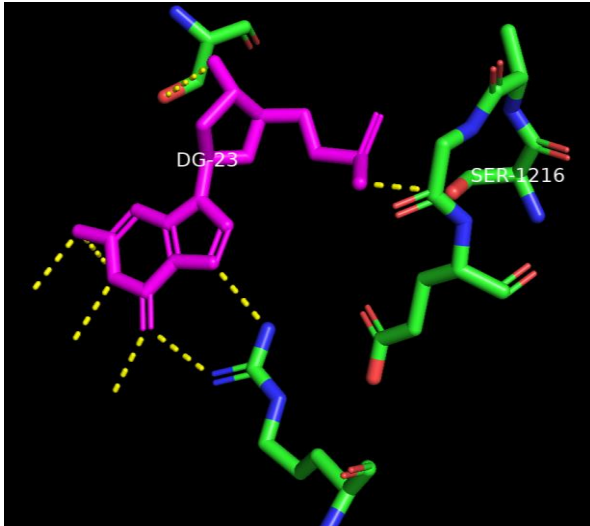


(圖 14): 酵母菌 DNA 定序結果與對應胺基酸的改變

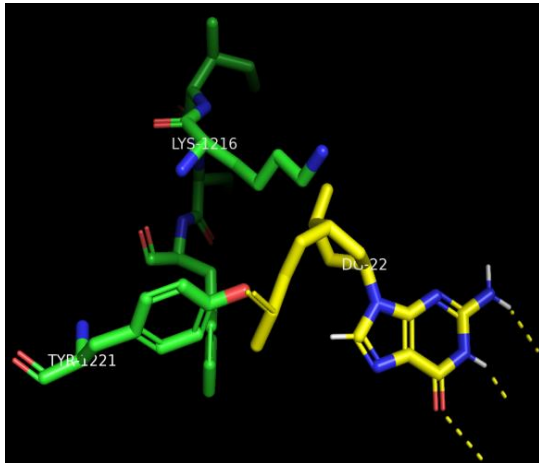
(圖 14-a): 為原始 Cas9 的胺基酸 1216-1221 序列: SAGELQ

(圖 14-b): 為改過 dCas9 的胺基酸 1216-1221 序列: KIFLLY

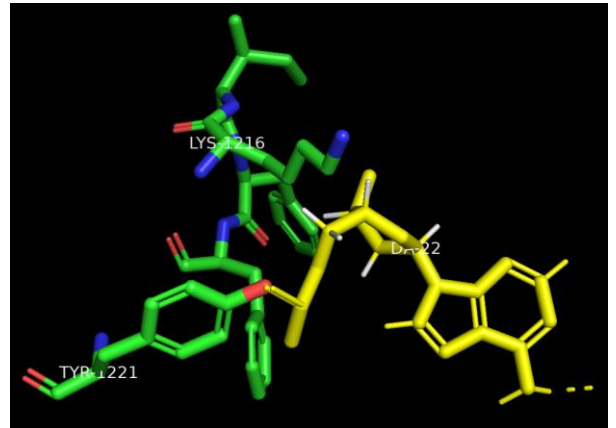
實驗結果五：利用 PyMol 進行結構分析

| | |
|--|---|
| SAGELQ x NGG | SAGELQ x NAG |
| <p>(a)NGG</p>  | <p>(b)NAG</p>  |
| <p>(c)NGG</p>  | <p>(d)NAG</p>  |
| KIFLLY x NGG | KIFLLY x NAG |

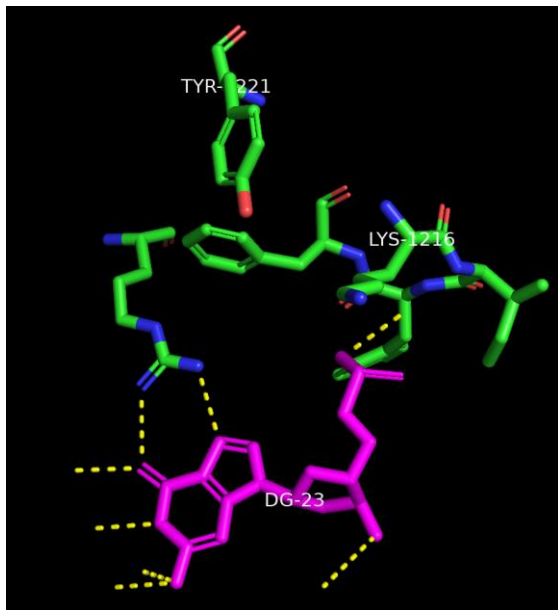
(e)NGG



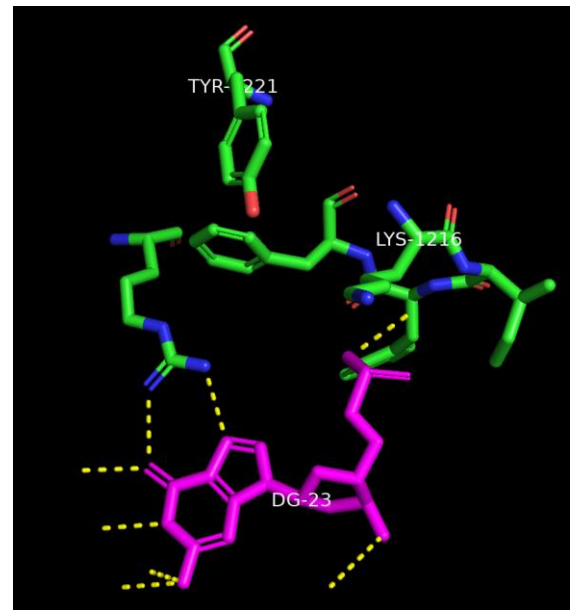
(f)NAG



(g)NGG



(h)NAG



PyMol 演示了不同 PI 結構與 PAM sequence 的 interaction。PI 1216-1221 wild type SAGELQ 與 NAG 和 NGG 上的 A 和 G 都有較好的結合；而從突變過後的 PI 1216-1221 KIFFLY 與 PAM sequence 的圖中可以看到 1221 號的 tyrosine 和 1216 號的 lysine 還是與 A 或 G closely interact。

原本的 PI 和改過的 PI 與對應辨認序列的互動

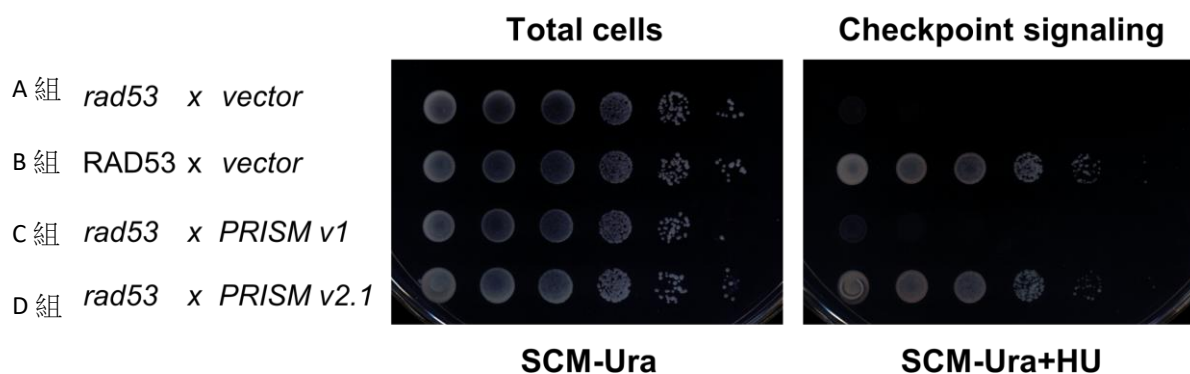
(圖 15-abcd):(a)是 NGG 中 2 號位置 G 的鍵結圖，(c)是 NGG 中 3 號位置 G 的鍵結圖，顯示 WT-SAGELQ，可辨認 NGG，形成鍵結，而(b)顯示 WT-SAGELQ 無法與 NAG 中的 A 形成鍵結，(d)是 NAG 中 G 的鍵結圖，因此，WT-SAGELQ 可辨認 NGG，無法辨認 NAG。

(圖 15-efgh):(e)是 NGG 中 2 號位置的 G，無法形成鍵結，(g)是 NGG 中 3 號位置 G 的鍵結圖，顯示更改成 KIFLLY 的 PI domain 無法辨認 NGG，(f)是 NAG 中 A 的鍵結圖，(h)是 NGG 中 3 號位置 G 的鍵結圖，顯示更改成 KIFLLY 的 PI domain 可以辨認 NAG。因此，更改成 KIFLLY 的 PI domain 可以辨認 NAG，無法辨認 NGG。

二、利用 *PRISM v2.x* 重建 Rad53 參與 DNA 修復的基因網絡

我們用化學試劑 Hydroxyurea(HU)模擬細胞在複製過程中產生的 DNA 損傷，帶有 Rad53 突變的酵母菌株(M517 *rad53*)因為無法啟動 checkpoint signaling 的機制，因此無法在加有 HU 的培養基(SCM+HU)生長，我將 *PRISM v2.x* 的質體在此菌株中表現，並成功挑選出多株能在加有 HU 的培養基上生長，說明 *PRISM v2.x* 成功取代並重組 Rad53 參與的調控網絡，將來我們將進一步利用 ChIP-seq (chromatin immunoprecipitation)與 RNA-seq (RNA expression profiling)等技術驗證此基因網絡。

實驗結果六：修復 Hydroxyurea(HU)造成的 DNA 損傷

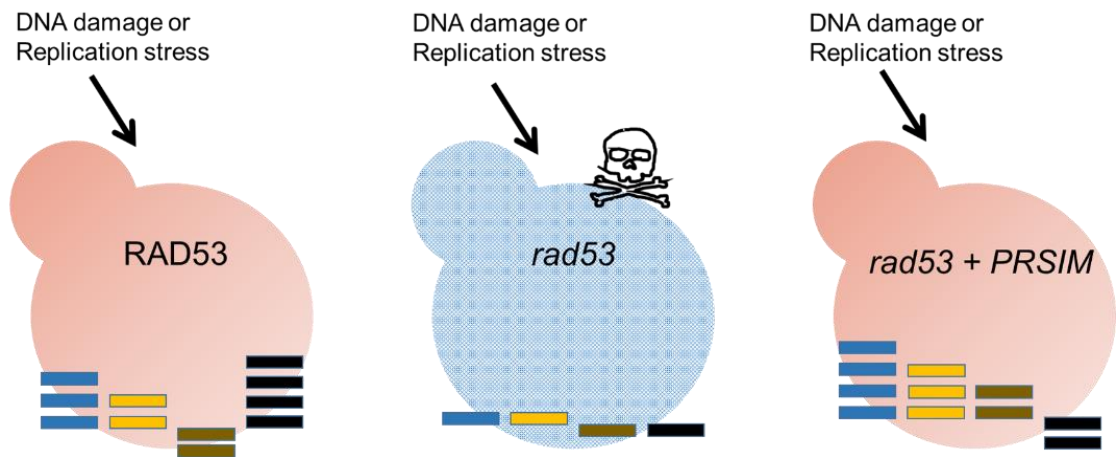


(圖 16): A 組放入 mutated *rad53* 的酵母菌，在 HU 中無法存活。B 組放入的酵母菌擁有完整功能的 *rad53*，在 HU 中存活。C 組放入 mutated *rad53* 與 *PRISM v1*，在 HU 中無法存活。D 組放入 mutated *rad53* 與 *PRISM v2.1*，在 HU 中存活。

| | | | |
|-----|----------------------|-------------------|--|
| A 組 | mutated <i>rad53</i> | 含有合成 Ura 的 vector | 將酵母菌的 <i>rad53</i> 突變而使其不具調控 DNA repair 的功能，並加入 HU 阻礙 DNA 的合成，造成 DNA damage，而無法存活 |
| B 組 | <i>rad53</i> | 含有合成 Ura 的 vector | 放入擁有功能良好 <i>rad53</i> 的酵母菌，便能使 <i>rad53</i> 在 DNA damage 的情況下調控 DNA repair，並在有 HU 的情況下存活下來。 |
| C 組 | mutated <i>rad53</i> | <i>PRISM v1</i> | 將酵母菌的 <i>rad53</i> 突變，並加入 HU 以及 wild type CRISPR-TF，由於 PAM 的限制，只能認到 NGG，沒有完整取代 <i>rad53</i> 調控下游基因的功能，無法擁有完整的 DNA repair，造成 DNA damage |

| | | | |
|-----|---------------|------------|--|
| D 組 | mutated rad53 | PRISM v2.1 | 將酵母菌的 rad53 突變，並加入 HU、wild type/ mutated CRISPR-TF 以及 sgRNA library，由於降低了 PAM 的限制，若能完整取代 rad53 調控下游基因的功能，擁有完整的 DNA repair，便能使酵母菌進行 DNA repair 並在有 HU 的情況下存活下來。 |
|-----|---------------|------------|--|

Future works：探討 Rad53 所調控的基因網絡



(圖 17):利用 RNA-seq、ChIP-seq 等技術分析 RAD53 與 *rad53+PRISM* 裡面基因表現的差異，期待找出完整的 DNA 修復網絡基因組合。

肆、結論與應用

- 一、我們的研究和實驗主要是為了探討造成人類複雜疾病的基因網絡，特別是要找出參與 DNA 修復的基因調控，但是，由於 DNA 修復的機制過於複雜，已知參與 DNA 修復的基因已有數百多個，就目前的技術來找出完整的基因組合的效率不夠高也極為費時，所以我們運用 "*PRISM*" 的技術來準確且高效率地找出複雜網絡中的基因組合。
- 二、由於現行的 CRISPR/Cas 和 *PRISM* 技術接受到的 PAM 序列的限制，必須先辨認到 NGG，以往的嘗試中 *PRISM* 僅能找出基因網絡中近一百多個基因，在此研究中我們嘗試讓 CRISPR/Cas 和 *PRISM* 能辨識到 NGG 之外的序列，我們以 NAG 為例開發出新一代的基因網絡篩選平台名為 *PRISM v2.x*，將來我們將可以此策略讓 *PRISM* 辨識其他不同的 PAM 序列，此技術將能擴大基因篩選的範圍至數千個，將有利於探討複雜基因網絡影響的疾病機制。
- 三、因為酵母菌與人類基因體大多數的基因擁有同源的特性，我們利用酵母菌做為實驗的生物模式，其中人類的 Chk2 和酵母菌的 Rad53 在 checkpoint signaling 中扮演極為重要的角色，我們在 HU 的實驗中成功以 *PRISM v2.x* 恢復 Rad53 缺失所造成的細胞死亡，將來我們仍需要將這項發現在高等生物模式中驗證是否也能修復 Chk2 調控的基因網絡。
- 四、最後，DNA 修復的缺失會造成細胞老化、死亡或是變成癌細胞，透過找出正確的基因網絡並予以調控便能有效解決人類的老化和癌症相關，將來我們也期望我們的 *PRISM v2.x* 技術能應用於其他複雜疾病領域比如腫瘤或癌症的研究。

伍、參考文獻

1. Allison W McClure and John FX Diffley, "Rad53 Checkpoint Kinase Regulation of DNA Replication Fork Rate via Mrc1 Phosphorylation," ed. Bruce Stillman et al., *ELife* 10 (August 13, 2021): e69726, <https://doi.org/10.7554/eLife.69726>.
2. Andrew N. Blackford and Stephen P. Jackson, "ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response," *Molecular Cell* 66, no. 6 (June 2017): 801–17, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.05.015>.
3. Anna Travesa et al., "Repression of G1/S Transcription Is Mediated via Interaction of the GTB Motifs of Nrm1 and Whi5 with Swi6," *Molecular and Cellular Biology* 33, no. 8 (April 2013): 1476–86, <https://doi.org/10.1128/MCB.01333-12>.
4. Bella Kaufman et al., "Haplotypes of the I157T CHEK2 Germline Mutation in Ethnically Diverse Populations," *Familial Cancer* 8, no. 4 (December 2009): 473–78, <https://doi.org/10.1007/s10689-009-9269-1>.
5. Esther C. Morafraille et al., "Checkpoint-Dependent RNR Induction Promotes Fork Restart after Replicative Stress," *Scientific Reports* 5, no. 1 (January 20, 2015): 1–9, <https://doi.org/10.1038/srep07886>.
6. Federico Lazzaro et al., "Checkpoint Mechanisms at the Intersection between DNA Damage and Repair," *DNA Repair, Checkpoint response to DNA damage*, 8, no. 9 (September 2, 2009): 1055–67, <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2009.04.022>.
7. Genevieve M. Vidanes et al., "CDC5 Inhibits the Hyperphosphorylation of the Checkpoint Kinase Rad53, Leading to Checkpoint Adaptation," *PLoS Biology* 8, no. 1 (January 26, 2010): e1000286, <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000286>.

8. M. Valko et al., "Free Radicals, Metals and Antioxidants in Oxidative Stress-Induced Cancer," *Chemico-Biological Interactions* 160, no. 1 (March 10, 2006): 1–40, <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009>.
9. Michael Charles Lanz, Diego Dibitetto, and Marcus Bustamante Smolka, "DNA Damage Kinase Signaling: Checkpoint and Repair at 30 Years," *The EMBO Journal* 38, no. 18 (September 16, 2019), <https://doi.org/10.15252/emj.2019101801>.
10. Midori Shimada and Makoto Nakanishi, "DNA Damage Checkpoints and Cancer," *Journal of Molecular Histology* 37, no. 5 (September 1, 2006): 253–60, <https://doi.org/10.1007/s10735-006-9039-4>.
11. O. Havranek et al., "Alterations of CHEK2 Forkhead-Associated Domain Increase the Risk of Hodgkin Lymphoma," *Neoplasma* 58, no. 5 (2011): 392–95, https://doi.org/10.4149/neo_2011_05_392.
12. Panagiotis Apostolou and Ioannis Papisotiriou, "Current Perspectives on CHEK2 Mutations in Breast Cancer," *Breast Cancer: Targets and Therapy* 9 (May 12, 2017): 331–35, <https://doi.org/10.2147/BCTT.S111394>.
13. Patrick D. Hsu, Eric S. Lander, and Feng Zhang, "Development and Applications of CRISPR-Cas9 for Genome Engineering," *Cell* 157, no. 6 (June 5, 2014): 1262–78, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.010>.
14. Philip Zegerman and John F. X. Diffley, "Checkpoint-Dependent Inhibition of DNA Replication Initiation by Sld3 and Dbf4 Phosphorylation," *Nature* 467, no. 7314 (September 23, 2010): 474–78, <https://doi.org/10.1038/nature09373>.
15. Rotem Sorek, Victor Kunin, and Philip Hugenholtz, "CRISPR — a Widespread System That Provides Acquired Resistance against Phages in Bacteria and Archaea," *Nature Reviews Microbiology* 6, no. 3 (March 2008): 181–86, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1793>.

16. Silvia Emma Rossi et al., “Rad53-Mediated Regulation of Rrm3 and Pif1 DNA Helicases Contributes to Prevention of Aberrant Fork Transitions under Replication Stress,” *Cell Reports* 13, no. 1 (October 6, 2015): 80–92, <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.073>.
17. Susan Elmore, “Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death,” *Toxicologic Pathology* 35, no. 4 (June 1, 2007): 495–516, <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
18. Takehiko Usui, Hideyuki Ogawa, and John H. J. Petrini, “A DNA Damage Response Pathway Controlled by Tel1 and the Mre11 Complex,” *Molecular Cell* 7, no. 6 (June 1, 2001): 1255–66, [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(01\)00270-2](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(01)00270-2).
19. Taru A. Muranen et al., “Patient Survival and Tumor Characteristics Associated with CHEK2:P.I157T – Findings from the Breast Cancer Association Consortium,” *Breast Cancer Research* 18, no. 1 (December 2016): 98, <https://doi.org/10.1186/s13058-016-0758-5>.
20. Vikram Pattanayak et al., “High-Throughput Profiling of off-Target DNA Cleavage Reveals RNA-Programmed Cas9 Nuclease Specificity,” *Nature Biotechnology* 31, no. 9 (September 2013): 839–43, <https://doi.org/10.1038/nbt.2673>.
21. Ye Zhang, Larry H Rohde, and Honglu Wu, “Involvement of Nucleotide Excision and Mismatch Repair Mechanisms in Double Strand Break Repair,” *Current Genomics* 10, no. 4 (June 2009): 250–58, <https://doi.org/10.2174/138920209788488544>
22. Ying-Chou Chen, Fahim FARZADFARD, and Timothy Kuan-Ta Lu, Crispr/cas global regulator screening platform, World Intellectual Property Organization WO2018080573A1, filed January 20, 2017, and issued May 3, 2018,

23. Ying-Chou Chen et al., “Randomized CRISPR-Cas Transcriptional Perturbation Screening Reveals Protective Genes against Alpha-Synuclein Toxicity,” *Molecular Cell* 68, no. 1 (October 5, 2017): 247-257.e5, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.014>.
24. Yue Wang, Bo Dai, and Dingwei Ye, “CHEK2 Mutation and Risk of Prostate Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis,” *International Journal of Clinical and Experimental Medicine* 8, no. 9 (2015): 15708–15.

【評語】 080007

本研究利用合成生物學技術開發的創新基因組篩檢平台 PRISM(v2.0)，採用合成轉錄因子(crispr-TF)辨認 DNA 但不進行剪切，透過修改 CRISPR/Cas 的 PAM-interacting (PI) domain 序列打破其辨認限制，由原本 NGG 序列變成可以結合 NAG 的序列，提升 crispr-TF 在高通量基因組的篩選能力，期待未來可以做出辨認 NNN 序列，以此技術初步成功建構 Chk2/Rad53 所參與的基因網絡，讓失去 Chk2/Rad53 功能的酵母菌能在 DNA 損傷的情況生存。

建議：

1. 將 PRISM v2.x 的質體在此菌株中表現，並成功挑選出多株能在加有 HU 的培養基上生長，說明 PRISM v2.x 成功取代並重組 Rad53 參與的調控網絡，但如何知道是 Chk2/Rad53 調控的下游基因組？
2. Chk2/Rad53 調控的下游基因組及辨認 NAG 的關係如何？應該要提供 preliminary data。
3. 目前只把工具建立，但此工具的建立概念已有相關報告，雖然改造 PI domain 1216-1221 的胺基酸序列：KIFLLY 可以辨認 NAG，無法辨認 NGG 應該是新的發現。