

# Utjecaj brzine rasta na efikasnost adaptacije sustavom CRISPR-Cas u bakterija Escherichia coli različitih genetičkih pozadina

---

Knechtl, Patricija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:188517>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-03**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Patricija Knechtl

**Utjecaj brzine rasta na efikasnost adaptacije  
sustavom CRISPR-Cas u bakterija *Escherichia coli*  
različitih genetičkih pozadina**

Diplomski rad

Zagreb, 2022.

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Patricija Knechtl

**The influence of growth rate on the efficiency of the  
CRISPR-Cas mediated adaptation in *Escherichia  
coli* of different genetic backgrounds**

Master thesis

Zagreb, 2022.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće te komentorstvom Damjana Mitića, mag. biol. mol. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

## ZAHVALE

*Najprije se želim zahvaliti svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na pomoći, svim korisnim i dobronamjernim savjetima vezanim uz samu izradu ovog diplomskog rada. Također, hvala na strpljenju, dobroj volji i vremenu koje ste uložili kako bi ovaj diplomski rad bio uspješno izrađen.*

*Zahvaljujem se i svojem komentoru Damjanu Mitiću, mag. biol. mol. na pomoći tijekom eksperimentalnog rada, pogotovo veliko hvala za proteine, jer bez Vas ne bi bilo ni „mojih“ proteina.*

*Zahvaljujem se i svim svojim kolegama i prijateljima koje sam stekla na fakultetu, koji su mi pomogli da mi studentski dani prođu što bezbolnije, sa što više smijeha i lijepih trenutaka. Pamtit ću svako druženje, svaku kavu, svaku šetnju, svaki položen ispit, svaki otvoren kolačić sreće...*

*Posebno hvala i svim ostalim prijateljima i prijateljicama van fakulteta, posebno mojim bivšim cimericama, što ste uvijek svi bili tu uz mene i uljepšali mi jedan važan period mog života.*

*Najveće hvala mom dečku, koji je uvijek tu za mene, i u dobrim i u lošim danima, koji je uvijek neizmijerna podrška u svemu što radim te me uvijek potiče da budem najbolja verzija sebe. Hvala na svakom osmijehu, zagrljaju i pruženoj ljubavi te podršci tijekom pisanja ovog diplomskog rada.*

*Na kraju, želim se zahvaliti svojoj sestri i roditeljima koji su uvijek vjerovali u mene te mi pružali veliku podršku i davali mi snagu. Hvala na razumijevanju i ljubavi koju ste mi pružili tijekom cijelog mog obrazovanja.*

*I za kraj, jedan citat koji me pratio kroz čitav fakultet:*

**„Create your own Sunshine. ☀“**

*-Sam Sundquist*

*Patricija*

# TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu  
Prirodoslovno-matematički fakultet  
Biološki odsjek

Diplomski rad

## Utjecaj brzine rasta na efikasnost adaptacije sustavom CRISPR-Cas u bakterija *Escherichia coli* različitih genetičkih pozadina

Patricija Knechtl

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas sastoji se od lokusa CRISPR koji zajedno s pridruženim genima *cas* omogućuje adaptivnu imunost mnogim bakterijama i većini arheja protiv stranih genetičkih elemenata. Lokus CRISPR sastoji se od brojnih ponavljajućih sekvenci DNA koje su razdvojene kratkim razmaknicama strane DNA. Naivna adaptacija prva je faza zaštite u kojoj se kratki fragmenti iz stranih organizama ugrađuju u lokus CRISPR kako bi se zaštitila stanica od budućih napada istom stranom DNA. U ovom radu istražen je utjecaj ekspresije gena *cas1* i *cas2* na brzinu rasta stanica, određena je faza rasta u kojoj dolazi do ugradnje nove razmaknice te je istražena efikasnost adaptacije u tri različita bakterijska soja *E. coli* koji imaju tri različite genetičke pozadine (BW25113, AB1157 i MG1655). Također, istraženo je kako količine proteina Cas1 i Cas2 utječu na efikasnost naivne adaptacije (ugradnju razmaknice). Na temelju analize dobivenih rezultata može se zaključiti kako se usporeni rast bakterijskih stanica javlja zbog ugradnje razmaknice u lokus CRISPR, u ranoj log fazi rasta, samo u genetičkoj pozadini BW25113. U bakterijskim sojevima koji su rasli sporo došlo je do ekspresije proteina Cas1 i Cas2, dok geni *rpoS* i *crl* nemaju ulogu u izgradnji adaptivne imunosti procesom naivne adaptacije.

Ključne riječi: naivna adaptacija, ugradnja razmaknica, lokus CRISPR, *rpoS*, *crl*, *E. coli*  
(66 stranica, 17 slika, 18 tablica, 75 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Komentor: Damjana Mitić, mag. biol. mol.

Ocjenitelji: 1. izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

2. doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

3. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

zamjena: prof. dr. sc. Željka Soldin

Rad prihvaćen: 6. listopada 2022.

# **BASIC DOCUMENTATION CARD**

University of Zagreb  
Faculty of Science  
Department of Biology

Master thesis

## The influence of growth rate on the efficiency of the CRISPR-Cas mediated adaptation in *Escherichia coli* of different genetic backgrounds

Patricija Knechtl

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR-Cas system consists of the CRISPR locus, which, together with the CRISPR-associated (*cas*) genes, provides adaptive immunity to many bacteria and most archaea against foreign genetic elements. The CRISPR locus consists of numerous repetitive DNA sequences separated by short spacers that are derived from foreign DNA. Naïve adaptation is the first phase of protection in which short fragments from foreign organisms are incorporated into the CRISPR locus to protect the cell from future attacks by the same foreign DNA. In this research, we investigated the influence of *cas1* and *cas2* gene expression on cell growth rate, we determined in which growth phase a new spacer is incorporated and we investigated the efficiency of adaptation in three different bacterial strains of *E. coli* with three different genetic backgrounds (BW25113, AB1157 and MG1655). Also, we investigated how the amounts of Cas1 and Cas2 proteins affect the efficiency of adaptation (spacer acquisition). Based on the analysis of the obtained results, it can be concluded that the slowed growth of bacterial cells occurs due to the insertion of a spacer into the CRISPR locus in the early log phase of growth only in the BW25113 genetic background. In bacterial strains that grew slowly, Cas1 and Cas2 proteins were expressed. Genes *rpoS* and *crl* have no role in building CRISPR immunity through the process of naïve adaptation.

Keywords: naïve adaptation, spacer integration, locus CRISPR, *rpoS*, *crl*, *E. coli*  
(66 pages, 17 figures, 18 tables, 75 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

Co-mentor: Damjana Mitić, mag. biol. mol.

Reviewers: 1. izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

2. doc. dr. sc. Mirela Sertić Perić

3. izv. prof. dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek

supstitution: prof. dr. sc. Željka Soldin

Thesis accepted: 6<sup>th</sup> October 2022

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
1.1. Sustav CRISPR-Cas .....	1
1.2. Povijesni pregled sustava CRISPR-Cas .....	2
1.3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas .....	5
1.4. Mehanizam obrane adaptivnim imunskim sustavom CRISPR-Cas .....	8
1.5. Sustav CRISPR-Cas u bakteriji <i>Escherichia coli</i> .....	10
1.5.1. Adaptacija.....	11
1.6. Regulacija ekspresije gena kod prokariota .....	17
1.7. Regulacija sustava CRISPR-Cas podtipa I-E .....	18
1.7.1. <i>rpoS</i> .....	19
1.7.2. <i>crl</i> .....	19
1.8. Krivulja rasta bakterijskih stanica .....	20
2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA .....	22
3. MATERIJALI I METODE .....	23
3.1. MATERIJALI.....	23
3.1.1. Bakterijski sojevi.....	23
3.1.2. Plazmidi.....	24
3.1.3. Početnice za PCR .....	24
3.1.4. Hranidbene podloge i mediji .....	25
3.1.5. Antibiotici i induktori.....	26
3.1.6. Otopine, puferi i boje .....	26
3.1.7. Markeri veličina .....	31
3.1.8. Programi .....	31
3.1.9. Uređaji.....	32
3.2. METODE.....	33



3.2.1.	Određivanje brzine rasta i ugradnje razmaknice .....	33
3.2.2.	Transformacija plazmidnom DNA.....	33
3.2.3.	Određivanje efikasnosti naivne adaptacije (ugradnje novih razmaknica).....	34
3.2.4.	Izolacija proteina i SDS-PAGE elektroforeza.....	36
4.	REZULTATI.....	39
4.1.	Određivanje krivulje rasta bakterijskih sojeva .....	39
4.2.	Efikasnost naivne adaptacije (ugradnja novih razmaknica) .....	43
4.3.	Ovisnost ugradnje razmaknica o fazi rasta .....	47
4.4.	Utjecaj genetičke pozadine na ekspresiju proteina Cas1 i Cas2.....	48
5.	RASPRAVA .....	52
5.1.	Naivna adaptacija .....	52
5.1.1.	Utjecaj genetičke pozadine na naivnu adaptaciju .....	52
5.1.2.	Utjecaj gena <i>rpoS</i> i <i>crl</i> na naivnu adaptaciju.....	54
6.	ZAKLJUČAK .....	57
7.	LITERATURA.....	58
8.	ŽIVOTOPIS .....	65
9.	PRILOZI .....	I
	Prilog 1. ....	II
	Prilog 2. ....	III
	Prilog 3. ....	IV
	Prilog 4. ....	V
	Prilog 5. ....	VI
	Prilog 6. ....	VII

## KRATICE

<b>A</b>	adenin
<b>A/Bis</b>	akrilamid/bisakrilamid
<b>APS</b>	amonijev persulfat
<b>C</b>	citozin
<i>cas</i>	engl. <i>CRISPR-associated genes</i>
<b>Cascade</b>	engl. <i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>
<b>CBB</b>	engl. <i>Commassie brilliant blue</i>
<i>Chi</i>	engl. <i>crossover hotspot instigator</i>
<b>CRISPR</b>	engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
<b>crRNA</b>	CRISPR RNA
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	deionizirana voda
<b>DNA</b>	deoksiribonukleinska kiselina
<b>dIDNA</b>	dvolančana DNA
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<b>G</b>	guanin
<i>iap</i>	engl. <i>isozyme of alkaline phosphatase</i>
<b>IHF</b>	engl. <i>integration host factor</i>
<b>jIDNA</b>	jednolančana DNA
<b>LCTR</b>	engl. <i>large cluster of 20-nt tandem repeat sequences</i>
<b>kb</b>	kilobaza
<b>kDa</b>	kilodalton
<b>nt</b>	nukleotid
<b>PAGE</b>	engl. <i>polyacryamide gel-electrophoresis</i>
<b>PAM</b>	engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
<b>PAMc</b>	engl. <i>protospacer adjacent motif complementary sequence</i>
<b>pb</b>	parovi baza
<b>PCR</b>	engl. <i>polymerase chain reaction</i>

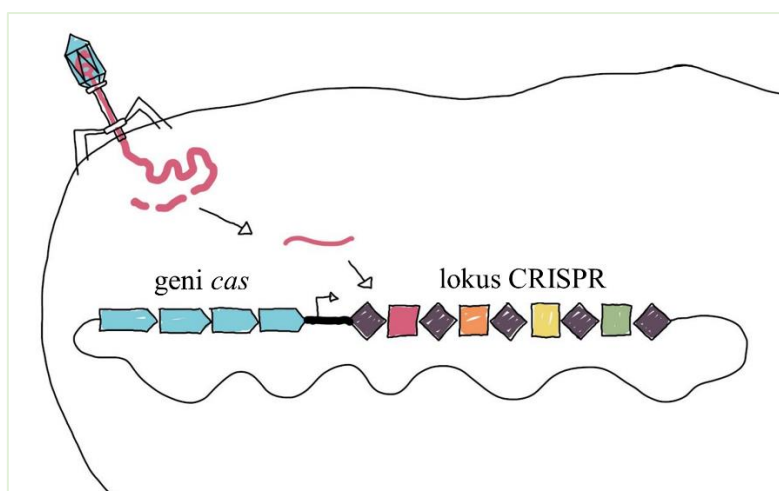
<b>pre-crRNA</b>	engl. <i>primary crRNA</i>
<b>PMSF</b>	engl. <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
<b>RNA</b>	ribonukleinska kiselina
<b>rpm</b>	engl. <i>round per minute</i>
<b>SDS</b>	engl. <i>sodium dodecyl sulphate</i>
<b>SDS-PAGE</b>	engl. <i>sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
<b>SPIDR</b>	engl. <i>spacers interspaced direct repeats</i>
<b>SRSR</b>	engl. <i>short regularly spaced repeats</i>
<b>T</b>	timin
<b>TAE</b>	tris-acetat-EDTA
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin
<b>wt</b>	engl. <i>wild type</i>

# 1. UVOD

## 1.1. Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas (Slika 1) sastoji se od lokusa CRISPR (od engl. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) koji zajedno s pridruženim genima *cas* (od engl. *CRISPR associated*) omogućuje adaptivnu imunost mnogim bakterijama i većini arheja protiv stranih genetičkih elemenata (npr. faga i plazmida) (Fagerlund i sur. 2017).

Lokus CRISPR sastoji se od brojnih ponavljajućih sekvenci DNA (engl. *repeats*) koje su razdvojene kratkim razmaknicama (engl. *spacers*) porijeklom iz strane DNA (Sashital i sur. 2012). Ponavljajuće sekvence i razmaknice ne kodiraju proteine, već se prepisuju i procesiraju u male CRISPR RNA (crRNA), kojima se prepoznaje komplementarna DNA (protorazmaknica) što je temelj otpornosti na bilo koju stranu DNA (primjerice fag) (Haft i sur. 2005).



**Slika 1.** Sustav CRISPR-Cas. Sustav CRISPR-Cas sastoji se od lokusa CRISPR i pridruženih gena *cas*. Lokus CRISPR čine ponavljajuće sekvence DNA (engl. *repeats*; prikazane crnim rombovima) koje su razdvojene kratkim razmaknicama (engl. *spacers*; označene ružičastim, narančastim, žutim i zelenim kvadratima). Ružičasta linija odnosi se na razmaknicu (podrijetlom iz bakteriofaga prikazanog u lijevom dijelu slike) koja se ugrađuje u lokus CRISPR. Preuzeto i prilagođeno prema Kummer 2021.

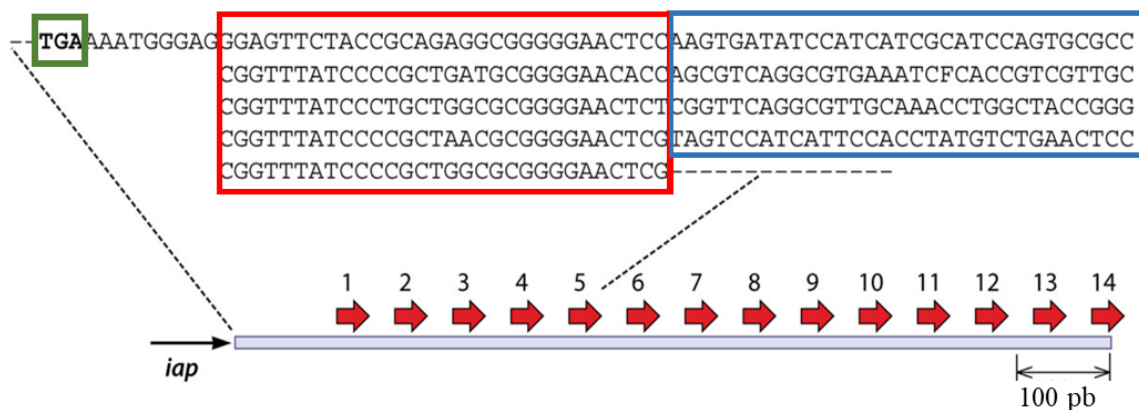
Za stjecanje nove razmaknice potrebna je i vodeća sekvenca (engl. *leader*) koja se nalazi uzvodno od lokusa CRISPR (Barrangou i sur. 2007). Vodeća sekvenca je duga sekvenca bogata parovima baza adenina i timina (Jansen i sur. 2002) koja sadrži promotor koji usmjerava transkripciju lokusa CRISPR u pre-crRNA te pomaže pri pravilnoj orijentaciji nove razmaknice (Pougach i sur. 2010; Pul i sur. 2010). Kako bi bakterijska stanica razlikovala stranu od vlastite

DNA, u neposrednoj blizini protorazmaknice mora se nalaziti kratki niz očuvanih nukleotida (Mojica i sur. 2009; Sashital i sur. 2012) nazvanih PAM (od engl. *protospacer adjacent motif*) (Bolotin i sur. 2005). Ono po čemu bakterijska stanica razlikuje stranu DNA od vlastite je ta da pokraj vlastite DNA nema sekvence PAM (Mojica i sur. 2009).

## 1.2. Povijesni pregled sustava CRISPR-Cas

Prvi opis CRISPR elemenata dao je 1987. godine japanski znanstvenik Yoshizumi Ishino koji je tijekom analize gena *iap* (od engl. *isozyme of alkaline phosphatase*) u bakteriji *Escherichia coli* K-12 zamijetio neobičnu ponavljajuću sekvencu DNA nizvodno od gena *iap*. Ponavljajuća sekvenca (29 pb) ponovila se pet puta, a pokraj svakog ponavljanja nalazio se jedinstveni slijed uvijek iste duljine (32 pb) (Slika 2) (Ishino i sur. 1987). U to vrijeme nije bilo drugih zapisa o tim sekvencama u bazama podataka, no poslije se pokazalo kako je to bio prvi nalaz sekvence CRISPR (Ishino i sur. 2018).

stop kodon gena *iap*

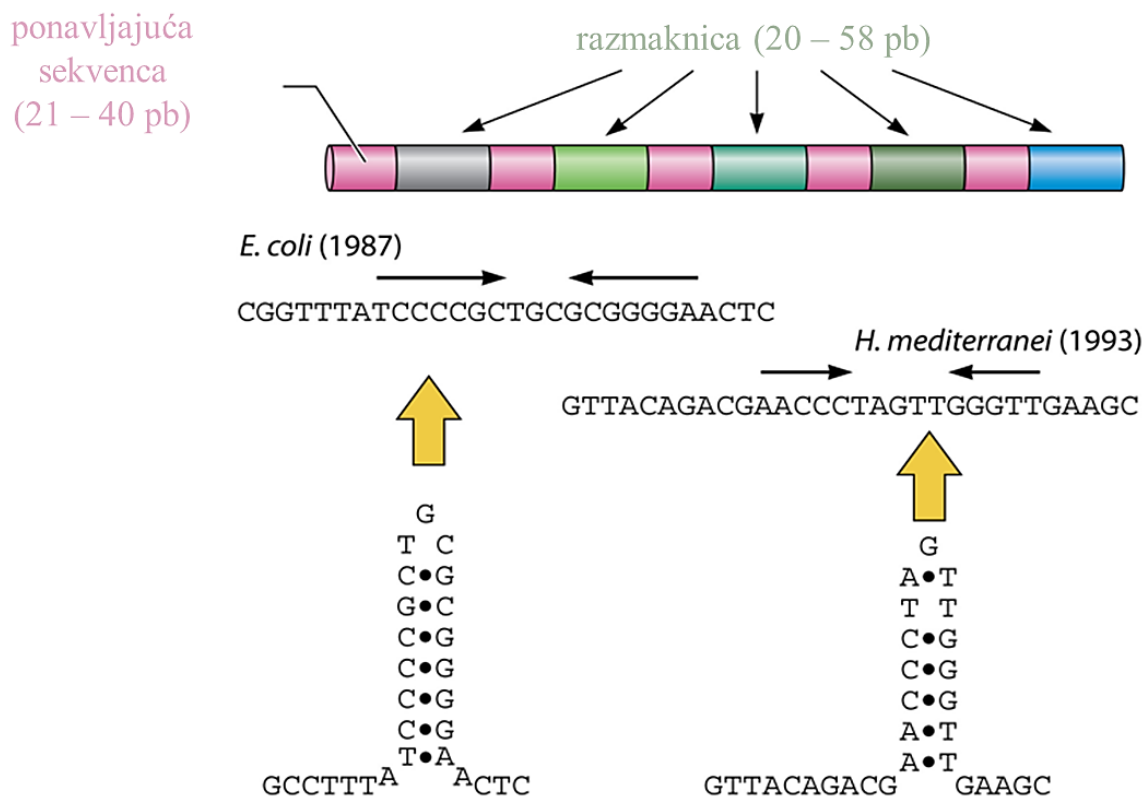


**Slika 2.** Sekvence CRISPR-a koje je 1987. godine otkrio znanstvenik Yoshizumi Ishino kad je analizirao gene *iap*. Pronašao je sekvence prvih pet ponavljajućih sljedova duljine 29 pb (u crvenom pravokutniku), a pokraj svakog ponavljanja nalazio se jedinstveni slijed duljine 32 pb (u plavom pravokutniku). U zelenom kvadratu nalazi se stop kodon gena *iap* (5'-TGA-3'), a njegova udaljenost od lokusa CRISPR prikazana je na donjem dijelu slike. Crvene strelice odnose se na ponavljajuće sljedove. Preuzeto i prilagođeno prema Ishino i sur. 2018.

Sličan slijed sekvenci je nakon toga primijećen i u nizu drugih bakterija, a velik napredak je postignut kad su ponavljajuće sekvence pronađene i u jednoj vrsti arheja *Haloferax mediterranei* (Slika 3) (Mojica i sur. 1993). Sve te ponavljajuće sekvence su 2000. godine upisane u DNA bazu podataka pod nazivom SRSR (od engl. *short regularly spaced repeats*) kao novi identificirani tip prokariotskih kratkih ponavljajućih sekvenci. Bioinformatičke

analize pokazale su kako se elementi SRSR pojavljuju u skupinama, djelomično su palindromski i između njih se nalaze jedinstvene sekvence uvijek istih duljina. Sve to sugeriralo je da SRSR imaju važnu, ali još nepoznatu biološku funkciju (Mojica i sur. 2000). Istražujući lokus SRSR u mnogim arhejama i bakterijama, 2002. godine Jansen i suradnici otkrili su niz od četiri konzervirana gena stalno prisutna u njegovoj blizini (geni *cas1 – cas4*) koji kodiraju proteine koji su vjerojatno povezani sa skupinom ponavljajućih sekvenci (Jansen i sur. 2002). U gotovo isto vrijeme, Kira Makarova je sa svojim suradnicima analizirala kontekst očuvanih gena koji su se nalazili u prokariotskim genomima i pronašla je nekoliko skupina gena koji odgovaraju genima *cas* (Makarova i sur. 2006).

Osim naziva SRSR, te sekvence bile su opisane i drugim imenima različitih autora kao npr. SPIDR (od engl. *spacers interspaced direct repeats*; Jansen i sur. 2002) i LCTR (od engl. *large cluster of 20-nt tandem repeat sequences*; She i sur. 2001). Danas su te sekvence opisane kao CRISPR (od engl. *clustered regularly interspaced palindromic repeats*; Jansen i sur. 2002), a taj akronim predložili su Jansen i suradnici u dogovoru s istraživačkom grupom Francisa Mojice. Novi pojam spriječio je daljnju zabunu uzrokovanu raznim imenima srodnih ponavljajućih sekvenci i vrlo brzo postao je popularan i prihvaćen na znanstvenom polju (Ishino i sur. 2018). Sve do 2005. godine nije bilo jasnih dokaza o biološkoj funkciji ili mehanizmu koji je u pozadini sustava CRISPR-Cas (Ishino i sur. 2018).



**Slika 3.** Strukturni dijelovi lokusa CRISPR kod bakterije *E. coli* i arheje *H. mediterranei*. Ponavljajuće sekvence prikazane su ružičastom bojom, duljine 21 – 40 pb, imaju dijadnu simetriju, odnosno palindromske su strukture (to je pokazano crnim vodoravnim strelicama). Između ponavljajućih sekvenci nalaze se jedinstveni sljedovi (razmaknice) koji su na slici prikazani sivom, zelenom i plavom bojom, a njihova duljina iznosi 20 – 58 pb. Preuzeto i prilagođeno prema Ishino i sur. 2018.

Tijekom 2003. godine Francis Mojica odlučio je maknuti fokus s ponavljajućih sekvenci i usmjeriti svoju pažnju na jedinstvene sljedove (razmaknice) koji se nalaze između ponavljajućih sljedova. Mojica je izolirao razmaknice iz preko 4000 sojeva i došao do otkrića da su neke razmaknice homologne sekvencama DNA iz bakteriofaga ili plazmida (Mojica i sur. 2005). Do identičnog otkrića došla je i Christine Pourcel u svom laboratoriju, kao i Alexander Bolotin sa svojim suradnicima (Ishino i sur. 2018). Prvi put je predloženo 2005. godine da bi sustav CRISPR-Cas mogao imati ulogu imunološkog sustava kod prokariota (Mojica i sur. 2005; Pourcel i sur. 2005; Bolotin i sur. 2005). Također, sugerirali su da proteini Cas kodirani genima *cas* moraju biti uključeni u funkcioniranje ovog novog pretpostavljenog prokariotskog imunološkog sustava (Pourcel i sur. 2005; Bolotin i sur. 2005). U svom istraživanju, Bolotin je zamijetio da se pokraj sekvence DNA u bakteriofagima i ostalim stranim genetičkim elementima nalazi kratki dio očuvane DNA (Bolotin i sur. 2005) koja je kasnije nazvana PAM (od engl. *protospacer adjacent motif*) (Mojica i sur. 2009; Deveau i sur. 2009).

Rodolphe Barrangou i suradnici su 2005. godine odlučili provjeriti ima li sustav CRISPR-Cas zaista ulogu u adaptivnoj imunosti. Koristili su dobro karakterizirani soj bakterije *Streptococcus thermophilus* i dva bakteriofaga. Proveli su genetičku selekciju kako bi izolirali bakterije otporne na fage i kad su to napravili otkrili su kako su otporni sojevi ugradili sekvence iz faga u svoj lokus CRISPR. To je bio prvi eksperimentalni dokaz funkcije sustava CRISPR-Cas kao prokariotskog stečenog imunološkog sustava (Barrangou i sur. 2007).

Nakon toga je 2008. godine istraživačka grupa John van der Oosta rekonstruirala imunološki sustav CRISPR-Cas koristeći elemente iz bakterije *E. coli*. Dokazali su kako je za normalnu funkciju sustava potrebno prepisivanje i procesiranje molekula RNA nastalih iz lokusa CRISPR (crRNA) te da su proteini Cas potrebni za fazu interferencije. Također, biokemijski su okarakterizirali proteinski kompleks od pet proteina Cas koji su nazvali kompleks Cascade (od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) (Brouns i sur. 2008). Tijekom sljedećih godina, ova temeljna otkrića omogućila su daljnju detaljnu karakterizaciju mehanizma djelovanja sustava CRISPR-Cas (Mojica i Montoliu 2016).

### 1.3. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas

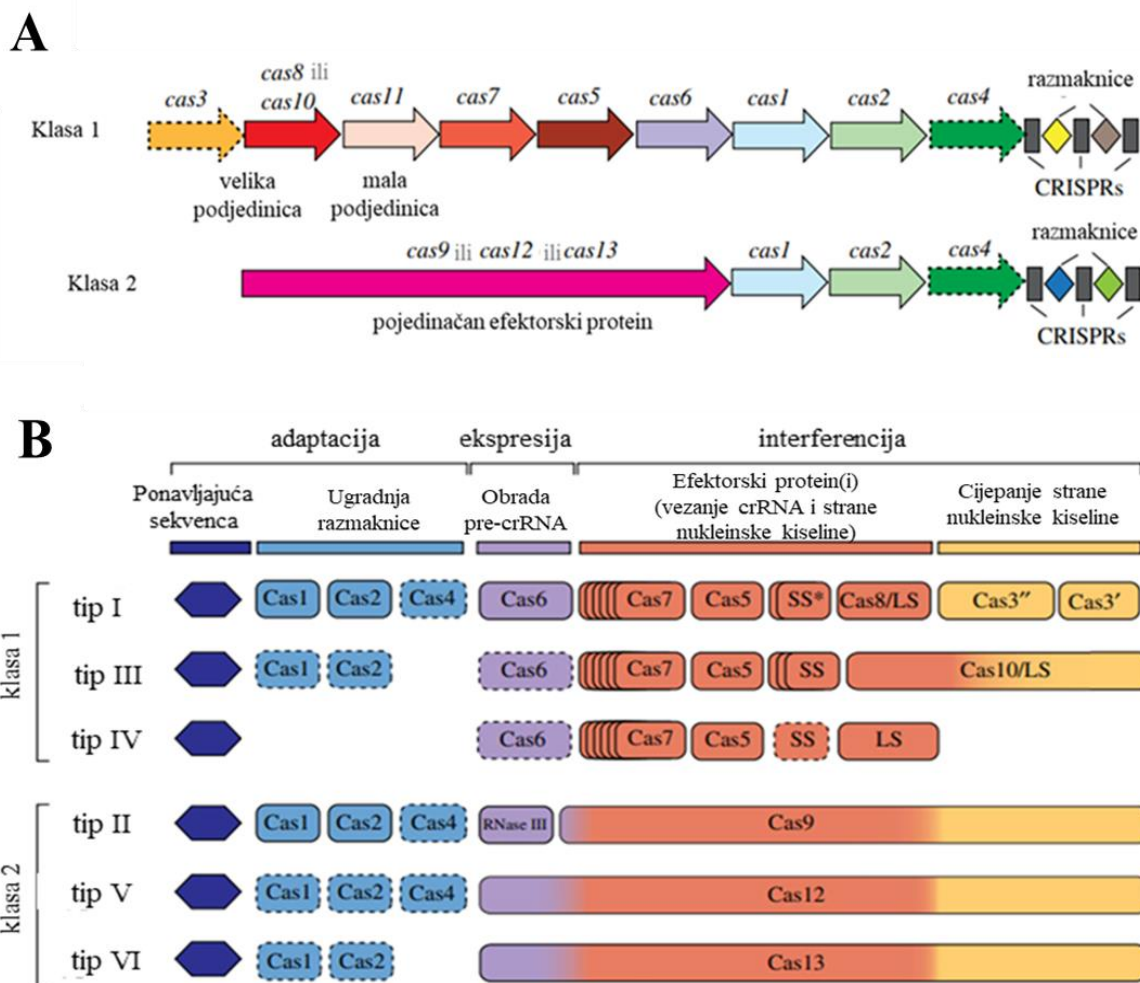
Bazirano na CRISPR bazi podataka (<http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr>, pristupljeno 13.8.2022.) lokus CRISPR je do 2017. godine identificiran u 87% genoma arheja (202/232) i 45% genoma bakterija (3059/6782) (Ishino i sur. 2018). Svi sustavi CRISPR-Cas temeljito su istraženi kako bi se što bolje razumio mehanizam CRISPR-Cas imunosti. Velika količina informacija o sustavima CRISPR-Cas dovela je do klasifikacije sustava na temelju više kriterija, uključujući evolucijske odnose očuvanih proteina i organizacije operona Cas (Bhaya i sur. 2011).

Sustavi CRISPR-Cas klasificirani su u dvije klase (klasa 1 i klasa 2; Slika 4), šest tipova (I, II, III, IV, V i VI) i 33 podtipova, iako taj broj nije konačan te istraživanja traju i dalje. Klasa 1 široko je rasprostranjena u arhejama i bakterijama, sadržavajući ~90% svih identificiranih sustava CRISPR-Cas, dok ostalih ~10% sustava CRISPR-Cas pripada u klasu 2 i pojavljuju se samo u bakterijama. Klasa 1 uključuje tipove I, III i IV, dok klasa 2 uključuje tipove II, V i VI (Slika 4B) (Makarova i sur. 2015). Svaki tip klasificiran je u više podtipova: I – A do F i U i III – A do D, odnosno II – A do C, V – A do E i U te VI – A do C (Shmakov i sur. 2017; Koonin i Makarova 2013).

Dvije klase razlikuju se po organizaciji efekorskog kompleksa (Slika 4). Efektorski kompleks klase 1 sastoji se od 4 do 7 proteinskih podjedinica Cas (npr. kompleks Cascade u



tipu I i kompleks Csm-Cmr u tipu III). Za razliku od klase 1, sustavi klase 2 zahtijevaju samo jedan protein Cas (npr. Cas9) za prepoznavanje ciljne DNA i njeno cijepanje (Makarova i sur. 2015). Sustavi klase 2 manje su istraženi od sustava klase 1, vjerojatno zato jer su manje učinkoviti u uništavanju faga od sustava klase 1, no zbog svoje jednostavnije građe efekorskog kompleksa sve se više počinju koristiti u novoj generaciji uređivanja genoma (Jinek i sur. 2012; Cong i sur. 2013; Gasiunas i sur. 2012).



**Slika 4.** Najnovija klasifikacija adaptivnog imunološkog sustava CRISPR-Cas. **A** – sustavi CRISPR-Cas su na temelju detaljne analize sekvenci i organizacije proteina Cas klasificirani u dvije glavne klase (Klasa 1 i 2) ovisno o tome imaju li više različitih proteina za pronalazak DNA (označeno crvenom bojom) i cijepanje (označeno žutom bojom) (Klasa 1) ili imaju samo jedan protein (Klasa 2). **B** – U klasu 1 pripadaju tipovi I, III i IV i imaju efektorski kompleks sastavljen od više proteina. U klasu 2 pripadaju tipovi II, V i nedavno dodan VI i imaju samo jedan protein u efektorskom modulu. U sustavu tipa II nalazi se enzim RNAza III koja sudjeluje u sazrijevanju molekula crRNA. SS/LS = mala/velika podjedinica (od engl. *small/large subunit*). Zvezdica (\*) označava da je velika podjedinica (SS) spojena s malom podjedinicom (LS). Oznake *cas3''* i *cas3'* označavaju da je helikazna i nukleazna domena proteina Cas3 kodirana posebnim genima (*cas3''* i *cas3'*). Preuzeto i prilagođeno prema Koonin i Makarova, 2019.

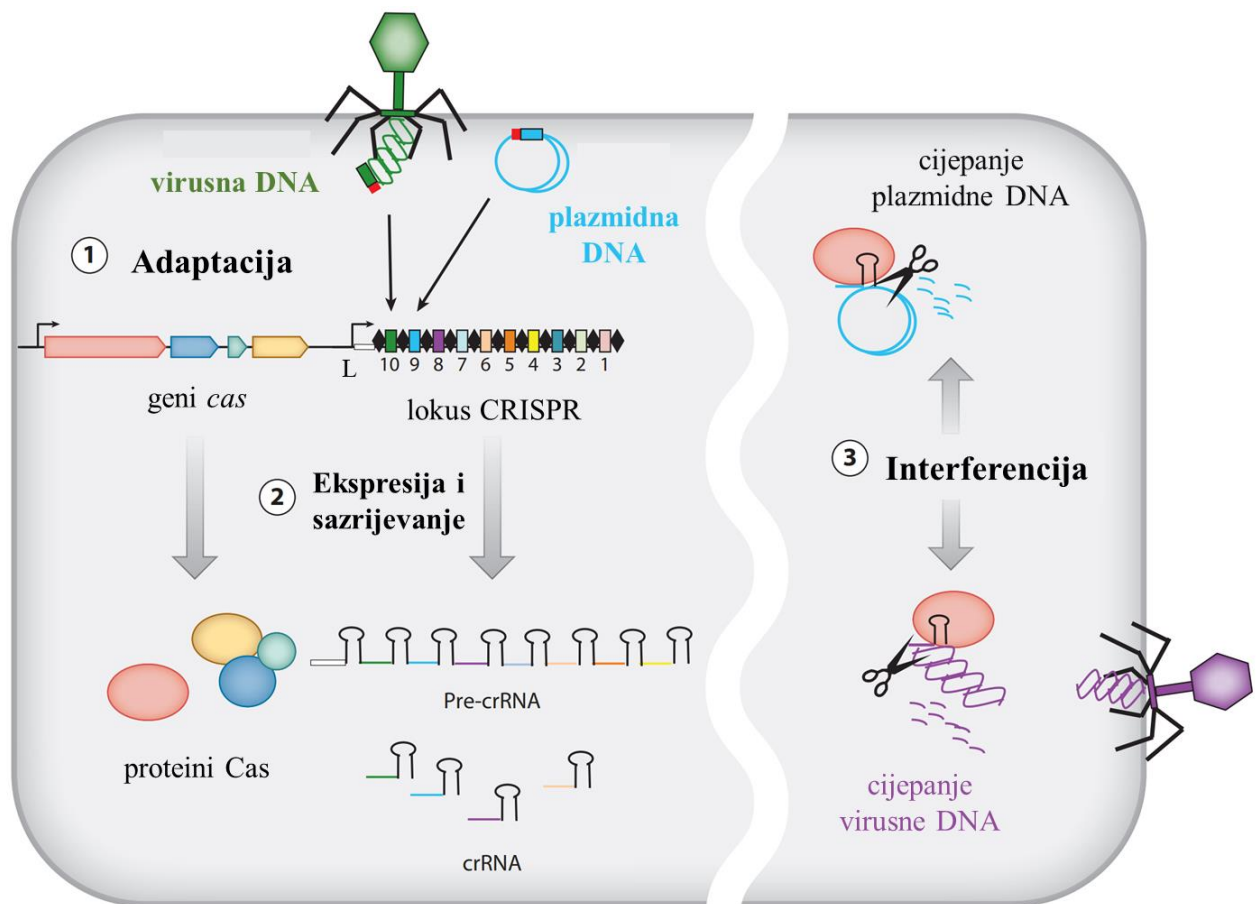
## 1.4. Mehanizam obrane adaptivnim imunostim sustavom CRISPR-Cas

Zaštita sustavom CRISPR-Cas podijeljena je u tri glavne faze – adaptacija, ekspresija i sazrijevanje te interferencija (Xue i Sashital, 2019) što je i prikazano Slikom 5.

U fazi **adaptacije** (Slika 5.1) kratki fragmenti DNA (protorazmaknice) se iz stranih organizama ugrađuju kao razmaknice u lokus CRISPR (Levy i sur. 2015; Yosef i sur. 2012). Glavnu ulogu u fazi adaptacije imaju proteini – Cas1 i Cas2 koji pokazuju aktivnosti endonukleaze i integraze koje su važne za ugradnju DNA u lokus CRISPR (Yosef i sur. 2012). Osim proteina Cas1 i Cas2 za efikasnu adaptaciju potrebna je replikacija DNA i dodatni enzimi domaćina poput RecBCD i drugih jednolančanih egzonukleaza (Levy i sur. 2015; Radovčić i sur. 2018).

U fazi **ekspresije i sazrijevanja** (Slika 5.2), primarni se transkript (prekursor crRNA, pre-crRNA) prepisuje s lokusa CRISPR i procesira u male, zrele CRISPR RNA (crRNA). crRNA sadržava jednu razmaknicu i dio ponavljajuće sekvence te formira tzv. strukturu ukosnice (engl. *hairpin*) (Brouns i sur. 2008). Zrela crRNA i proteini Cas zajedno tvore CRISPR ribonukleoproteinski (crRNP) kompleks (u klasi 1 radi se o kompleksu sastavljenom od više proteina, npr. proteinski kompleks Cascade, a u klasi 2 radi se o jednom proteinu, npr. Cas9 ili Cas12) (Mohanraju i sur. 2022).

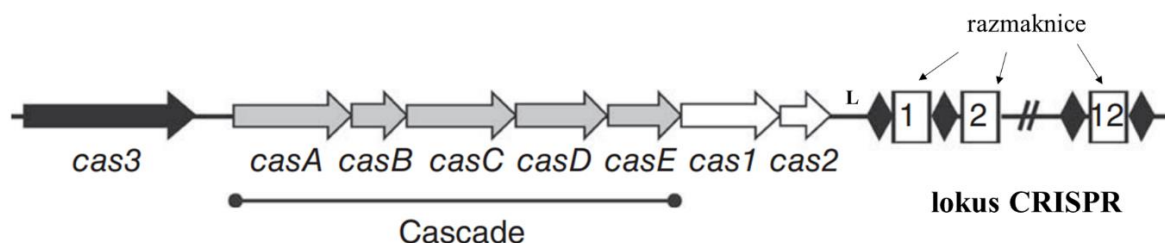
U fazi **interferencije** (Slika 5.3), crRNA, koja se nalazi unutar kompleksa crRNP, detektira komplementarnu sekvencu i sekvencu PAM u ciljnoj nukleinskoj kiselini. Po principu komplementarnog sparivanja baza, baze se spoje i formira se R-omča (engl. *R-loop*) (Sternberg i sur. 2014; Wiedenheft i sur. 2011). To uzrokuje aktivaciju nukleaznog proteina (u klasi 1: Cas3 ili Cas10) ili nukleazne domene (u klasi 2: RuvC ili HNH) te dovodi do cijepanja ciljne sekvence. Cijepanje DNA ometa replikaciju virusa ili plazmida te daje imunitet bakterijskoj stanici. Ako sekvence nisu u potpunosti komplementarne ili postoje mutacije unutar sekvence PAM tada ne dolazi do cijepanja. U tom slučaju, strana DNA nije uhvaćena, replikacija virusa ili plazmida se nastavlja, a bakterijska stanica nije stekla imunitet. Kako bi sustav CRISPR-Cas djelovao kao sustav za obranu, sve tri faze moraju biti funkcionalne (Bhaya i sur. 2011).



**Slika 5.** Tri glavne faze adaptivnog sustava CRISPR-Cas. **1** – Adaptacija je prva faza obrane sustava CRISPR-Cas. U toj fazi se kratki fragmenti DNA (protorazmaknice) iz stranih organizama ugrađuju kao razmaknice u lokus CRISPR. **2** – Ekspresija i sazrijevanje druga je faza obrane sustava CRISPR-Cas. U toj fazi se primarni transkript (pre-crRNA) prepisuje s lokusa CRISPR i procesira u kratke zrele crRNA. crRNA sastoji se od jedne razmaknice i dijela ponavljajuće sekvence (struktura ukosnice). crRNA i proteini Cas zajedno tvore kompleks crRNP. **3** – Interferencija je treća faza obrane sustava CRISPR-Cas. U toj fazi kompleks crRNP detektira komplementarnu sekvencu u ciljnoj nukleinskoj kiselini te po principu komplementarnosti spari baze i formira se R-omča. To uzrokuje aktivaciju nukleaznog proteina te dovodi do cijepanja ciljne sekvence (označeno škarama na slici). Interferencija se može odvijati neovisno o druge dvije faze i to je pokazano bijelom crtom. Kako bi sustav CRISPR-Cas djelovao kao sustav za obranu, sve tri faze moraju biti funkcionalne. Zelenim i plavim pravokutnikom u virusnom i plazmidnom genomu prikazana je protorazmaknica, a crvenim kvadratom sekvenca PAM. Crnim rombovima prikazane su ponavljajuće sekvence, a šarenim pravokutnicima razmaknice u lokusu CRISPR. Oznaka L (od engl. *leader*) predstavlja vodeću sekvencu koja se nalazi uzvodno od lokusa CRISPR. Crne savinute strelice pokazuju mjesto gdje započinje transkripcija. Preuzeto i prilagođeno prema Bhaya i sur. 2011.

## 1.5. Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Sustav CRISPR-Cas bakterije *Escherichia coli* K-12 pripada u podtip I-E sustava CRISPR-Cas. Sustav se sastoji od dva lokusa CRISPR (CRISPR1 i CRISPR2) te 8 pripadnih gena *cas* (Haft i sur. 2005) koji se nalaze uzvodno od lokusa CRISPR (Slika 6). Najudaljeniji od lokusa je gen *cas3* koji ima ulogu endonukleaze koja cijepa ciljnu nukleinsku kiselinu (Babu i sur. 2011). Zatim slijedi 5 gena *cas* (*casABCDE*) koji čine crRNP kompleks Cascade (od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) pomoću koje sustav prepoznaje stranu invazivnu DNA. Kompleks Cascade se u bakteriji *E. coli* sastoji od jedne molekule crRNA i 11 podjedinica proteina Cas s ukupnom masom od 405 kDa (Jore i sur. 2011; Brouns i sur. 2008). Kako bi kompleks Cascade razlikovao vlastitu od strane DNA, pokraj protorazmaknice u stranoj sekvenci DNA nalazi se kratka sekvenca PAM dok je u genomu bakterije nema (Mojica i sur. 2009). Najočuvaniji geni koji se nalaze najbliže lokusu CRISPR i imaju ključnu ulogu u fazi adaptacije su geni *cas1* i *cas2* (Brouns i sur. 2008). Lokus CRISPR sastoji se od ponavljajućih sekvenci između kojih se nalaze ugrađene razmaknice porijeklom iz strane DNA. Uzvodno od lokusa CRISPR nalazi se vodeća regija koja je zaslužna za transkripciju lokusa CRISPR u crRNA (Ishino i sur. 1987).



**Slika 6.** Shematski dijagram sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* K-12 podtipa I-E. Sustav CRISPR-Cas sastoji se od 8 gena *cas* (*cas3* (prikazan tamno sivom strelicom), *casABCDE* = kompleks Cascade (prikazani sivim strelicama) te geni *cas1* i *cas2* (prikazani bijelim strelicama)). Desno je prikazan lokus CRISPR-1. Oznaka L (od engl. *leader*) označava vodeću sekvencu. Crni rombovi u lokusu CRISPR odnose se na ponavljajuće sekvence, a bijeli pravokutnici na razmaknice. Preuzeto i prilagođeno prema Jore i sur. 2011.

### 1.5.1. Adaptacija

Adaptacija je prva faza obrambenog imunološkog sustava CRISPR-Cas. Razlikujemo dvije vrste adaptacije – naivnu (od engl. *naïve*) i pripremljenu (od engl. *primed*).

Naivna adaptacija odnosi se na stjecanje i ugradnju razmaknice iz virusa ili plazmida s kojim se stanica prije nije susrela. U slučaju kad postoji prekomjerna ekspresija gena *cas1* i *cas2*, a nedostatak ekspresije ostalih gena *cas*, dolazi do uspješne ugradnje razmaknice u lokus CRISPR. Za naivnu adaptaciju dovoljan je samo jedan ponavljajući slijed u lokusu CRISPR.

Kod pripremljene adaptacije, u bakterijskom genomu se već nalazi ugrađena razmaknica porijeklom iz iste strane DNA i stanica se može odmah obraniti od napada.

Za naivnu adaptaciju potrebni su samo proteini Cas1 i Cas2, dok su za pripremljenu adaptaciju potrebni još i dodatni proteini Cas (npr. Cas3) te kompleks Cascade (Monsterd i sur. 2020).

#### 1.5.1.1. Mehanizam naivne adaptacije

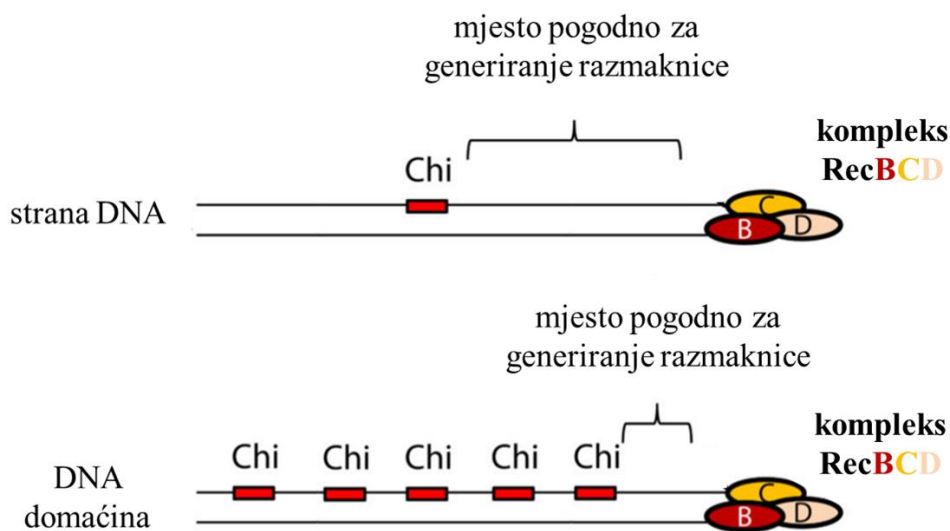
Naivna adaptacija odvija se u četiri faze – generiranje fragmenata molekula DNA koji čine protorazmaknice, hvatanje protorazmaknice, ugradnja razmaknice u lokus CRISPR te popravak DNA (Long i sur. 2021).

#### Generiranje protorazmaknice

Kako bi se potaknula adaptacija potrebno je prepoznati stranu DNA i stvoriti protorazmaknice. U tom procesu bitan je kompleks RecBCD koji prepoznaje dvolančane lomove DNA. Glavni izvor dvolančanih lomova DNA su zaustavljene replikacijske rašlje (vilice). RecBCD se veže na tupe krajeve DNA te ih počinje razmatati i razgrađivati tako dugo dok ne dođe do najbližeg ispravno orijentiranog *Chi* (od engl. *crossover hotspot instigator*) mjesta. *Chi* mjesto je oktamera sekvenca slijeda 5'-GCTGGTGG-3' koja mijenja aktivnost kompleksa RecBCD i zaustavlja daljnju razgradnju DNA. Produkti razgradnje su protorazmaknice, odnosno velika količina malih DNA, uključujući kratke i duge fragmente jDNA i razgrađene dDNA (Levy i sur. 2015).

U usporedbi s virusnom i plazmidnom DNA, bakterijski genom bogat je *Chi* mjestima (Slika 6) (u bakteriji *E. coli* *Chi* mjesto pojavljuje se svakih ~ 5 kB) i stoga je neizravno zaštićen od stjecanja razmaknice. U slučaju da bakterijski genom ugradi razmaknicu, koja je porijeklom iz vlastite DNA, došlo bi do autoimunosti i stanične smrti. To objašnjava zašto sustav CRISPR-Cas ima veći afinitet za stjecanje razmaknica iz strane DNA nego iz vlastite (Yosef i sur. 2011).

Također, poznato je da se DNA virusa i plazmida replicira češće od bakterijskog, što rezultira većoj vjerojatnosti za zaustavljene replikacijske rašlje, odnosno više mjesta s puno dvolančanih lomova. Osim toga, *Chi* mjesta su relativno rijetka u stranoj DNA (Slika 6) što rezultira kontinuiranom razgradnjom pomoću kompleksa RecBCD (Levy i sur. 2015). Pokazano je kako se adaptacija može dogoditi i u nedostatku kompleksa RecBCD, iako manje učinkovito, što nam pokazuje kako i neki drugi događaji mogu potaknuti naivnu adaptaciju (Fagerlund i sur. 2017).



**Slika 6.** Genom strane DNA i genom stanice domaćina, *E. coli*. Vitičastom zagradom označena su mjesta pogodna za generiranje razmaknice. Crvenim pravokutnicima označena su mjesta *Chi* (od engl. *crossover hotspot instigator*). Crvenom, žutom i bež elipsom prikazane su podjedinice (B, C i D) kompleksa RecBCD. Preuzeto i prilagođeno prema Levy i sur. 2015.

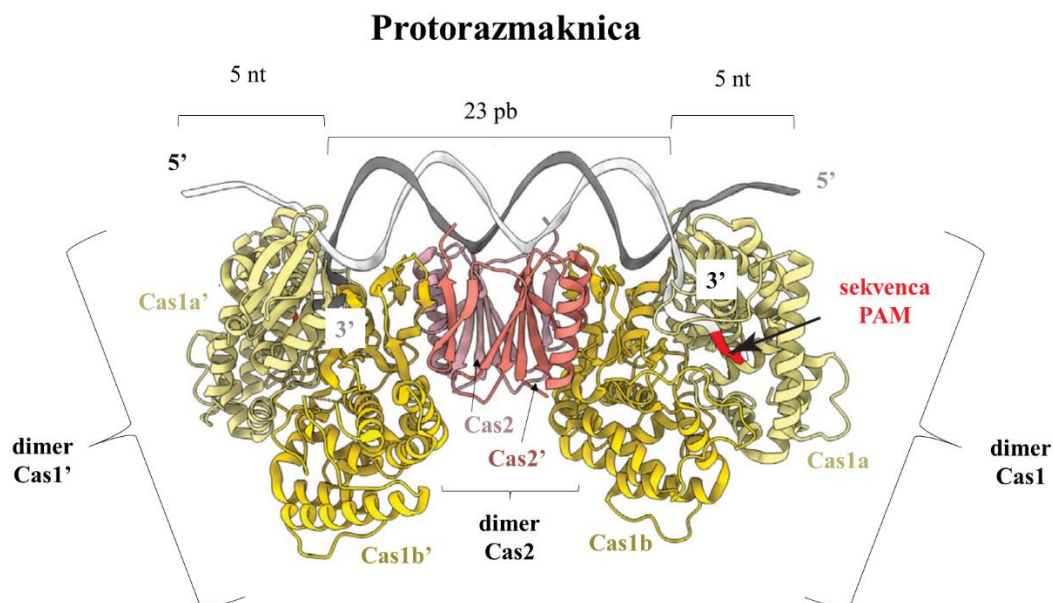
### Hvatanje protorazmaknice

Adaptacija se oslanja na dva proteina Cas – Cas1 i Cas2. Cas1 je integraza, a Cas2 je strukturni protein koji veže i stabilizira protorazmaknicu DNA (Wang i sur. 2015). Strukturne i biokemijske analize pokazale su kako ta dva proteina formiraju heteroheksamerni kompleks Cas1<sub>4</sub>-Cas2<sub>2</sub> (Wang i sur. 2015; Nuñez i sur. 2015; Xiao i sur. 2017). Kompleks sadrži dimer Cas2 koji se nalazi u „sendviču“ između dva dimera Cas1. Unutar kompleksa nalaze se dva aktivna mjesta Cas1a i Cas1b (Nuñez i sur. 2014). Kako bi kompleks Cas1-Cas2 prepoznao svoj supstrat važno je da se jednolančani supstrat (npr. j1DNA) rekombinira tako da nastane dvolančani supstrat (npr. d1DNA) kojeg kompleks može prepoznati. Razgradnjom pomoću kompleksa RecBCD nastaju jednolančane DNA (Dillingham i sur. 2008), što postavlja pitanje kako onda kompleks Cas1-Cas2 hvata dvolančane supstrate (Lee i Sashital 2022). Kompleks

Cas1-Cas2 prepoznaje sekvencu PAM slijeda 5'-AAG-3', koja se nalazi uzvodno od jednolančane DNA protorazmaknice. Detektira ju po principu komplementarnosti s PAM komplementarnom sekvencom, skraćeno PAMc (od engl. *protospacer adjacent motif complementary sequence*) slijeda 5'-CTT-3' koja se nalazi u aktivnom mjestu dimera Cas1a. Nakon sparivanja, Cas1a pomoću nukleazne aktivnosti cijepa sekvencu PAM između nukleotida G i A te nastaje razmaknica duljine 33 pb čiji 3' kraj završava hidroksilnom skupinom gvanina (G), tj. nukleotidom porijeklom iz PAM-a (Wang i sur. 2015; Levy i sur. 2015). Nakon povezanosti DNA protorazmaknice i 3' stršećeg kraja PAMc, može doći do cijepanja sekvence PAMc na jednom aktivnom mjestu zbog visoke specifičnosti reakcije. Do cijepanja dolazi između nukleotida citozina (C) i timina (T), a nukleotid C ostaje s razmaknicom koja će se kasnije ugraditi u lokus CRISPR. Na taj način stvara se supstrat koji sadrži 3' stršeće krajeve koji su izloženi okolini (Lee i Sashital 2022). Duljina središnjeg dvolančanog dijela DNA regulirana je fiksnim udaljenostima između dva aktivna mjesta Cas1. Optimalni supstrat za kompleks Cas1-Cas2 je protorazmaknica duljine 33 pb (Slika 7). Jedan dio protorazmaknice je u obliku dupleksa duljine 23 pb i nalazi se na površini dimera Cas2 koji ju stabilizira. Ostatak protorazmaknice čine 5 nt stršeći krajevi izloženi okolini, dok su 3' jldDNA krajevi smješteni u simetričnim aktivnim mjestima kompleksa Cas1 (Nuñez i sur. 2015; Wang i sur. 2015). 5'-jldDNA krajevi ne stupaju u interakciju s kompleksom, već su izloženi okolini, što sugerira da bi potencijalno mogli biti razgrađeni drugim nukleazama (Lee i Sashital 2022). Utvrđeno je da Cas2 može cijepati jldDNA i dldDNA, ali nije prikazana nikakva katalitička aktivnost Cas2 u stjecanju protorazmaknica (Long i sur. 2021).

Nije poznato kako kompleks Cas1-Cas2 s uhvaćenom protorazmaknicom, koja je spremna za ugradnju, dolazi do lokusa CRISPR, no jednom kad je tamo, ostali faktori pomažu da se osigura ugradnja (Lau i sur. 2019).





**Slika 7.** Kristalna struktura kompleksa Cas1-Cas2 bakterije *E. coli* s vezanom protorazmaknicom. Heteroheksamerni kompleks Cas1-Cas2 sastoji se od dimera Cas2 (označen crvenom bojom) koji se nalazi u „sendviču“ između dva Cas1 dimera (označeni žutom bojom). Aktivno mjesto dimera Cas1 (Cas1a) prepoznaje sekvencu PAM (crveni dio lanca) uzvodno od protorazmaknice DNA te po principu komplementarnosti sparuje svoje baze i na taj način veže protorazmaknicu za kompleks. Protorazmaknica je duljine 33 pb, od čega je jedan dio protorazmaknice u obliku dupleksa duljine 23 pb (nalazi se na površini Cas2 dimera), a ostatak čine stršeći krajevi duljine 5 nt na svakoj strani koji su izloženi okolini. 3' jDNA krajevi smješteni su u simetričnim aktivnim mjestima Cas1 kompleksa. Preuzeto i prilagođeno prema Lee i Sashital 2022.

### Ugradnja razmaknice u lokus CRISPR

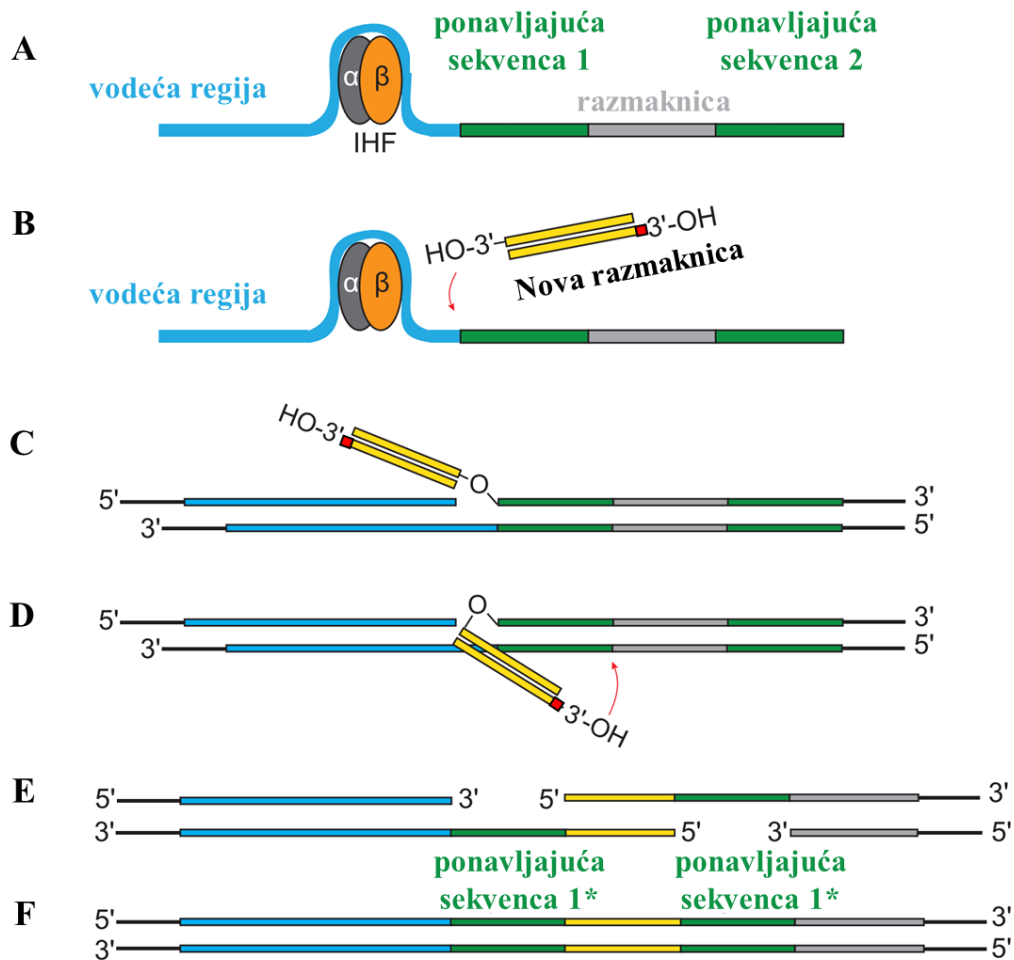
Kako bi se razmaknica mogla ugraditi u lokus CRISPR potreban je faktor IHF (od engl. *integration host factor*). IHF je heterodimerni faktor iz porodice građevnih histonskih proteina koji je sačuvan samo u Gram-negativnim bakterijama. IHF prepoznaje regije bogate A-T parovima baza koje sadrže sekvencu 5'-WATCAANNNTTTR-3' (W = A ili T, R = A ili G i N = bilo koji nukleotid). Ta sekvenca nalazi se unutar 60 pb vodeće regije uzvodno od lokusa CRISPR. IHF veže se za vodeću regiju i inducira oštro savijanje DNA za  $\sim 180^\circ$  (Slika 8A) (Xue i Sashital 2019). Ovo savijanje usmjerava uzvodni motiv prepoznavanja, koji se nalazi unutar vodeće regije, na drugu provjeru specifičnosti prije ugradnje razmaknice (Wright i sur. 2017). IHF i uzvodni motiv prepoznavanja omogućuju integraciji Cas1-Cas2 da napravi urez na granici vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda (Nuñez i sur. 2016).

Kako bi se razmaknica uspješno ugradila u lokus CRISPR potrebna su dva nukleofilna napada, odnosno dvije transesterifikacijske reakcije pomoću kompleksa Cas1-Cas2 (Nuñez i sur. 2015; Wang i sur. 2015; Wright i sur. 2017). Prvi nukleofilni napad započinje napadom 3' kraja hidroksilne skupine citozina (koji potječe iz slijeda PAMc) na 5' kraj vodeće regije, odnosno na granicu vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda u lokusu CRISPR (Slika 8B) (Yosef i sur. 2012). Nakon toga dolazi do drugog nukleofilnog napada (Slika 8D) koji se odvija 28 pb nizvodno između ponavljajućeg slijeda i prve razmaknice (Ramachadran i sur. 2019). Nakon drugog nukleofilnog napada, razmaknica je uspješno ugrađena u lokus CRISPR (Slika 8E) (Nuñez i sur. 2015).

Ključnu ulogu kod ugradnje razmaknice ima i sekvenca PAM. Ona osigurava pravilnu orijentaciju prilikom ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR i veoma je važno da se izreže iz razmaknice prije ugradnje u lokus CRISPR kako kasnije ne bi došlo do cijepanja lokusa CRISPR u fazi interferencije (Datsenko i sur. 2012).

### **Popravak DNA**

Nakon uspješne ugradnje razmaknice u lokus CRISPR potreban je još jedan korak kako bi adaptacija bila obavljena u cijelosti. Između sekvenci u lokusu CRISPR stvorile su se jednolančane praznine (engl. *gaps*) koje je potrebno popuniti. Praznine popunjava DNA-polimeraza I i DNA-ligaza domaćina. To rezultira u potpunosti popraavljenom DNA s dupliciranim ponavljajućim sljedovima (Slika 8F) (Ivančić-Baće i sur. 2015).

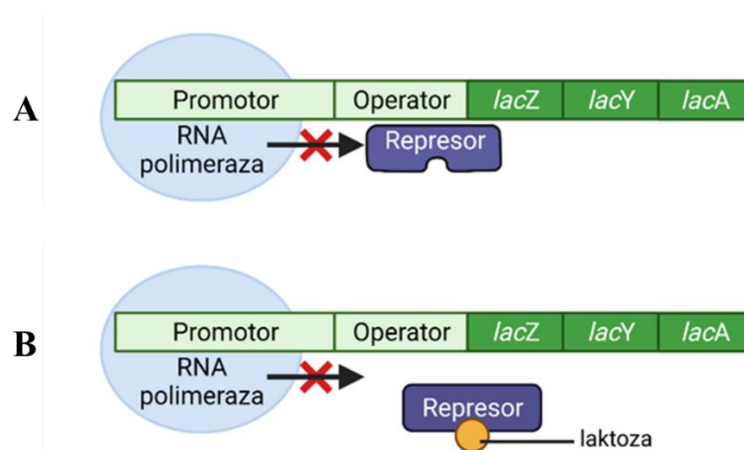


**Slika 8.** Ugradnja razmaknice u lokus CRISPR u bakteriji *E. coli*. **A** – Faktor IHF (od engl. *integration host factor*) sastavljen je od podjedinice  $\alpha$  (sivo obojeno) i podjedinice  $\beta$  (narančasto obojeno). IHF prepoznaje regije bogate A-T parovima baza unutar vodeće regije (plavo obojano) uzvodno od lokusa CRISPR te se veže za vodeću regiju i inducira savijanje DNA. **B** – Prvi nukleofilni napad nove razmaknice na granicu vodeće regije i prvog ponavljajućeg slijeda u lokusu CRISPR. **C** – Međuprodukt između dva nukleofilna napada. **D** – Drugi nukleofilni napad na granicu ponavljajuće regije i razmaknice. **E** – Potpuno ugrađena razmaknica u lokus CRISPR. **F** – Popravljena DNA s dupliciranim ponavljajućim sekvencama (\*). Za uspješnu ugradnju nove razmaknice u lokus CRISPR potrebna je i sekvenca PAM (označena crvenim kvadratom). Preuzeto i prilagođeno prema Nuñez i sur. 2016.

## 1.6. Regulacija ekspresije gena kod prokariota

Genom bakterija sastoji se od više susjednih gena organiziranih u **operone**. Gene koji čine jedan operon možemo podijeliti na strukturalne (geni koji kodiraju proteinske produkte) i regulatorne gene (strukturni geni koji kodiraju proteine koji su uključeni u regulaciju ekspresije drugih gena). Operoni se nalaze pod zajedničkom transkripcijskom kontrolom istog promotora i operatora. **Promotor** je sekvenca DNA na koju se veže enzim RNA-polimeraza koja je odgovorna za započinjanje transkripcije. **Operator** je sekvenca DNA na koju se vežu regulatorni proteini (represori, represorski proteini). **Gen regulator** (represor) kodira protein koji kontrolira transkripciju na način da se veže na operatorsko mjesto u DNA, a inaktivira se vezanjem **induktora** (npr. laktoza) za represor. Ukoliko je na operatorskom mjestu vezan represor, RNA-polimeraza se ne može vezati na promotor i ne može započeti transkripciju, no ako je operator slobodan, transkripcija može započeti. Regulacija može biti pozitivna ili negativna (Pećina-Šlaus i sur. 2003).

**Lac-operon** jedan je od najbolje istraženih primjera negativne regulacije ekspresije gena kod prokariota (Slika 9). Kao izvor energije, bakterija *E. coli* koristi laktozu zahvaljujući genima Lac-operona (*lacZ*, *lacY* i *lacA*) koji se nalaze jedan iza drugoga na bakterijskome kromosomu te imaju zajedničku regulaciju ekspresije. Ako je u stanici prisutna **laktoza** (induktor), tad će stanica početi proizvoditi enzime za razgradnju šećera laktoze (*lac*) (Slika 9B) (Pavlica 2022).



**Slika 9.** Lac-operon. Lac-operon čine tri strukturalna gena: *lacZ*, *lacY* i *lacA* (prikazana tamno zelenim pravokutnicima). Oni se nalaze jedan iza drugog na bakterijskom kromosomu i imaju zajedničku regulaciju ekspresije. Ti geni zajedno čine operon koji se nalazi pod zajedničkom transkripcijskom kontrolom istog promotora i operatora (označeni svjetlo zelenom bojom). Na promotor veže se enzim RNA-polimeraza (označena plavom elipsom) koja je odgovorna za počinjanje transkripcije. Laktoza je disaharid te ima funkciju induktora, a na slici je prikazana žutim krugom. **A** – Kada nema laktoze u sustavu, *lac* represor je vezan za operator i transkripcija je blokirana. **B** – Kad se laktoza veže za represor, *lac* represor se miče s operatora i započinje transkripcija. Preuzeto i prilagođeno prema Pavlica 2022.

**Arabinozni operon** (*ara* ili *araBAD* operon) je operon potreban za razgradnju L-arabinoze u bakteriji *E. coli*. Operon se sastoji od tri strukturalna gena: *araB*, *araA*, *araD* (*araBAD*) i regulatornih regija. Također sadrži i kontrolno mjesto *araI* i regulatorni gen *araC* i *araE*. Gen *araC* služi kao pozitivna kontrola ekspresije strukturalnih gena u sustavu, dok je uloga gena *araE* aktivni transport L – arabinoze. Operon *araBAD* aktivira se u prisutnosti L-arabinoze (Engleshberg i sur. 1965).

## 1.7. Regulacija sustava CRISPR-Cas podtipa I-E

Različiti faktori utječu na aktivnost sustava CRISPR-Cas u podtipu I-E bakterije *E. coli* K-12.

Jedna od glavnih strategija koju koriste bakterije, kako bi modificirale ekspresiju svog genoma, je da koriste alternativne sigma ( $\sigma$ ) podjedinice RNA-polimeraze, usmjeravajući inicijaciju transkripcije na različite klase promotora. Sve bakterije imaju jedan domaćinski sigma faktor koji je potreban za transkripciju većine staničnih gena tijekom rasta i jedan ili više alternativnih sigma faktora koji omogućuju transkripciju specifičnih skupova gena kao odgovor na okolišne uvjete. Bakterijski sigma faktori podijeljeni su u dvije strukturalne i funkcionalno odvojene grupe,  $\sigma^{70}$  i  $\sigma^{54}$ . Alternativni sigma faktor  $\sigma^S$ , usko je povezan sa  $\sigma^{70}$  i kodiran genom

*rpoS*, koji je glavni regulator opće reakcije na stres kod bakterije *E. coli* i kod mnogih drugih Gram-negativnih bakterija (Cavaliere i sur. 2016).

### **1.7.1. *rpoS***

*rpoS* (od engl. *alternative sigma factor of RNA polymerase*) je alternativni sigma faktor RNA-polimeraze koji ima glavnu ulogu u prilagodbi stanica na razne stresne uvjete na način da kontrolira ekspresiju brojnih gena koji štite stanicu od stresa i pomaže stanici prikupiti hranjive tvari (Schellhorn 2020).

Stacionarna faza je regulirana raznim kompleksnim mehanizmima, no njezin glavni regulator je protein RpoS, produkt gena *rpoS*, koji je ujedno i glavni regulator općeg odgovora na stres (Shimizu 2014). Protein RpoS eksprimira se ulaskom stanice u stacionarnu fazu rasta ili pod utjecajem nekog vanjskog stresa.

Mutacija u genu *rpoS* rezultira oslabljenom ekspresijom gena odgovornih na stres i virulenciju (Dong i Schellhorn 2010).

### **1.7.2. *crl***

Protein RpoS surađuje s malim proteinom Crl te mijenja ekspresiju regulona (skup operona smještenih u genomu bez nekog određenog reda, ali reguliranih istim proteinom) RpoS. Protein Crl može funkcionirati ili kao negativni ili kao pozitivni kofaktor za promjenu ekspresije različitih podjedinica regulona RpoS i posebno je jak efektor kad su razine proteina RpoS u stanicama niske (Typas i sur. 2007).

U početku se smatralo da gen *crl* kodira protein koji tvori kovrčava vlakna na površini stanice bakterije *E. coli* stoga je i po tome dobio naziv (od engl. *curli*) (Cavaliere i sur. 2016). Kasnije je otkriveno da ima ulogu regulatora gena *csg* koji kodiraju prethodno spomenute kovrčave proteinske podjedinice (Provence i Curtiss 1992; Taylor i Matthews 2015). Transkripcija gena *csg* ovisi o faktoru RpoS u stacionarnoj fazi rasta (Cavaliere i sur. 2016).

Mutacija u genu *crl* smanjuje ekspresiju gena, koji su regulirani putem gena *rpoS*, no ne smanjuje ekspresiju gena *rpoS*, već stimulira njegovu aktivnost tijekom stacionarne faze (Pratt i Silhavy 1998).

## 1.8. Krivulja rasta bakterijskih stanica

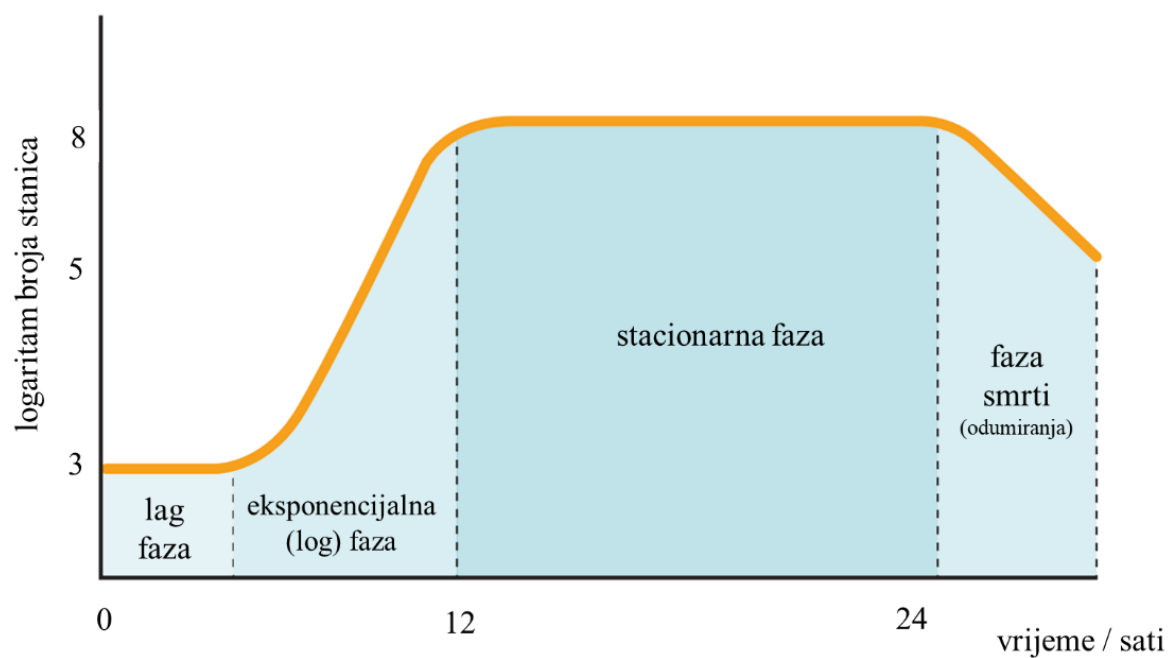
Rast bakterijskih stanica u laboratorijskim uvjetima može se podijeliti u nekoliko faza i može se prikazati krivuljom rasta (Slika 10).

Prva faza je **lag faza** (faza prilagodbe, adaptacije, suzdržanog rasta) i ona započinje odmah nakon što se bakterijska kultura inokulira u hranjivu podlogu. Tu fazu karakterizira povećanje volumena stanica, sinteza enzima i makromolekula te priprema za razmnožavanje. U ovoj fazi ne dolazi do značajnog rasta stanica zato jer inokulirane stanice trebaju određeno vrijeme da se prilagode novoj okolini (Rolfe i sur. 2012).

Druga faza je **eksponencijalna faza** (logaritamska faza, log faza) u kojoj dolazi do kontinuiranog razmnožavanja bakterijskih stanica. Na početku te faze dolazi do povećanja stanične mase, stanice proizvode aminokiseline i nukleotide. Ona traje tako dugo dok se ne potroše svi izvori hranjivih tvari ili u rjeđim slučajevima kada se nakupi previše toksina.

Treća faza je **stacionarna faza** u kojoj dolazi do nakupljanja toksina što je znak da uvjeti više nisu optimalni te to dovodi do faze odumiranja stanica. U **fazi odumiranja stanica** se broj živih stanica jako naglo kreće smanjivati i jedan dio tih stanica ugiba. Stanice koje prežive ne mogu se ponovno uzgajati ni izolirati, no mogu iskoristiti nutrijente koji su se oslobodili iz mrtvih stanica te se mogu održati u **produljenoj stacionarnoj fazi**. U produljenoj stacionarnoj fazi bakterijske stanice mogu preživjeti mjesecima ili čak godinama (Shimizu 2014).

Četvrta faza je **faza smrti** (faza odumiranja) te u njoj dolazi do potpunog odumiranja bakterijskih stanica. Brzina kojom dolazi do smrti bakterijskih stanica ovisi o relativnoj otpornosti pojedine vrste i toksičnosti uvjeta (Duraković 1991).



**Slika 10.** Krivulja rasta bakterijskih stanica. Prikazane su četiri faze rasta bakterijskih stanica – lag faza, eksponencijalna (log) faza, stacionarna faza i faza smrti (odumiranja). Preuzeto i prilagođeno prema Molecular devices 2017.



## 2. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Iako je adaptacija detaljno istražena, nije poznata faza rasta u kojoj dolazi do ugradnje nove razmaknice, kolike su količine proteina Cas1 i Cas2 potrebne za ugradnju te je li adaptacija ista u različitim genetičkim pozadinama tri poznata bakterijska soja *Escherichia coli* (BW25113, AB1157 i MG1655) koji se međusobno razlikuju u nekoliko gena. Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

1. Istražiti utjecaj ekspresije gena *cas1* i *cas2* na brzinu rasta i odrediti fazu rasta kad dolazi do ugradnje nove razmaknice.
2. Istražiti efikasnost adaptacije u tri različita bakterijska soja *E. coli* (genetičke pozadine).
3. Izolirati proteine iz različitih bakterijskih sojeva i analizirati količine proteina Cas1 i Cas2 pomoću elektroforeze SDS-PAGE te povezanost količine ovih proteina s adaptacijom.
4. Istražiti efikasnost ugradnje razmaknica u mutantima za gene *crl* i *rpoS*.

### 3. MATERIJALI I METODE

#### 3.1. MATERIJALI

##### 3.1.1. Bakterijski sojevi

U Tablici 1 navedeni su sojevi bakterije *Escherichia coli* K-12, njihovi genotipovi te izvor, referenca ili metoda dobivanja soja koje sam koristila u istraživanju.

**Tablica 1.** Popis korištenih sojeva bakterije *Escherichia coli* K-12.

Oznaka soja	Genotip	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
BW25113	F <sup>-</sup> , Δ( <i>araD-araB</i> )567, Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i> ), λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i> , Δ( <i>rhaD-rhaB</i> )568, <i>hsdR</i> 514	B. L. Wanner (Keio kolekcija sojeva bakterije <i>E. coli</i> )
<b>Oznaka soja dobivenog od BW25113</b>	<b>Razlika u genotipu u odnosu na soj BW25113</b>	<b>Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja</b>
IIB1165	+Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> )::FRT	Radovčić i sur. 2018.
IIB1410	+Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> ) <i>Tc</i> <sup>r</sup> <i>rpoS</i> :: <i>Tn10</i>	ovaj rad
IIB1425	+Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> ) <i>Km</i> <sup>R</sup> Δ <i>crl</i> :: <i>kan</i>	P1.IIB1424 x IIB1165
Oznaka soja	Genotip	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
AB1157	F <sup>-</sup> , <i>thr-1</i> , <i>araC14</i> , <i>leuB6</i> (Am), Δ( <i>gpt-proA</i> )62, <i>lacY1</i> , <i>tsx-33</i> , <i>qsr'-0</i> , <i>glnX44</i> (AS), <i>galK2</i> (Oc), λ <sup>-</sup> , <i>Rac-0</i> , <i>hisG4</i> (Oc), <i>rfbC1</i> , <i>mgl-51</i> , <i>rpoS396</i> (Am), <i>rpsL31</i> (strR), <i>kdgK51</i> , <i>xylA5</i> , <i>mtl-1</i> , <i>argE3</i> (Oc), <i>thiE1</i>	E.A. Adelberg
<b>Oznaka soja dobivenog od AB1157</b>	<b>Razlika u genotipu u odnosu na soj AB1157</b>	<b>Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja</b>
IIB1404	+Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> )::FRT	ovaj rad
Oznaka soja	Genotip	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
MG1655	F <sup>-</sup> , λ <sup>-</sup> , <i>rph-1</i>	M.S. Guyer
<b>Oznaka soja dobivenog od MG1655</b>	<b>Razlika u genotipu u odnosu na soj MG1655</b>	<b>Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja</b>
IIB1414	+ Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> )::FRT	ovaj rad
IIB1421	+ <i>rpoS</i> :: <i>Tn10</i> , Δ <i>cas3</i> :: <i>apra</i> Δ( <i>casC-casI</i> )::FRT	P1.IIB1165 x IIB1416

### 3.1.2. Plazmidi

U Tablici 2 navedena su dva plazmida koja sam koristila u istraživanju. Plazmid pBad-HisA služi kao negativna kontrola, ima gen za rezistenciju na antibiotik ampicilin, a transkripcija njegovog promotora aktivira se pri povišenoj koncentraciji L-arabinoze (arabinozni promotor). Plazmid pEB628 je derivat plazmida pBad-HisA koji je dobiven umetanjem gena *cas1* i *cas2* u plazmid pBad-HisA.

**Tablica 2.** Popis korištenih plazmida u istraživanju.

Plazmid	Opis	Izvor ili referenca
pBad-HisA	negativna kontrola, vektor bez gena <i>cas1</i> i <i>cas2</i>	<i>Invitrogen</i>
pEB628	uklonirani geni <i>cas1</i> i <i>cas2</i> u plazmid pBad-HisA	Ed L. Bolt

### 3.1.3. Početnice za PCR

**Tablica 3.** Popis korištenih početnica za lančanu reakciju polimerazom (PCR).

Ime početnice	Slijed	Uloga
CRISPR-R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR, veže se ispred lokusa CRISPR
Spacer-4	5'-GCGACCGCTCAGAAATTCCAGACCCGATCCAAA-3'	provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR, veže se unutar lokusa CRISPR

### 3.1.4. Hranidbene podloge i mediji

#### Tekući LB-medij za uzgoj bakterijskih stanica

**Tablica 4.** Sastav tekućeg LB-medija za uzgoj bakterijskih stanica.

Sastojak	Koncentracija / g dm <sup>-3</sup>
ekstrakt kvasca	5
bakto-tripton	10
NaCl	10

Tekući LB-medij napravljen je tako da su se navedeni sastojci iz Tablice 4 otopili u 1 dm<sup>3</sup> deionizirane vode (dH<sub>2</sub>O) te se dodala ona količina natrijeve lužine  $c(\text{NaOH}) = 5 \text{ mol dm}^{-3}$  koja je bila potrebna da pH vrijednost otopine iznosi 7,0. Priređena otopina je autoklavirana.

#### Kruta LB podloga

**Tablica 5.** Sastav krute LB podloge.

Sastojak	Koncentracija / g dm <sup>-3</sup>
ekstrakt kvasca	5
bakto-tripton	10
NaCl	10
agar	15

Krute LB podloge sličnog su sastava kao i tekući LB-medij, jedina razlika je u tome što je kod krutih LB podloga u smjesu dodano još 15 g dm<sup>-3</sup> agara za skrućivanje u gel.

### 3.1.5. Antibiotici i induktori

U Tablici 6 nalazi se antibiotik i induktor koji su bili potrebni za uzgoj bakterijskih stanica u tekućem mediju i selekciju transformanata na krutim podlogama.

**Tablica 6.** Korišteni antibiotik i induktor u uzgoju bakterijskih sojeva.

		Konačna koncentracija
Antibiotik	ampilicin	100 $\mu\text{g cm}^{-3}$
Induktor	L-arabinoza	0,2%-tna otopina

### 3.1.6. Otopine, puferi i boje

20%-tna otopina L-arabinoze (konačne koncentracije 0,2%) – otopina L-arabinoze u Milli-Q vodi

0,05 mol dm<sup>-3</sup> otopina kalcijeva klorida – otopina CaCl<sub>2</sub> u Milli-Q vodi

Agarozni 2% gel za elektroforezu:

**Tablica 7.** Smjesa za mali 2% gel za agaroznu elektroforezu (15 mL).

Sastojak	Masa / g	Volumen / $\mu\text{L}$
agarozna	0,3	
pufer TAE (1x)		15 · 10 <sup>3</sup>
<i>SYBR Safe</i> boja		1,1

**Tablica 8.** Smjesa za veliki 2% gel za agaroznu elektroforezu (30 mL).

Sastojak	Masa / g	Volumen / $\mu\text{L}$
agarozna	0,6	
pufer TAE (1x)		$30 \cdot 10^3$
SYBR Safe boja		1,4

Pufer za lizu (1 mL):

**Tablica 9.** Upute za pripremu 1 mL \*pufera za lizu stanica.

Sastojak	Stock otopina/ $\text{mol dm}^{-3}$	Volumen / $\mu\text{L}$	Konačna koncentracija / $\text{mmol dm}^{-3}$
Tris-HCl pH=8,0	1	25	25
NaCl	5	60	300
PMSF (inhibitor proteaza)	0,05	20	1
reH <sub>2</sub> O		895,1	

\*Pufer se drži cijelo vrijeme na ledu.

Stock PMSF (od engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*) ( $50 \text{ mmol dm}^{-3}$ ):

0,00879 g PMSF

1 mL 96% etanola

Bradford matična otopina:

0,01% *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) G-250

31,35% etanol

58,6% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Bradford radna otopina:

6% Bradford matična otopina

2,85% etanol

5,28% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>

Elektrodni pufer (SDS-PAGE):

Tris ( $\gamma = 3,0 \text{ g dm}^{-3}$ )

Glicin ( $\gamma = 14,4 \text{ g dm}^{-3}$ )

SDS ( $\gamma = 1,0 \text{ g dm}^{-3}$ )

Titrira se s  $6 \text{ mol dm}^{-3}$  HCl do pH = 8,3.

Pufer za denaturaciju (*Laemmli sample buffer*):

Tris-HCl ( $c = 125 \text{ mmol dm}^{-3}$ , pH = 6,8)

4% SDS

10%  $\beta$ -merkaptioetanol

32% glicerol

kap otopine boje *bromfenol plave*

SYBR<sup>TM</sup> Safe DNA Gel Stain:

Invitrogen by *Thermo Fischer Scientific*

Coomassie Brilliant Blue otopina (CBB):

2,5 g dm<sup>-3</sup> CBB G-250

10% ledena octena kiselina

45% metanol

Otopina za bojanje (SDS-PAGE):

0,1% CBB R-250

45% metanol

10% ledene octene kiseline

Otopina za odbojavanje (SDS-PAGE):

10% octena kiselina

10% etanol

Bromfenol plava – otopina bromfenol plave u 20%-tnom etanolu

TAE (50x) pufer za agaroznu gel elektroforezu:

**Tablica 10.** Smjesa za TAE (50x) pufer.

Sastojak	Koncentracija	Volumen / mL	Masa / g
Tris	4,85 g dm <sup>-3</sup>		60,5
EDTA	1 mmol dm <sup>-3</sup>	14,3	
ledena octena kiselina	20 mmol dm <sup>-3</sup>	25,0	



Navedeni sastojci iz Tablice 10 otopljeni su u destiliranoj vodi tako da se dobio konačni volumen otopine 250 mL. Zatim je otopina autoklavirana. U istraživanju koristila sam pufer TAE (1x) koji se dobije tako da se navedenu štok otopinu pufera TAE (50x) razrijedi potrebnom količinom destilirane vode (Tablica 11).

**Tablica 11.** Upute za pripremu 10 L pufera TAE (1x).

Sastojak	Volumen / mL
pufer TAE (50x)	200
dH <sub>2</sub> O	9800

Gel za SDS-Page:

**Tablica 12.** Uputa za pripremu smjese za 5 mL 10%-tnog donjeg gela te 2,5 mL 4%-tnog gornjeg gela.

Donji gel		Gornji gel	
Sastojak	Volumen / mL	Sastojak	Volumen / mL
dH <sub>2</sub> O	2,025	dH <sub>2</sub> O	1,525
1,5 M Tris HCl (pH = 8,8)	1,25	0,5 M Tris HCl (pH = 6,8)	0,625
A/Bis (30%)	1,65	A/Bis (30%)	0,3325
10% SDS	0,05	10% SDS	0,025
10% APS	0,025	10% APS	0,0175
TEMED	0,0025	TEMED	0,004

1,5 M Tris-HCl (pH = 8,8):

18,2 g Tris-HCl

6 mol dm<sup>-3</sup> HCl (do pH = 8,8)

Doda se dH<sub>2</sub>O tako da je ukupni volumen  
100 mL.

0,5 M Tris-HCl (pH = 6,8):

6 g Tris-HCl

6 M HCl (do pH = 6,8)

Doda se dH<sub>2</sub>O tako da je ukupni volumen  
100 mL.

30% A/Bis – 30% otopina akrilamid/bisakrilamid (*Rottiphorese*)

10% amonijev persulfat (APS):

500 mg APS

5 mL dH<sub>2</sub>O

N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED):

99% otopina N,N,N',N'-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Sigma Aldrich*)

### 3.1.7. Markeri veličina

Tablica 13. Korišteni proteinski markeri u istraživanju.

Proteinski markeri	Uloga	Proizvođač
<i>GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder</i>	agarozna gel-elektroforeza	<i>Thermo Fischer Scientific</i>
<i>Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards</i>	poliakrilamidna gel-elektroforeza	<i>Bio-Rad</i>

### 3.1.8. Programi

Za obradu podataka koristila sam *Kodak 1D Image Analysis Software v. 3.6.0.* i *MS Excell 2016.*

### 3.1.9. Uređaji

**Tablica 14.** Popis korištenih uređaja, njihovih proizvođača i uloga u istraživanju.

Uređaj	Proizvođač	Uloga
<i>Ultraspec 10 Cell Density Meter</i>	<i>Amersham Biosciences</i>	spektrofotometar za određivanje optičke gustoće stanica
<i>T100 Thermal Cycler</i>	<i>Bio-Rad</i>	PCR uređaj
<i>MiniAmp™ Thermal Cycler</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i>	PCR uređaj
<i>MO-230 DW</i>	<i>Gorenje</i>	mikrovalna pećnica
<i>OneRun Electrophoresis Cell</i>	<i>Embi Tec</i>	sustav za agaroznu elektroforezu
<i>Thermomixer comfort</i>	<i>Eppendorf</i>	termoblok
<i>Laboratory Centrifuges 3K30</i>	<i>SIGMA</i>	centrifuga
<i>Centrifuge 5415D</i>	<i>Eppendorf</i>	centrifuga
<i>Vibracell 72446</i>	<i>Bioblock Scientific</i>	sonikator za lizu stanica
<i>Mini-PROTEAN 3 Cell</i>	<i>Bio-Rad</i>	sustav za SDS-Page elektroforezu
<i>G25 Incubator Shaker</i>	<i>New Brunswick Scientific</i>	termostatirana tresilica
<i>Specord 50 Plus</i>	<i>Analytic Jena</i>	spektrofotometar
<i>Transilluminators UV Enduro™</i>	<i>Corning</i>	transiluminator
<i>MaxQ 420 HP</i>	<i>Thermo Fischer Scientific</i>	tresilica
<i>Vortex V-1 plus</i>	<i>BioSan</i>	miješalica
<i>FVL-2400N Combi-Spin</i>	<i>BioSan</i>	miješalica i centrifuga

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Određivanje brzine rasta i ugradnje razmaknice

Brzinu rasta bakterija odredila sam mjerenjem optičke gustoće pri  $OD_{600}$  pomoću spektrofotometra *Ultraspec 10 Cell Density Meter* (Amersham Biosciences). Bakterije transformirane s plazmidom pBad-HisA/pEB628 (pCas1-Cas2) inokulirala sam u 3 mL tekućeg LB-medija bez antibiotika uz dodatak 30  $\mu$ L 20%-tne otopine L-arabinoze (konačne koncentracije 0,2%) koja je služila kao induktor (kako bi se potaknula ekspresija gena s plazmida). Zatim sam sve stavila u inkubator *G25 Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific) na 37°C uz trešnju. Uzorke sam uzimala svakih pola sata kroz idućih 240 minuta, odredila sam  $OD_{600}$  te potom ostavila da rastu preko noći. Idući dan sam iz prekonocne kulture (prva pasaža) pripremila drugu pasažu na način da sam ju razrijedila 300 puta u svježem LB-mediju i dodala 30  $\mu$ L L-arabinoze. Ponovno sam mjerila  $OD_{600}$  kroz 240 minuta i isto ponovila za treću pasažu. Nakon 4 sata, iz prekonocne kulture uzela sam 10  $\mu$ L uzorka za analizu ugradnje razmaknice metodom PCR. Ovu analizu napravila sam na stanicama različitih genetičkih pozadina (AB1157, BW25113 i MG1655) i mutantima (za gene *rpoS* i *crl*).

### 3.2.2. Transformacija plazmidnom DNA

Prije transformacije bakterijskih stanica plazmidom potrebno je pripremiti kemijski kompetentne stanice kako bi se povećala efikasnost ulaska DNA u bakterijske stanice. To sam napravila tako da sam otpipetirala 40  $\mu$ L prethodno pripremljene prekonocne kulture u 3 mL tekućeg LB-medija, bez dodatka antibiotika, i uzgojila bakterijske stanice do logaritamske faze ( $OD_{600} = 0,4 - 0,6$ ) u inkubatoru *G25 Incubator Shaker* (New Brunswick Scientific) na 37°C uz trešnju. Zatim sam otpipetirala 1,5 mL bakterijskih stanica i centrifugirala ih na 8600 okretaja po minuti (rpm) pri 4°C dvije minute u *Centrifugi 5415D* (Eppendorf). Nakon centrifugiranja odlila sam supernatant i talog resuspendirala pomoću pipete u 200  $\mu$ L hladnog 50  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ . Ponovno sam centrifugirala uzorke na 8600 okretaja po minuti pri 4°C dvije minute, nakon centrifugiranja odlila sam supernatant i ovaj put talog resuspendirala pomoću pipete u 50  $\mu$ L hladnog 50  $\text{mmol dm}^{-3}$   $\text{CaCl}_2$ . Uzorke sam inkubirala na ledu 20 minuta, nakon toga dodala 1  $\mu$ L plazmida (pBad-HisA/pCas1-Cas2) i sve pažljivo promiješala. Inkubirala sam uzorke 20 minuta na ledu, a nakon toga sam stanice izložila toplinskome šoku tako što sam inkubirala uzorke jednu minutu na 42°C u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf), a zatim jednu minutu na ledu. Izlaganje stanica toplinskome šoku uzrokovalo je unos DNA u stanice. Kako bi se stanice oporavile, uzorcima sam dodala 500  $\mu$ L tekućeg LB-medija i stavila

ih na 30 minuta u inkubator *G25 Incubator Shaker (New Brunswick Scientific)* na 37°C uz trešnju. Nakon oporavka, 100 µL bakterijskih stanica sam nasadila na kruti medij kojem sam prethodno dodala ampicilin kako bi narasle samo one bakterije koje su transformirane s plazmidom. Podloge sam inkubirala preko noći na 37°C u inkubatoru.

### 3.2.3. Određivanje efikasnosti naivne adaptacije (ugradnje novih razmaknica)

Efikasnost naivne adaptacije (ugradnje novih razmaknica) provjerila sam metodom lančane reakcije polimerazom (od engl. *polymerase chain reaction*, PCR) i elektroforezom DNA u 2% agaroznom gelu korištenjem početnica koje se vežu ispred i unutar lokusa CRISPR navedene u Tablici 3.

#### 3.2.3.1. Liza stanica

Za PCR reakciju potreban je DNA kalup, odnosno oslobođena bakterijska DNA. Kako bih došla do genomske DNA najprije sam bakterijske stanice, izdvojene iz svake pasaže, lizirala. Prije nego što sam uzorak otpipetirala, epruvetu s prekonoćnom kulturom stavila sam nekoliko sekundi u miješalicu *FVL-2400N Combi-Spin (BioSan)* kako bi se sadržaj epruvete dobro promiješao. Potom sam otpipetirala 10 µL prekonoćne kulture u 50 µL dH<sub>2</sub>O (volumen prekonoćne kulture ovisi o gustoći bakterijske kulture) te dobila konačan volumen od 60 µL. Na uređaju za PCR *T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)* stanice sam lizirala 3 minute na 98°C.

#### 3.2.3.2. PCR reakcija za umnažanje linearne DNA

Kako bih umnožila DNA provela sam metodu PCR. Za provedbu PCR-a potrebno je 1 µL DNA kalupa, koji sam dobila lizom bakterijskih stanica, i 9 µL PCR reakcijske smjese koju sam pripremila prema uputama iz Tablice 16.

**Tablica 16.** Sastav reakcijske smjese za PCR s enzimom PhireGreen Master Mix (10 µL).

Sastojak	Volumen / µL
2x PhireGreen Master Mix*	5
CRISPR-R	0,5
Spacer-4	0,5
dH <sub>2</sub> O	3

\*2x PhireGreen Master Mix sadrži DNA polimerazu, dNTP nukleotide, boju za nanošenje na gel te odgovarajući pufer.

Za reakciju PCR koristila sam uređaje *T100 Thermal Cycler (Bio-Rad)* te *MiniAmp™ Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific)*, a program umnažanja DNA nalazi se u Tablici 17.

**Tablica 17.** PCR program umnažanja.

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme / s	Događanje	Broj ciklusa
1.	98	30	početna denaturacija	1
2.	98	5	denaturacija	30
3.	54	5	vezanje početnica	
4.	72	15	produljivanje lanca DNA	
5.	72	60	završno produljivanje lanca	1
6.	12	∞	hlađenje	

### 3.2.3.3. Elektroforeza DNA u agaroznom gelu

#### Priprema 2% agaroznog gela

Kako bih provjerila uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provela sam elektroforezu u 2% agaroznom gelu. Odvagala sam potrebnu količinu agaroze i prebacila ju u Erlenmayerovu tikvicu te na to ulila potrebnu količinu TAE (1x) pufera. Tako pripremljenu otopinu zagrijavala sam u mikrovalnoj pećnici *MO-230 DW (Gorenje)* pri snazi P 50 ~ 1 – 2 minute (odnosno dok otopina nije postala bistrija). Erlenmayerovu tikvicu sam ohladila pod mlazom hladne vode, dodala potrebnu količinu inkalirajuće (fluorescentne) boje *SYBR™ Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)*, promiješala otopinu i izlila ju u prethodno pripremljen kalup s dodanim češljicom kako bih dobila jažice za nanos uzoraka. Sve sam prekrila aluminijskom folijom kako bi boja zadržala što više fluorescencije i ostavila stajati na sobnoj temperaturi 20 minuta. Ovisno o broju uzoraka, pripremila sam mali (15 mL) ili veliki gel (30 mL) (Tablica 7 i 8).

#### Elektroforeza

Nakon što se agarozni gel polimerizirao prebacila sam ga u kadicu za elektroforezu i prekrila TAE (1 x) puferom. U prvu jažicu sam nanijela 2 µL *GeneRuler™ 1 kB DNA Ladder (Thermo Scientific)* proteinskog markera za provjeru veličine fragmenata DNA, a u ostale jažice po 4 µL

dobivenog PCR uzorka. Elektroforezu sam provela u *OneRun Electrophoresis Cell (Embi Tec)* sustavu za elektroforezu pri naponu 50 V u trajanju od ~45 minuta (odnosno do trenutka kad je žuta boja iz PCR reakcijske smjese došla do kraja gela).

#### Analiza gelova

Gelove sam fotografirala na UV lampi i analizirala ih programom *Kodak 1D Image Analysis Software v.3.6.0*. Ukoliko je došlo do ugradnje razmaknice u sojevima, uz početnu vrpcau CRISPR bila je vidljiva i dodatna vrpca 60tak parova baza iznad.

### **3.2.4. Izolacija proteina i SDS-PAGE elektroforeza**

#### **3.2.4.1. Izolacija proteina**

Kako bih istražila količine proteina Cas1 i Cas2 i njihov utjecaj na adaptaciju izolirala sam ukupne proteine iz prekonocne kulture (druge pasaže) te im odredila koncentraciju. Otpipetirala sam 1,5 mL prekonocne kulture i centrifugirala 5 minuta na 14000 okretaja po minuti na 4°C u centrifugi *Laboratory Centrifuges 3K30 (SIGMA)*. Nakon centrifugiranja odlila sam supernatant, a pelet inkubirala na ledu. Potom sam pripremila pufer za lizu prema uputama (Tablica 10) te pelet resuspendirala u 400 µL pripremljenog pufera.

#### Sonikacija uzoraka

Pripremljene uzorke sam sonicirala kako bih uništila staničnu stijenku bakterija i došla do proteina. Koristila sam najmanju sondu sonikatora *Vibracell 72446 (Bioblock Scientific)* koju sam počistila etanolom prije i nakon uranjanja u uzorak. Sonikaciju sam provodila tako da sam sondu uronila do pola tekućine uzorka i tako ju držala dvije sekunde, a nakon toga izvadila sondu na četiri sekunde (odmor) i zatim ponovila postupak još pet puta (odnosno dok otopina nije postala bistrija). Sonicirane uzorke centrifugirala sam 10 minuta pri 14000 okretaja po minuti na 4°C, a zatim sam supernatant prebacila u nove epruvete pipetom. Tijekom cijelog postupka uzorke sam držala na ledu kako ne bi došlo do denaturacije proteina zbog otpuštanja velikih količina topline.

#### Određivanje koncentracije proteina

Ukupnu koncentraciju proteina odredila sam spektrofotometrijski po metodi prema Bradfordu. Za Bradfordovu reakciju pomiješala sam 1000 µL Bradfordovog reagensa i 20 µL pripremljenog uzorka, odnosno 20 µL pufera za lizu za pripremu slijepe probe. Pripremljene uzorke sam vorteksirala na *Vortex V-1 plus (Bio-San)* dok cijela otopina nije poprimila plavu boju (plava boja *Coomassie Brilliant Blue G-250* se vezala za proteine). Uzorke sam inkubirala u mraku 5 minuta na sobnoj temperaturi. Potom sam uzorke prebacila u kivete te sam pomoću

spektrofotometra *Specord 50 Plus (Analytic Jena)* izmjerila apsorbanciju pri valnoj duljini od 595 nm. Koncentraciju ukupnih proteina dobila sam tako da sam vrijednost apsorbancije uvrstila u jednadžbu baždarnog pravca. Baždarni pravac pripremljen je prije mjerenja koncentracije proteina u uzorcima.

#### **3.2.4.2. Denaturirajuća elektroforeza na poliakrilamidnom gelu (od engl. *sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE*)**

Kako bih razdvojila proteine, provela sam elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata u sustavu *Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad)*.

##### Denaturacija proteina

Kako bi se mogla provesti SDS-PAGE elektroforeza potrebno je denaturirati proteine. To sam napravila tako da sam otpipetirala 100 µL uzorka i resuspendirala u njemu 25 µL pufera za denaturaciju *Laemml sample buffer* (omjer 4:1). Pripremljene uzorke sam denaturirala tako da sam ih izložila toplinskome šoku u termobloku *Thermomixer Comfort (Eppendorf)* 5 minuta na 95°C.

##### Priprema gelova

Kako bi se mogla provesti SDS-PAGE elektroforeza potrebno je pripremiti dva gela – gel za razdvajanje i gel za sabijanje. Najprije sam pripremila 10% gel za razdvajanje (donji gel) prema uputama (Tablica 12) te sam ga prebacila uz pomoć pipete u prethodno složen „sendvič“ koji se sastojao od dva stakla između kojih su se nalazile razmaknice. Na donji gel pipetom sam dodala tanki sloj otopine boje *bromfenol plave* u etanolu kako gel ne bi bio u dodiru sa zrakom (kisik iz zraka može uzrokovati prekid polimerizacije) te sve ostavila ~45 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon što se gel stisnuo, izlila sam sloj otopine *bromfenol plave* s gela. Potom sam pripremila 4% gel za sabijanje (gornji gel) prema uputama (Tablica 12) i dodala pripremljenu smjesu pipetom između stakalca na donji gel. Kad sam dopunila gel za sabijanje do vrha, pažljivo sam uronila češljic kako bih dobila jažice za unos uzoraka. Gel sam ostavila stajati na sobnoj temperaturi ~2 sata. Nakon što se gel stisnuo, oprezno sam izvadila češljice.

##### Elektroforeza SDS-PAGE

Stalak s gelovima učvrstila sam na nosač i sve zajedno prebacila u kadicu za elektroforezu koju sam potom napunila elektrodnom puferom. U prvu jažicu nanijela sam 2 µL proteinskog markera *Precision Plus Protein™ All Blue Prestained Protein Standards (Thermo Fisher Scientific)*. U ostale jažice nanijela sam prethodno pripremljene uzorke tako da je svaka jažica sadržavala 4,5 µg ukupnih proteina. Gelove s nanesenim uzorcima prebacila sam u veću kadicu



koja je prethodno napunjena s elektrodnim puferom. Na kadicu stavila sam poklopac, elektrode spojila s izvorom struje te pokrenula elektroforezu najprije na 15 minuta na napon od 100 V, a zatim na 45 minuta na napon od 180 V. Nakon provedene elektroforeze, rastavila sam aparaturu, odvojila gelove od stakalca te odvojila gel za sabijanje (s jažicama). Gel sam prebacila u veliku petrijevku i prelila ga bojom *Coomassie brilliant blue CBB R-250* kako bi se obojali proteini. Gel sam tako ostavila stajati sat vremena da se inkubira na tresilici *MaxQ 420 HP (Thermo Fischer Scientific)* pri sobnoj temperaturi. Nakon sat vremena, pipetom sam maknula boju za bojanje te ju zamijenila bojom za odbojavanje kako bih maknula boju koja se nije vezala za proteine. Gel sam ostavila 45 minuta da se inkubira na tresilici pri sobnoj temperaturi. Kako postupak odbojavanja ne bi trajao predugo, u petrijevku sam stavila smotuljak papira kako bi papir upio dio boje. Nakon što se maknuo višak boje, gel sam skenirala na UV transiluminatoru *Transilluminators UV Enduro™ (Corning)* te sam analizirala ekspresiju proteina Cas1 i Cas2 u različitim sojevima.

## 4. REZULTATI

### 4.1. Određivanje krivulje rasta bakterijskih sojeva

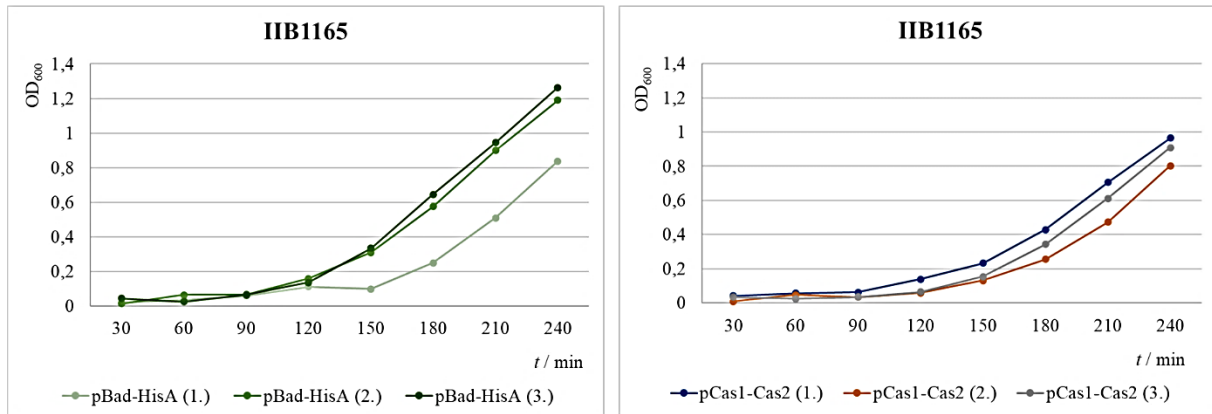
Kako bih utvrdila utjecaj ekspresije gena *cas1* i *cas2* na brzinu rasta bakterija, rast sam pratila mjereći optičku gustoću pri valnoj duljini OD<sub>600</sub> svakih pola sata. Koristila sam bakterijske sojeve s inaktiviranim genima *cas* kako ne bi došlo do autoimunosti uslijed ugradnje razmaknice s kromosoma (geni za kompleks Cascade i protein Cas3). Kako bih potaknula ekspresiju samo gena *cas1* i *cas2*, koji su neophodni za ugradnju razmaknica, u bakterijske sojeve morala sam ubaciti odgovarajući plazmid. Bakterijske sojeve transformirala sam s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) što je omogućilo prekomjernu ekspresiju proteina Cas1 i Cas2. Negativnu kontrolu sam pripremila tako da sam iste bakterijske sojeve transformirala s „praznim“ plazmidom pBad-HisA. Ekspresiju proteina Cas1 i Cas2 s plazmida sam inducirala dodatkom 0,2%-tne otopine L-arabinoze. Bakterijske sojeve uzgajala sam tri dana kroz tri uzastopne pasaže i svakih pola sata mjerila optičku gustoću bakterijskih stanica kroz 240 minuta.

Najprije sam usporedila tri bakterijska soja *E. coli* (IIB1165, IIB1404 i IIB1414) koja imaju tri različite genetičke pozadine (BW25113, AB1157 i MG1655). Genetička pozadina znači da svaki soj ima svoje karakteristične mutacije koje se ne nalaze u ostalim pozadinama, a svi sojevi su K-12. U sva tri soja dodane su iste mutacije u genima *cas* i trebali bi se isto ponašati ukoliko nema utjecaja od pozadine. Primijetila sam da se brzina rasta bakterijskih stanica u sojevima s „praznim“ plazmidom pBad-HisA povećala kroz pasaže (u prvoj pasaži je najmanja brzina rasta stanica, dok je u trećoj najveća). S druge strane, brzina rasta bakterijskih stanica koje su transformirane s plazmidom pCas1-Cas2 razlikovala se ovisno o genetičkoj pozadini (Slika 11).

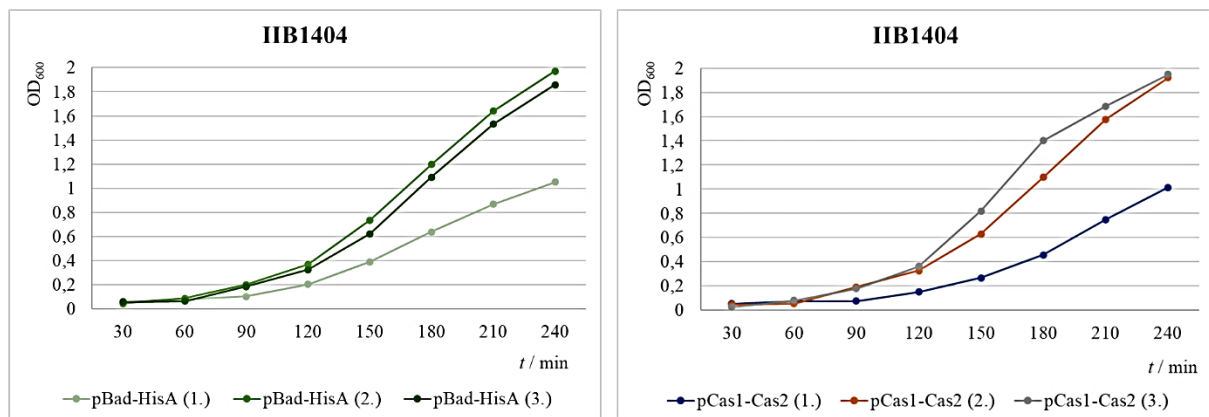
Kod bakterijskih sojeva IIB1414 (u genetičkoj pozadini MG1655) i IIB1404 (u genetičkoj pozadini AB1157) brzina rasta bakterijskih stanica se povećavala kroz pasaže (najmanja brzina rasta stanica u prvoj pasaži, a najveća u trećoj) i došla do OD<sub>600</sub> ~ 2, na isti način kao i kad se koristio „prazni“ plazmid (Slika 11B i C). Jedino je u slučaju bakterijskog soja IIB1165 (u genetičkoj pozadini BW25113) došlo je do suprotne pojave. Najveća brzina rasta uočena je u prvoj pasaži, dok se u drugoj i trećoj pasaži brzina rasta stanica smanjila (Slika 11A) i dosegla je samo OD<sub>600</sub> ~ 1, za razliku od „praznog“ plazmida gdje je iznosila ~ 1,4. Može se uočiti da u bakterijskim sojevima IIB1404 (genetička pozadina AB1157) i IIB1414 (genetička pozadina MG1655) ekspresija proteina Cas1 i Cas2 s plazmida pEB628 ne utječe na

brzinu rasta, dok u soju IIB1165 (genetička pozadina BW25113) dolazi do usporavanja rasta što bi mogla biti posljedica djelovanja proteina Cas1 i Cas2 na ugradnju novih razmaknica.

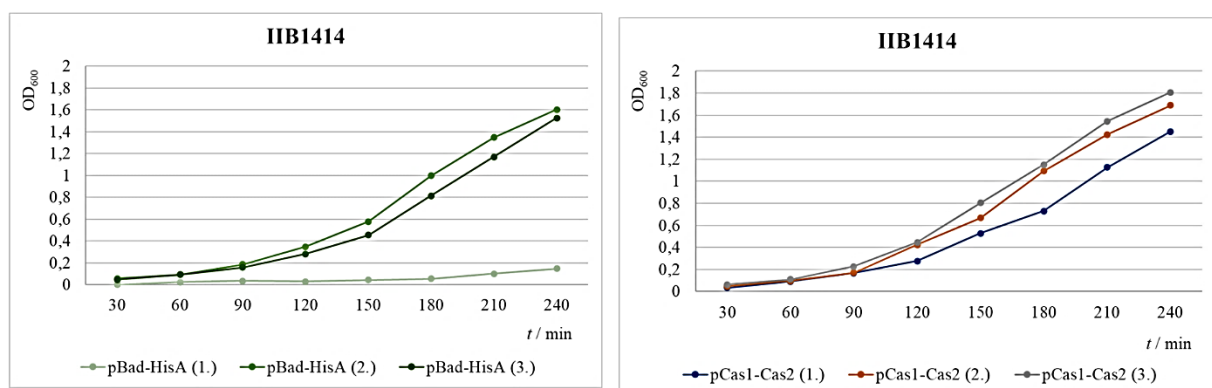
**A**



**B**



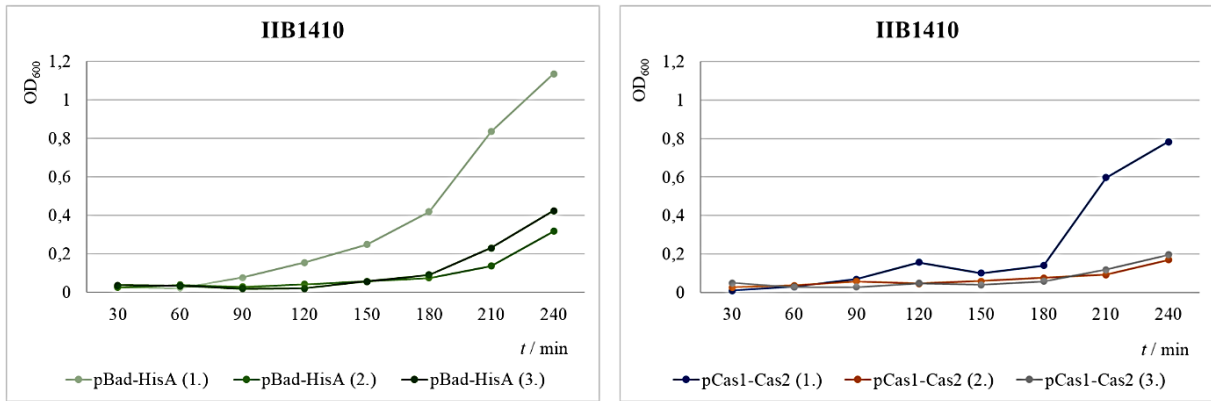
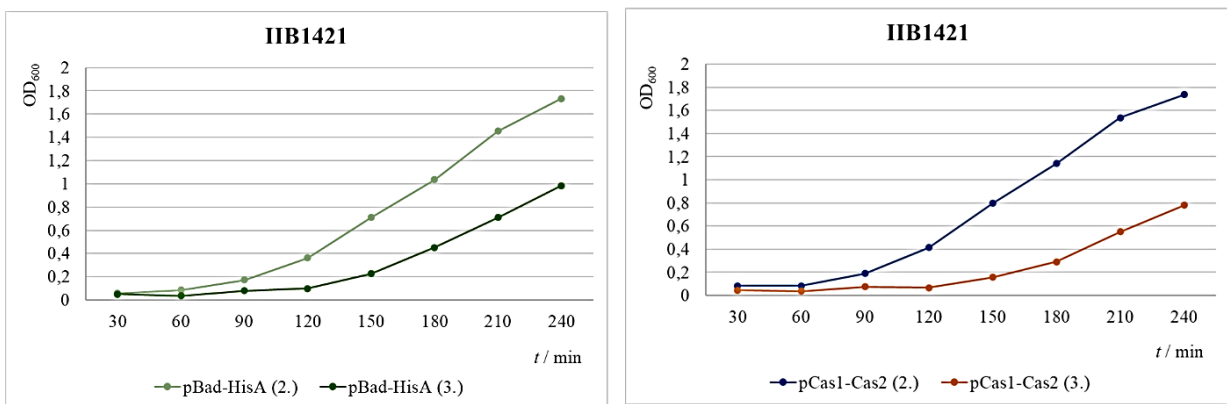
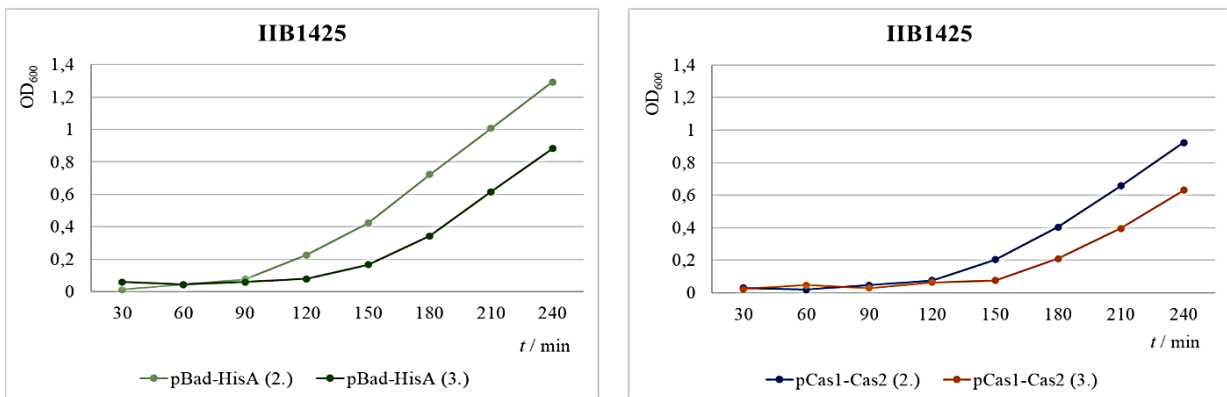
**C**



**Slika 11.** Utjecaj ekspresije proteina Cas1 i Cas2 na brzinu rasta bakterijskih stanica različitih genetičkih pozadina. Krivulje rasta bakterijskih sojeva sa i bez ekspresije gena *cas1* i *cas2*. **A** – Bakterijski soj IIB1165 u genetičkoj pozadini BW25113 (srednja vrijednost za četiri mjerenja). **B** – Bakterijski soj IIB1404 u genetičkoj pozadini AB1157 (srednja vrijednost za četiri mjerenja). **C** – Bakterijski soj IIB1414 u genetičkoj pozadini MG1655 (srednja vrijednost za tri mjerenja).

Također, željela sam istražiti utječu li geni *rpoS* i *crl* na adaptaciju. Ovi geni inače su mutirani u soju AB1157 pa sam željela istražiti njihov utjecaj u druge dvije genetičke pozadine, odnosno bakterijska soja. Napravljeni su bakterijski sojevi u kojima su ovi geni mutirani. Radi se o bakterijskim sojevima IIB1410 i IIB1421 (mutacija za gen *rpoS* u dvije različite pozadine) te o bakterijskom soju IIB1425 (mutacija za gen *crl*). Krivulje rasta bakterijskih sojeva prikazane su na Slici 12. Primijetila sam da se brzina rasta bakterijskih stanica opet usporila u sojevima s plazmidom pEB628, a naročito u slučaju soja s mutacijom *rpoS* u pozadini BW25113 gdje je OD<sub>600</sub> u drugoj i trećoj pasaži iznosila samo 0,2. Mutacija *crl* u genetičkoj pozadini BW25113 je podsjećala na soj IIB1165, dok do usporavanja nije došlo u soju IIB1421 gdje se mutacija *rpoS* nalazi u pozadini MG1655 (Slika 12B).

Svaku krivulju rasta (Slika 11 i 12) dobila sam tako da sam uzela srednju vrijednost svih mjerenja koja sam provela. U slučaju bakterijskih sojeva IIB1404 i IIB1165 mjerenje sam ponovila četiri puta, kod bakterijskih sojeva IIB1414, IIB1421 i IIB1425 tri puta, a kod bakterijskog soja IIB1410 pet puta.

**A****B****C**

**Slika 12.** Utjecaj mutacija gena *rpoS* i *crl* i ekspresije proteina Cas1 i Cas2 na brzinu rasta bakterijskih stanica različitih genetičkih pozadina. Krivulje rasta bakterijskih sojeva sa i bez ekspresije gena *cas1* i *cas2*. **A** – Bakterijski soj IIB1410 u genetičkoj pozadini BW25113, mutant za gen *rpoS* (srednja vrijednost za pet mjerenja). **B** – Bakterijski soj IIB1421 u genetičkoj pozadini MG1655, mutant za gen *rpoS* (srednja vrijednost za tri mjerenja). **C** – Bakterijski soj IIB1425 u genetičkoj pozadini BW25113, mutant za gen *crl* (srednja vrijednost za tri mjerenja).

## 4.2. Efikasnost naivne adaptacije (ugradnja novih razmaknica)

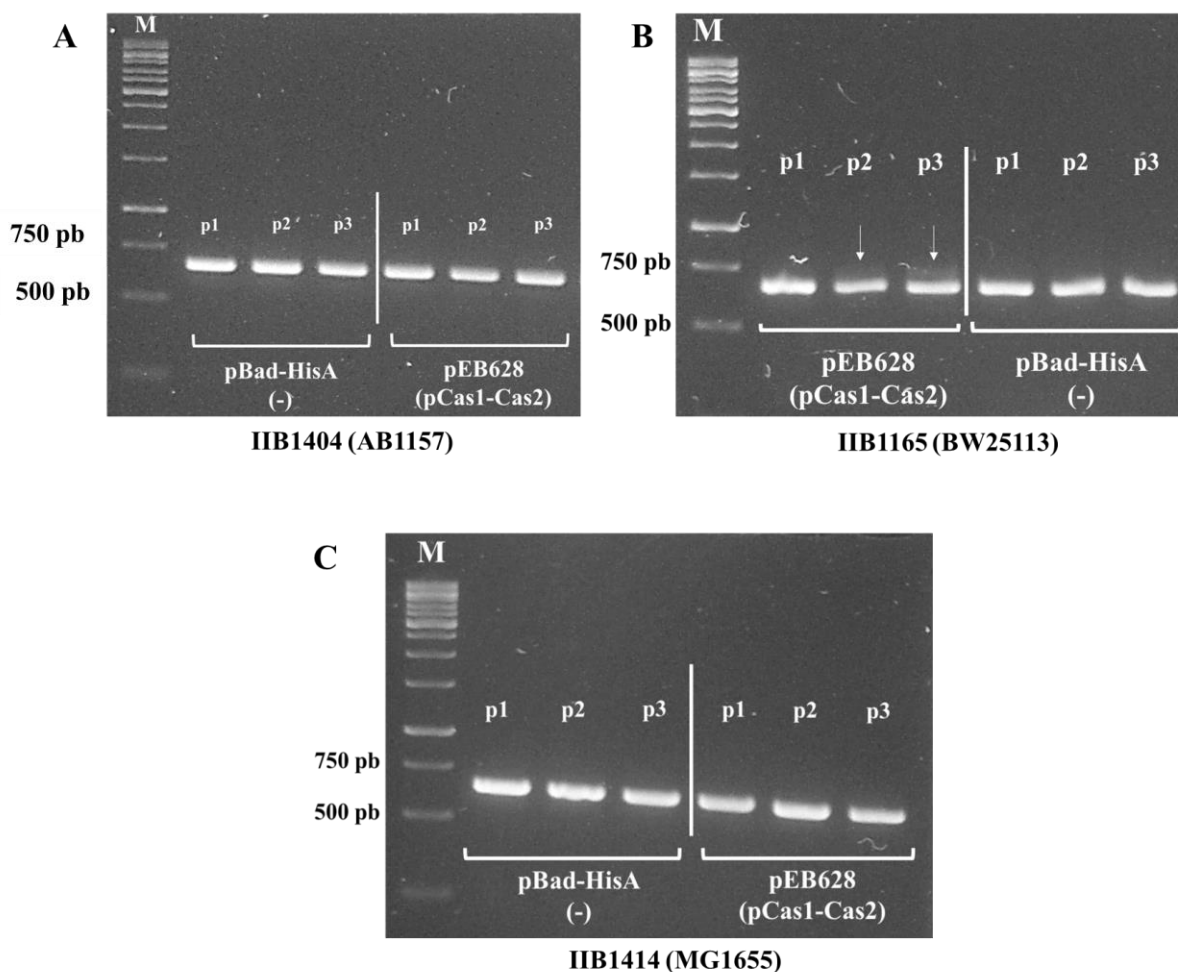
Sporiji rast stanica tijekom druge i treće pasaže prilikom ekspresije proteina Cas1 i Cas2 mogao bi se objasniti ugradnjom novih razmaknica. Metodom lančane reakcije polimerazom (PCR) provjerila sam efikasnost naivne adaptacije, odnosno provjerila sam je li došlo do ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR. Stanice sam lizirala nakon rasta preko noći i stanični ekstrakt koristila kao kalup za reakciju PCR. Nakon umnažanja DNA metodom PCR, provela sam elektroforezu u 2% agaroznom gelu. Nakon toga gelove sam fotografirala i analizirala kako bih istražila efikasnost adaptacije.

Najprije sam istražila efikasnost adaptacije (ugradnje razmaknice) u prva tri različita bakterijska soja *E. coli*: IIB1404 (genetička pozadina AB1157), IIB1165 (genetička pozadina BW25113) i IIB1414 (genetička pozadina MG1655).

Na Slici 13A nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1404 (genetička pozadina AB1157). Vidljiva je samo početna vrpca od 662 pb što nam govori da nije došlo do ugradnje nove razmaknice i u slučaju transformacije bakterijskih plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) u odnosu na kontrolu (pBad-HisA). Uzgoj bakterijskih stanica i provjera ugradnje razmaknice ponovljen je četiri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.

Na Slici 13B nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1165 (genetička pozadina BW25113). Ovdje se u pasaži 2 i 3 pojavila još jedna vrpca koja je dulja za približno 60 pb od početne vrpce (662 pb) u stanicama transformiranih s plazmidom pCas1-Cas2. To nam govori kako je u tim sojevima došlo do ugradnje nove razmaknice, za razliku od stanica transformiranih s plazmidom pBad-HisA. Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljen je četiri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.

Na Slici 13C nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1414 (genetička pozadina MG1655). Ponovo se vidi samo početna vrpca od 662 pb što nam govori da nije došlo do ugradnje nove razmaknice ni u slučaju transformacije bakterijskih stanica s praznim plazmidom (pBad-HisA) ni u slučaju transformacije s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2). Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljen je tri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.



**Slika 13.** Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR. Produkti reakcije PCR analizirani su u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3). Bakterijski soj transformiran je plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 (ekspirira proteine Cas1 i Cas2 s plazmida). U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. **A** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1404 koji se nalazi u genetičkoj pozadini AB1157. Pokus je ponovljen četiri puta. **B** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1165 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113. Bijele strelice označavaju novu vrpce koja je dulja ~60 pb od početne vrpce (662 pb). Pokus je ponovljen četiri puta. **C** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1414 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655. Pokus je ponovljen tri puta.

Na isti način istražila sam efikasnost adaptacije (ugradnje razmaknice) u mutantima za gene *rpoS* i *crl*. Radi se o bakterijskim sojevima IIB1410 i IIB1421 (mutanti za gen *rpoS*) te IIB1425 (mutant za gen *crl*).

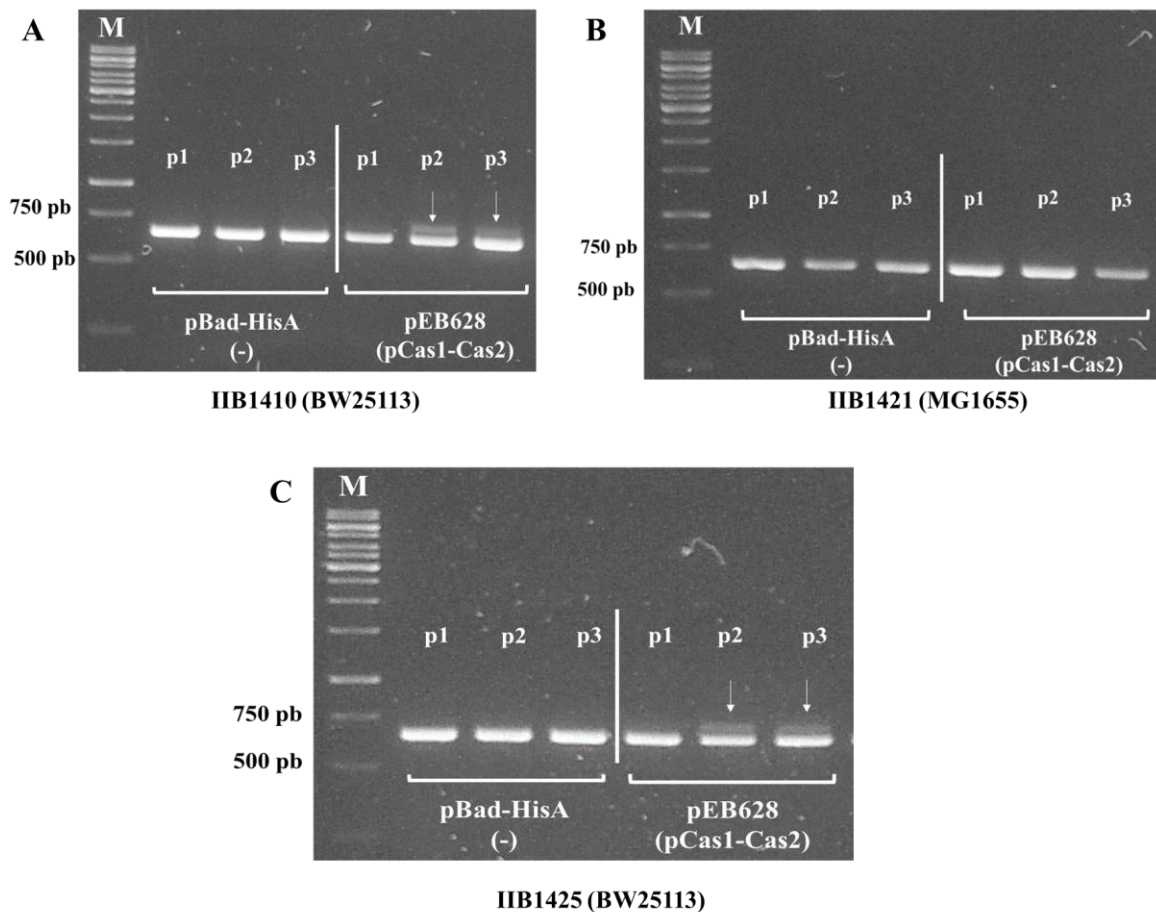
Na Slici 14A nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1410 (mutant za gen *rpoS*). Može se uočiti da se u pasaži 2 i 3

pojaviła još jedna vrpca koja je dulja za približno 60 pb od početne vrpce (662 pb). To nam govori kako je u tim sojevima došlo do ugradnje nove razmaknice. U bakterijskim stanicama koje su bile transformirane plazmidom pBad-HisA te u bakterijskim stanicama transformiranih s plazmidom pEB628 (prva pasaža), nije došlo do ugradnje nove razmaknice – postoji samo početna vrpca od 662 pb. Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljen je pet puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.

Na Slici 14B nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1421 (mutant za gen *rpoS*). Vidljiva je samo početna vrpca od 662 pb što nam govori da nije došlo do ugradnje nove razmaknice u slučaju transformacije bakterijskih stanica s praznim plazmidom (pBad-HisA), a ni u slučaju transformacije s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2). Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljena je tri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.

Na Slici 14C nalazi se rezultat reakcije PCR u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3) u bakterijskom soju IIB1425 (mutant za gen *crl*). Vidljivo je kako se u nekim sojevima (bakterijski sojevi transformirani plazmidom pEB628, pasaža 2 i 3) pojavila još jedna vrpca koja je dulja za približno 60 pb od početne vrpce (662 pb). To nam govori kako je i u tim sojevima došlo do ugradnje nove razmaknice. Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljena je tri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.

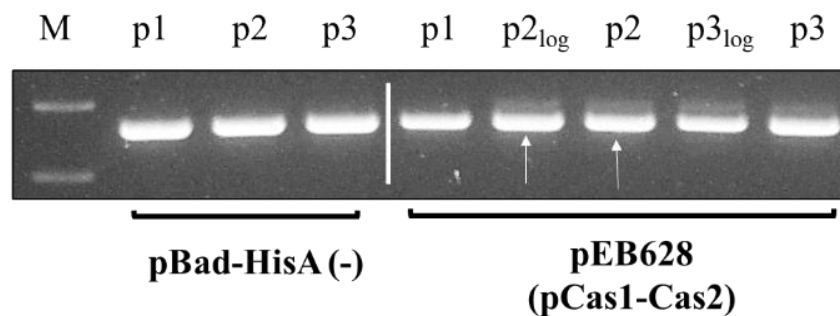




**Slika 14.** Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR. Produkti reakcije PCR analizirani su u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3). Bakterijski soj transformiran je plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 (ekspirira proteine Cas1 i Cas2 s plazmida). U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. **A** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1410 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113 te je mutant za gen *rpoS*. Bijela strelica označava novu vrpcu koja je dulja ~60 pb od početne vrpce (662 pb). Pokus je ponovljen pet puta. **B** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1421 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655 te je mutant za gen *rpoS*. Pokus je ponovljen tri puta. **C** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bakterijskog soja IIB1425 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113. Bijele strelice označavaju novu vrpcu koja je dulja ~60 pb od početne vrpce (662 pb). Pokus je ponovljen tri puta.

### 4.3. Ovisnost ugradnje razmaknica o fazi rasta

Kako sam primijetila da su stanice IIB1165 (divlji tip, *wt*) u prisutnosti plazmida pCas1-Cas2 rasle sporije u usporedbi sa stanicama s „praznim“ plazmidom pBad-HisA (Slika 11A) i kako su ugradile nove razmaknice (Slika 13), željela sam istražiti u kojoj fazi rasta se ona događa. Uzela sam uzorke bakterijskih stanica nakon 4 sata inkubacije i nakon rasta preko noći, no samo za drugu i treću pasažu jer se ugradnja nije događala u prvoj pasaži. Ugradnju razmaknica analizirala sam na isti način kako je opisano ranije. Uzorke stanica koje su rasle 4 sata označila sam oznakom log. Slika 15 pokazuje kako je ugradnja razmaknica u lokus CRISPR nastupila nakon 4 sata u drugoj pasaži (p2log) i da je ostala sličnog intenziteta i nakon rasta preko noći (p2). Isto se dogodilo i u trećoj pasaži (p3log  $\approx$  p3). To nam govori da se ugradnja razmaknice događa tijekom rane log faze rasta i da se poslije ne ugrađuju nove razmaknice. Uzgoj bakterijskih stanica ovog soja i provjera ugradnje razmaknice ponovljena je tri puta, a ovdje su prikazani reprezentativni rezultati.



**Slika 15.** Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR. Produkti reakcije PCR analizirani su u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3). Uzorci su uzeti nakon 4 sata (p2<sub>log</sub>, p3<sub>log</sub>) i nakon rasta preko noći u drugoj i trećoj pasaži. Bakterijski soj transformiran je plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 (ekspirira proteine Cas1 i Cas2 s plazmida). U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. Ugradnja razmaknica u lokus CRISPR nastupila je nakon 4 sata i ostala je sličnog intenziteta i nakon rasta preko noći. Pokus je ponovljen tri puta.

#### 4.4. Utjecaj genetičke pozadine na ekspresiju proteina Cas1 i Cas2

Kako bih potvrdila postoji li povezanost između količine proteina Cas1 i Cas2, brzine rasta i efikasnosti adaptacije, izolirala sam ukupne proteine iz prekonodne kulture (druge pasaže jer se tada uočava ugradnja nove razmaknice). Nakon toga izmjerila sam koncentraciju ukupnih proteina u bakterijskim sojevima *E. coli* koristeći metodu po Bradfordu. Vrijednosti koncentracija ukupnih proteina prikazane su u Tablici 18.

**Tablica 18.** Srednje izmjerene vrijednosti koncentracije proteina za sojeve IIB1165, IIB1410, IIB1425, IIB1404, IIB1414 i IIB1421 prije nanošenja na gel SDS-PAGE.

Bakterijski soj	Koncentracija proteina / mg mL <sup>-1</sup>	
	plazmid	
	pBad-HisA	pEB628 (pCas1-Cas2)
IIB1165	0,58	0,71
IIB1410	0,88	0,92
IIB1425	0,37	0,54
IIB1404	1,14	1,15
IIB1414	1,41	1,29
IIB1421	0,96	0,93

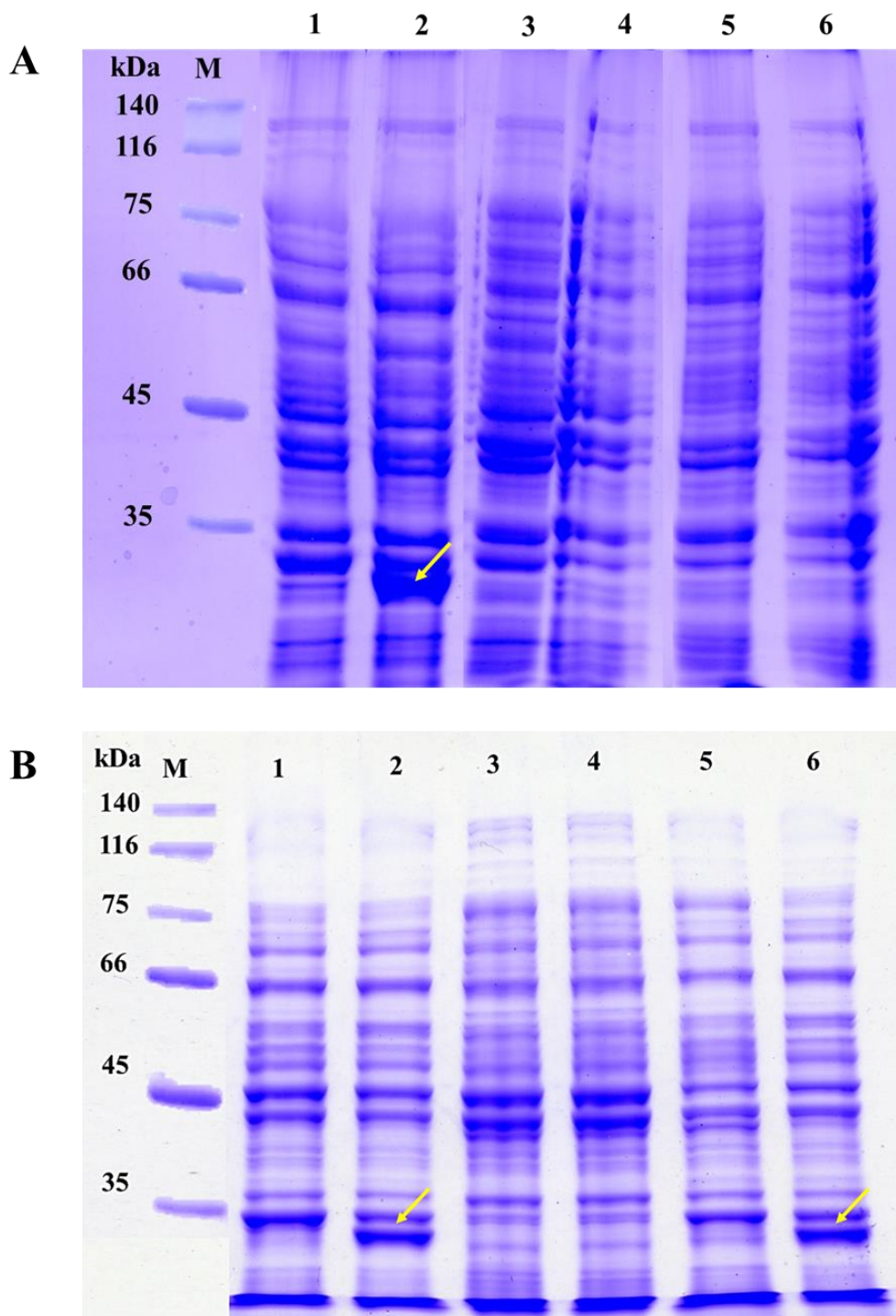
Kako bih razdvojila proteine, provela sam elektroforezu u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecil sulfata (SDS-PAGE). Nakon toga skenirala sam gelove te analizirala ekspresiju proteina Cas1 i Cas2 u bakterijskim sojevima.

Rezultati prikazani na Slici 16A prikazuju vrpce ukupnih proteina iz bakterijskih sojeva IIB1165 (genetička pozadina BW25113), IIB1414 (genetička pozadina MG1655) i IIB1404 (genetička pozadina AB1157) transformiranih „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pEB628 koji sadrži gene za proteine Cas1 i Cas2. U prvoj jažici nalazi se 2 µL markera veličina *Precision Plus Protein All Blue Standards (Bio-Rad)*, dok se u ostalih šest jažica nalaze uzorci koji su pripremljeni tako da se u svakoj jažici nalazi 4,5 µg ukupnih proteina iz prethodno spomenutih bakterijskih sojeva *E. coli*. U jažicama označenim brojevima 1, 3 i 5 nalaze se

bakterijski sojevi (redom IIB1165, IIB1414 i IIB1404) transformirani praznim plazmidom pBad-HisA. U jažicama označenim brojevima 2, 4 i 6 nalaze se bakterijski sojevi (redom IIB1165, IIB1414 i IIB1404) transformirani plazmidom pEB628 koji sadrži gene za proteine Cas1 i Cas2.

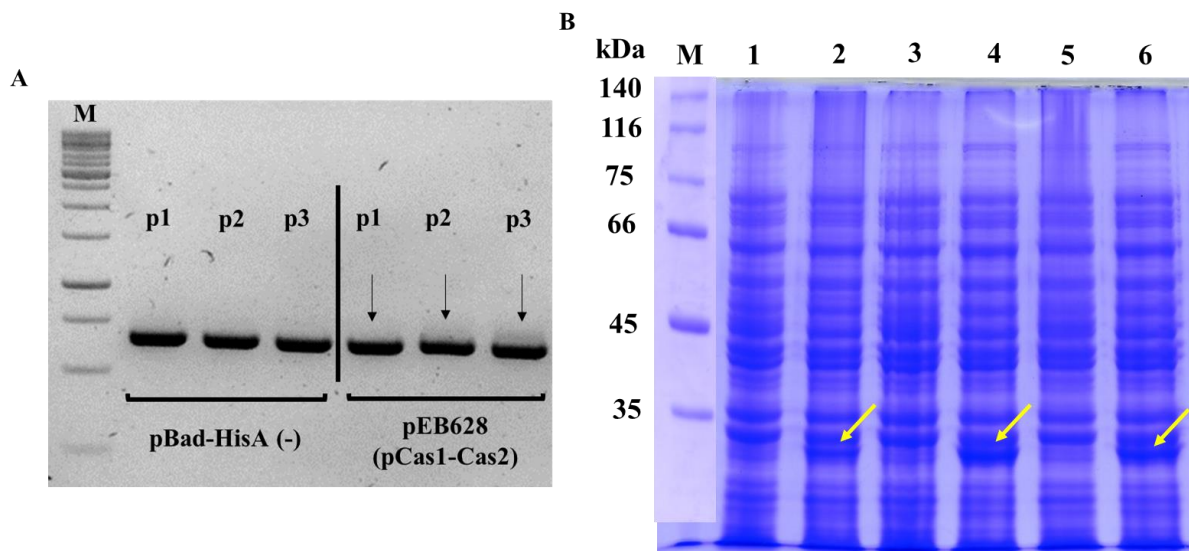
Vizualnom analizom gela nakon provedbe SDS-PAGE elektroforeze, može se uočiti da su proteini ravnomjerne koncentracije u svim ispitivanim sojevima, ali da se uočavaju određene razlike u intenzitetima pojedinih vrpca što je posljedica različitih pozadina (Slika 16A). Jača vrpca koja po veličini odgovara molekulskoj masi proteina Cas1 (33,2 kDa), može se uočiti u jažici 2 na Slici 16A što odgovara soju IIB1165 + pCas1-Cas2. Veličina kompleksa Cas1 i Cas2 očekuje se oko 72 kDa (Nuñez i sur. 2014), što odgovara veličini trimera, međutim ne uočava se u niti jednom soju.

Na isti način su analizirane vrpce ukupnih proteina iz bakterijskih sojeva IIB1410 i IIB1421 (mutanti za gen *rpoS*) i IIB1425 (mutant za gen *crl*) transformiranih „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pEB628 koji sadrži gene za proteine Cas1 i Cas2 (Slika 16B). U jažicama označenim brojevima 1, 3 i 5 nalaze se bakterijski sojevi (redom IIB1410, IIB1421 i IIB1425) transformirani „praznim“ plazmidom pBad-HisA. U jažicama označenim brojevima 2, 4 i 6 nalaze se bakterijski sojevi (redom IIB1410, IIB1421 i IIB1425) transformirani plazmidom pEB628 koji sadrži gene za proteine Cas1 i Cas2. Na Slici 16B se u jažicama 2 i 3 može uočiti jedna jača vrpca na ~33,2 kDa što odgovara molekulskoj masi proteina Cas1. Protein Cas2 je veoma malen (10, 5 kDa) te on nije vidljiv na gelu.



**Slika 16.** Analiza uzoraka ukupnih proteina bakterijskih sojeva *E. coli* SDS-PAGE elektroforezom. U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *Precision Plus Protein All Blue Standards*. U ostalih šest jažica nalaze se ukupni proteini različitih bakterijskih sojeva *E. coli*. Žutim strelicama označen je protein Cas1 (33,2 kDa) (A) – U jažicama se nalaze redom sojevi: **1** – IIB1165 + pBad-HisA, **2** – IIB1165 + pEB628, **3** – IIB1414 + pBad-HisA, **4** – IIB1414 + pEB628, **5** – IIB1404 + pBad-HisA, **6** – IIB1404 + pEB628. (B) – U jažicama se nalaze redom sojevi: **1** – IIB1410 + pBad-HisA, **2** – IIB1410 + pEB628, **3** – IIB1421 + pBad-HisA, **4** – IIB1421 + pEB628, **5** – IIB1425 + pBad-HisA, **6** – IIB1425 + pEB628.

Kako bih bolje razumjela razlog manje učinkovite ugradnje razmaknice u prvoj pasaži (Slika 17A), pratila sam količine proteina Cas1 i Cas2 u stanicama bakterijskog soja IIB1165 (u genetičkoj pozadini BW25113). Provela sam SDS-PAGE elektroforezu, metodu PCR i agaroznu elektroforezu na istim bakterijskim stanicama. Protein Cas2 vrlo je mali te nije prisutan u gelu, ali je protein Cas1 lako uočljiv i prisutan je u velikoj količini u svim pasažama, no nešto manje u prvoj pasaži unatoč dodanoj arabinozi (Slika 17B). To ukazuje da je za ugradnju razmaknica očitno potrebna velika količina proteina Cas1 i Cas2, a koja se ne može postići unutar 4 sata rasta kad se događa ugradnja.



**Slika 17.** Ekspresija proteina Cas1 i Cas2 tijekom faze adaptacije bakterijskog soja IIB1165 (*wt*) koji se nalazi u bakterijskom soju BW25113. **A** – Efikasnost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR. Produkti reakcije PCR analizirani su u 2% agaroznom gelu nakon tri pasaže (p1, p2 i p3). Bakterijski soj transformiran je plazmidom pBad-HisA (negativna kontrola) i plazmidom pEB628 (ekspirira proteine Cas1 i Cas2 s plazmida). U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *DNA Gene Ruler 1 kb DNA Ladder*. **B** – Analiza uzoraka ukupnih proteina SDS-PAGE elektroforezom. U prvoj jažici nalazi se marker veličina (M) *Precision Plus Protein All Blue Standards*, dok u idućih šest jažica: **1** – IIB1165 + pBad-HisA (p1) **2** – IIB1165 + pCas1-Cas2 (p1) **3** – IIB1165 + pBad-HisA (p2) **4** – IIB1165 + pCas1,2 (p2) **5** – IIB1165 + pBad-HisA (p3) **6** – IIB1165 + pCas1-Cas2 (p3). Žute strelice označavaju protein Cas1 (33 kDa). Protein Cas2 vrlo je malen (10,5 kDa) i nije vidljiv u gelu.

## 5. RASPRAVA

### 5.1. Naivna adaptacija

Tijekom naivne adaptacije, prve faze obrambenog imunološkog sustava CRISPR-Cas, bakterijska stanica stječe i ugrađuje novu razmaknicu u lokus CRISPR. Razmaknice su porijeklom iz virusa ili plazmida s kojim se stanica prije nije susrela. Za uspješnu ugradnju razmaknica potrebni su samo proteini Cas1 i Cas2, odnosno njihova prekomjerna ekspresija, a ostali geni *cas* nisu potrebni (Monsterd i sur. 2020). Kako bih omogućila prekomjernu ekspresiju gena *cas1* i *cas2*, bakterijske sojeve transformirala sam s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2). Kao negativnu kontrolu koristila sam bakterijske sojeve transformirane s „praznim“ plazmidom pBad-HisA. Svi bakterijski sojevi koje sam koristila imali su inaktivirane gene *cas* (genotipa:  $\Delta cas3::apra\Delta(casC-cas1)::FRT$ ) kako ne bi došlo do autoimunosti uslijed ugradnje razmaknice s kromosoma. Dodatkom 0,2%-tne otopine L-arabinoze potaknula sam ekspresiju proteina Cas1 i Cas2 s plazmida.

#### 5.1.1. Utjecaj genetičke pozadine na naivnu adaptaciju

Jedan od ciljeva ovog istraživanja bio je istražiti utječe li genetička pozadina na efikasnost adaptacije u bakteriji *E. coli*. Koristila sam različite genetičke pozadine (razlika u nekoliko gena) tri poznata bakterijska soja *E. coli* – BW25113, MG1655 i AB1157. Za sva tri soja odredila sam krivulje rasta mjereći OD<sub>600</sub>, ugradnju razmaknica metodom PCR i količine eksprimiranih proteina elektroforezom SDS-PAGE.

#### Genetička pozadina BW25113

Najprije sam istražila kakva je efikasnost adaptacije u bakterijskom soju divljeg tipa IIB1165 genetičke pozadine BW25113. Bakterijski sojevi ove genetičke pozadine imaju deletirane gene za operone *lac*, *ara* i *rha* te su idealni za genetička istraživanja u slučaju kada se trebaju inducirati geni s plazmida (Grenier i sur. 2014).

Na temelju analize krivulja rasta primijetila sam kako se brzina rasta bakterijskih stanica transformiranih s plazmidom pCas1-Cas2 usporila u usporedbi s kontrolnim vektorom pBad-HisA tijekom druge i treće pasaže (Slika 11A). Analizom lokusa CRISPR (Slika 13B) primijetila sam kako je došlo do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR samo tijekom druge i treće pasaže. Navedeni rezultati su u skladu s istraživanjem Marina Radovčića (2021) koji je u svojoj doktorskoj disertaciji također uočio istu pojavu kod soja IIB1165. On je zamijetio da dolazi do ugradnje nove razmaknice u stanicama koje su bile transformirane plazmidom pCas1-

Cas2, dok do ugradnje razmaknice nije došlo u soju s kontrolnim vektorom pBad-HisA. Također, zamijetio je kako se intenzitet ugradnje nove razmaknice pojačava s brojem pasaža te je u njegovom istraživanju intenzitet ugradnje razmaknice bio najveći u trećoj pasaži (Radovčić 2021). Slično su pokazala istraživanja Ida Yosefa (2012) koji je u bakterijskom soju IYB5101 također primijetio kako inducirana ekspresija proteina Cas1 i Cas2 u bakteriji *E. coli* rezultira stjecanjem razmaknica u lokus CRISPR (Yosef i sur. 2012). Stoga sam pretpostavila da bi razlog smanjenja brzine rasta mogla biti ugradnja razmaknice u lokus CRISPR pomoću eksprimiranih proteina Cas1 i Cas2. Kako bih to detaljnije istražila, izolirala sam ukupne proteine iz bakterija nakon tri pasaže te ih analizirala SDS-PAGE elektroforezom (Slika 16A). Protein Cas1 se mogao uočiti kao jača vrpca veličine oko 33 kDa koja nije vidljiva u soju s kontrolnim vektorom, dok je protein Cas2 premali i nije se vidio na gelu (Slika 17A i B). Protein Cas2 mogla bih vidjeti ukoliko bih koristila veću koncentraciju gela za razdvajanje prilikom SDS-PAGE elektroforeze. Povećanjem koncentracije poliakrilamidnog gela mogu se vizualizirati manji proteini, no u tom slučaju i samo trajanje elektroforeze moralo bi biti dulje kako bi se svi proteini uspješno razdvojili.

Uočila sam da je količina proteina Cas1 povećana u sve tri pasaže, a naročito je izražena u drugoj i trećoj pasaži. Manja količina proteina Cas1 u prvoj pasaži ukazivala je da možda nije dovoljna za efikasnu ugradnju. Kako bih doznala u kojoj se fazi rasta događa ugradnja razmaknice, analizirala sam ugradnju razmaknica nakon 4 sata inkubacije i nakon rasta preko noći. Uočila sam da do ugradnje razmaknice dolazi tijekom rane log faze rasta, odnosno tijekom prva 4 sata jer se tad pojavila nova vrpca na gelu sličnog intenziteta kao nakon rasta preko noći (Slika 15). Na temelju svega navedenog, zaključila sam da je smanjena količina proteina Cas1 i Cas2 u prvoj pasaži i činjenica da se ugradnja razmaknice događa u ranoj log fazi rasta vjerojatni razlog zašto se u prvoj pasaži ugradnja razmaknica ne događa.

### **Genetička pozadina MG1655**

Zatim sam istraživala efikasnost adaptacije u bakterijskom soju IIB1414 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655. Bakterijski sojevi ove genetičke pozadine imaju aktivne sve gene, uključujući i gene za arabinozni operon. To može dovesti do problema s indukcijom gena koji su pod kontrolom pBAD promotora jer će aktivni arabinozni operon dovesti do konverzije L-arabinoze u D-ksiluloza-5-fosfat koji potom ulazi u put pentoza fosfata (Gross i Englesberg 1959) i poništava indukciju.



Analizom krivulja rasta, agaroznih gelova i gelova SDS-PAGE elektroforeze uočila sam kako ovaj soj raste puno brže u odnosu na soj IIB1165 (Slika 11C), nije zamijećena ugradnja razmaknice u lokus CRISPR (Slika 13C), a također nije došlo ni do ekspresije proteina Cas1 i Cas2 (Slika 16A). Ovi rezultati ukazuju da je razlog neuspjele adaptacije vjerojatno nedostatak L-arabinoze koja se razgradila i nije inducirala dovoljne količine proteina Cas1 i Cas2.

Da bih omogućila ekspresiju proteina Cas1 i Cas2 u ovoj soju, trebala bih koristiti drugačiji induktor. Jedan česti način kako se to može postići bio bi koristiti promotore koje prepoznaje T7-RNA-polimeraza (Yosef i sur. 2012). Da bi se to napravilo, geni *cas1* i *cas2* na plazmidu trebali bi se staviti pod kontrolu T7 promotora, a u genom bi se trebao dodati gen za T7-RNA polimerazu (RNA polimeraza iz faga T7) koja bi trebala biti pod nekim induktorom, recimo promotorom od *lac* operona koji može aktivirati induktor IPTG (izopropil-1-tio- $\beta$ -D-galaktopiranozid). Ovaj induktor bi inducirao ekspresiju T7-RNA polimeraze, ne bi se razgradio jer nije supstrat za  $\beta$  galaktozidazu, i doveo bi do ekspresije proteina Cas1 i Cas2 (Chao i sur. 1995). Kako smo ovaj soj koristili kao kontrolu da bi pokazali kako adaptacija ovisi o velikoj količini proteina Cas1 i Cas2, ove pokuse nisam radila, ali César Díez-Villaseñor (2013) je pokazao da je ovakav pristup moguć i uspješan, ali i mnogi drugi (Yosef i sur. 2012).

### **Genetička pozadina AB1157**

I na kraju istraživala sam efikasnost adaptacije u bakterijskom soju IIB1404 koji se nalazi u genetičkoj pozadini AB1157. Bakterijski sojevi ove genetičke pozadine imaju jako puno mutacija koje su opisane u Tablici 1. Imaju i mutacije u genima *rpoS* i *crl*, koje nismo trebali unositi u drugom dijelu istraživanja kada samo ispitali utjecaj tih gena na efikasnost adaptacije.

Na temelju krivulje rasta (Slika 11B), agarozne gel elektroforeze (Slika 13A) i SDS-PAGE gela (Slika 16A) mogu zaključiti kako su rezultati identični kao i u slučaju bakterijskog soja IIB1414. U ovom soju nije došlo do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR vjerojatno zato jer je prisutno još puno drugih mutacija koje nisu opisane u ovoj genetičkoj pozadini te je vjerojatno jedna od tih nepoznatih mutacija utjecala na rezultat. Iako ovaj soj ima mutacije u genima *araC* i *lac*, čini se da ipak nije idealan za indukciju gena *cas1* i *cas2* s plazmida.

### **5.1.2. Utjecaj gena *rpoS* i *crl* na naivnu adaptaciju**

U drugom dijelu ovog istraživanja htjela sam vidjeti utječu li geni *rpoS* i *crl* na efikasnost adaptacije u bakteriji *E. coli*. Koristila sam dva različita soja u kojima je mutiran gen *rpoS* – IIB1410 (genetička pozadina BW25113) i IIB1421 (genetička pozadina MG1655) te soj

IIB1425 (genetička pozadina BW25113) u kojem je mutiran gen *crl*. U genetičkoj pozadini AB1157 već postoji mutacija gena *rpoS* i *crl* stoga ih nisam morala uvoditi u toj genetičkoj pozadini (htjela sam provjeriti jesu li odgovorni za neefikasnu adaptaciju).

Na temelju agarozne gel elektroforeze i analize SDS-PAGE gela primijetila sam kako u slučaju bakterijskih sojeva IIB1410 (mutant za gen *rpoS*) i IIB1425 (mutant za gen *crl*) dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR (Slika 13A i C) te da je došlo do povećane ekspresije proteina Cas1 i Cas2 (Slika 16B). Na temelju njihovih krivulja rasta (Slika 12A i C) primijetila sam kako se brzina rasta bakterijskih stanica s plazmidom pCas1-Cas2 usporila, vjerojatno upravo zbog ugradnje razmaknice u lokus CRISPR. Na temelju toga mogu zaključiti kako ti geni ne utječu na efikasnost naivne adaptacije u bakteriji *E. coli* zato jer su isti rezultati dobiveni i u soju IIB1165 (Slika 11A, 13B i 16A) u kojem ti geni nisu mutirani. Jedino je neobično koliko je mutacija *rpoS* smanjila brzinu rasta stanica iako nije utjecala na ugradnju razmaknica (Slika 12). Brzina se smanjila i u soju s kontrolnim vektorom što ukazuje da postoji problem u rastu *rpoS* stanica transformiranih s plazmidom. Općenito sam primijetila da je ovog mutanta bilo teže transformirati, što je također primijećeno u istraživanju Zhang i sur. (2012).

Na kraju, analizirala sam bakterijski soj IIB1421 (genetička pozadina MG1655) koji u sebi nosi mutaciju za gen *rpoS*. Na temelju agarozne gel elektroforeze i analize SDS-PAGE gela zamijetila sam kako nije došlo do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR (Slika 14B) te isto tako nije došlo ni do ekspresije proteina Cas1 i Cas2 (Slika 16B). Primijetila sam kako nije došlo ni do usporavanja rasta (Slika 12B), što je i očekivano s obzirom da u ovom soju ne dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR (Slika 14B). Ovi rezultati suprotni su od rezultata dobivenih za soj IIB1410 (Slika 14A i 16B) u kojem je također gen *rpoS* bio mutiran. No taj rezultat nije neobičan, jer ni u soju IIB1414 u kojem je gen *rpoS* bio aktivan nije došlo do ugradnje razmaknice (Slika 13C) kao ni do ekspresije proteina Cas1 i Cas2 (Slika 16A). Stoga mogu zaključiti kako je genetička pozadina MG1655 imala utjecaj na rezultat te se utjecaj mutacije *rpoS* nije mogao istražiti.

Do sad nisu provedena istraživanja u kojima bi se ispitivao učinak gena *rpoS* i *crl* na stvaranje imunosti sustavom CRISPR-Cas. RpoS je alternativni sigma faktor koji prepoznaje promotore određenih gena, što kod bakterije *E. coli* iznosi čak oko 10% svih gena. Za gen *rpoS* pokazano je da sudjeluje u odgovoru stanice na stres (toplina, pH, UV zračenje, oksidativni stres, gladovanje), gene koje regulira pomažu stanici adaptaciju na ulazak u stacionarnu fazu rasta, a smatra se da ima veliku ulogu na fiziologiju stanica i tijekom eksponencijalnog rasta

(Dong i sur. 2008). Kako je protein RpoS uključen u mnoge stanične procese i regulira veliki broj gena, u slučaju da gen *rpoS* utječe na adaptaciju tada bi istraživanja trebalo proširiti i na gene koje on regulira te provjeriti njihovu ulogu. To bi bilo jako zahtjevno, kompleksno i dugotrajno istraživanje. Iako mutacija *rpoS* nije utjecala na ugradnju razmaknica, svakako je utjecala na rast stanica što ukazuje na moguću interakciju s genima sustava CRISPR-Cas na razini fiziologije stanice. U istraživanju nisam mijenjala pH, izlagala stanice oksidativnom stresu ili izgladnjivala, ali postoji mogućnost da bi u takvim uvjetima protein RpoS imao učinak na stvaranje imunosti sustavom CRISPR koji bi bilo zanimljivo istražiti u budućnosti.

## 6. ZAKLJUČAK

Na temelju analize dobivenih rezultata i usporedbe s literaturnim podacima došla sam do sljedećih zaključaka:

- Bakterijski sojevi koji su brzo rasli nisu ekspimirali proteine Cas1 i Cas2. Oni koji jesu, rasli su sporije što je posljedica ugradnje razmaknice u lokus CRISPR.
- Ugradnja razmaknica u lokus CRISPR događa se u ranoj log fazi, unutar 4 sata rasta od presađivanja u svježi tekući medij.
- Usporeni rast stanica i ugradnja razmaknica uočena je samo u genetičkoj pozadini BW25113.
- U genetičkoj pozadini AB1157 ne dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR jer je to soj s puno mutacija od kojih jedna (ili više) inhibiraju ugradnju.
- U genetičkoj pozadini MG1165 ne dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR jer su u tom soju aktivni svi inducibilni operoni koji ometaju indukciju gena s plazmida.
- Geni *rpoS* i *crl* nemaju ulogu u izgradnji CRISPR imunosti procesom naivne adaptacije.

## 7. LITERATURA

1. Babu M., Beloglazova N., Flick R., Graham C., Skarina T., Nocek B., Gagarinova A., Pogoutse O., Brown G., Binkowski, Phanse S., Joachimiak A., Koonin E., Savchenko A., Emili A., Greenblatt J., Edwards A., Yakunin A. (2011): A dual function of the CRISPR-Cas system in bacterial antiviral immunity and DNA repair. *Mol Microbiol.* **79**, 484 – 502
2. Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science.* **315**, 1709 – 1712
3. Bhaya D., Davison M., Barrangou R. (2011): CRISPR-Cas system sin bacteria and archaeae: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annu Rev. Genet.* **45**, 273 – 297
4. Bolotin A., Quinquis B., Sorokin A., Ehrlich S.D. (2005): Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology.* **151**, 2551 – 2561
5. Brouns S.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J., Snijders A.P., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E.V., van der Oost J. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science.* **321**, 960 – 964
6. Cavaliere P., Norel F. (2016): Recent advances in the characterization of Crl, the unconventional activator of the stress sigma factor  $\sigma^S$ /RpoS. *Biomol Concepts.* **7**, 197 – 204
7. Chao M. Y., Kan M. C., Lin-Chao S. (1995): RNAII transcribed by IPTG-induces 7z RNA polymerase in non-functional as a replication primer for ColE1-type plasmids in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res.* **23**, 1691 – 1695
8. Cong L., Ran F. A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P. D., Wu X., Jiang W., Marraffini L. A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science.* **339**, 819 – 823
9. CRISPR baza podataka (2017) <http://crispr.i2bc.paris-saclay.fr> (pristupljeno: 13. 8. 2022.)
10. Datsenko K.A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B.L., Severinov K., Semenova E. (2012): Molekular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat Commun.* **3**, 945 – 947
11. Deveau H., Barrangou R., Garneau J. E., Lebonté J., Fremaux C., Boyaval P., Romero D. A., Horvath P., Moineau S. (2008): Phage response to CRISPR-encoded resistance in *Streptococcus thermophilus*. *J. Bacteriol.* **190**, 1390 – 1400

12. Díez-Villaseñor C., Guzmán N. M., Almendros C., García-Martínez J., Mojica F. J. (2013): CRISPR-spacer integration reporter plasmids reveal distinct genuine acquisition specificities among CRISPR-Cas I-E variants of *Escherichia coli*. *RNA Biol.* **10**, 792 – 802
13. Dillingham M.S., Kowalczykowski S.C. (2008): RecBCD enzyme and the repair of double-stranded DNA breaks. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 642 – 671
14. Dong T., Kirchhof M. G., Schellhorn H. E. (2008): RpoS regulation of gene expression during exponential growth of *Escherichia coli* K12. *Mol. Genet. Genomics* **279**, 267 - 277
15. Dong T., Schellhorn H. E. (2010): Role of RpoS in virulence of pathogens. *Infect Immun.* **78**, 887 – 897
16. Duraković S. (1991): Prehrambena mikrobiologija, 1. izdanje, Medicinska naklada, Zagreb
17. Englesberg E., Irr J., Power J., Lee N. (1965): Positive control of enzyme synthesis by gene C in the L-arabinose system. *J Bacteriol.* **90**, 946 – 957
18. Fagerlund R.D., Wilkinson M.E., Klykov O., Barendregt A., Pearce F.G., Kieper S.N., Maxwell H.W.R., Capolupo A., Heck A.J.R., Krause K.L., Bostina M., Scheltema R.A., Staals R.H.J., Fineran P.C. (2017): Spacer capture and integration by a type I-F Cas1-Cas2-3 CRISPR adaptation complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **114**, 5122 – 5128
19. Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2579 – 2586
20. Grenier F., Matteau D., Baby V., Rodrigue S. (2014): Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* BW25113. *Genome Announc.* 2: e01038-14
21. Gross J., Englesberg E. (1959): Determination of the order of mutational sites governing L-arabinose utilization in *Escherichia coli* B/r by transduction with phage Plbt. *Virology.* **9**, 314 – 331
22. Haft D. H., Selengut J., Mongodin E. F., Nelson K. E. (2005): A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes. *PLoS Comput. Biol.* 1:e60
23. Ishino Y., Krupovic M., Forterre P. (2018): History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious Repeated Sequence to Genome Editing Technology. *J. Bacteriol.* **200**, e00580-17
24. Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J. Bacteriol.* **169**, 5429 – 5433

25. Ivančić-Baće I., Cass S. D., Wearne S. J., Bolt E. L. (2015): Different genome stability proteins underpin primed and naïve adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity. *Nucleic Acids Res.* **43**, 10821 – 10830
26. Jansen R., Embden J.D., Gaastra W., Schouls L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. *Mol. Microbiol.* **43**, 1565 – 1575
27. Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science.* **337**, 816 – 821
28. Jore M.M., Lundgren M., van Duijn E., Bultema J.B., Westra E.R., Waghmare S.P., Wiedenheft B., Pul U., Wurm R., Wagner R., Beijer M.R., Barendregt A., Zhou K., Snijders A.P., Dickman M.J., Doudna J.A., Boekema E.J., Heck A.J., van der Oost J., Brouns S.J. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. *Nat. Struct Mol. Biol.*, **18**, 529 – 536
29. Koonin E. V., Makarova K. S. (2013): CRISPR-Cas: evolution of an RNA-based adaptive immunity system in prokaryotes. *RNA Biol.* **10**, 679 – 686
30. Koonin E.V., Makarova K.S. (2019): Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* **374**, 20180087
31. Lau C. H., Reeves R., Bolt E. L. (2019): Adaptation processes that build CRISPR immunity: creative destruction, updated. *Essays Biochem.* **63**, 227 – 235
32. Lee H., Sashital D. G. (2022): Creating memories: molecular mechanisms of CRISPR adaptation. *Trends Biochem Sci.* **47**, 464 – 476
33. Levy A., Goren M. G., Yosef I., Auster O., Manor M., Amitati G., Edgar R., Qimron U., Sorek R. (2015): CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature.* **520**, 505 – 510
34. Long C., Dai L., E C., Da L. T., Yu J. (2021): Allosteric regulation in CRISPR/Cas1-Cas2 protospacer acquisition mediated by DNA and Cas2. *Biophys J.* **120**, 3126 – 3137
35. Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computation analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biol. Direct* **1**, 7
36. Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., van der Oost J, Backofen R, Koonin

- E.V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 722 – 736
37. Mohanraju P., Saha C., van Baarlen P., Louwen R., Staals R. H. J., van der Oost J. (2022): Alternative functions of CRISPR-Cas system in the evolutionary arms race. *Nat Rev. Microbiol.* **20**, 351 – 364
38. Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., Garcia-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology.* **155**, 733 – 740
39. Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., Garcia-Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J. Mol. Evol.* **60**, 174 – 182
40. Mojica F. J., Díez-Villaseñor C., Soria E., Juez G. (2000): Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria. *Mol Microbiol.* **36**, 244 – 246
41. Mojica F.J., Juez G., Rodriguez-Valera F. (1993): Transcription at different salinities of *Haloferax mediterranei* sequences adjacent to partially modified PstI sites. *Mol. Microbiol.* **9**, 613 – 621
42. Mojica F. J., Montoliu L. (2016): On the Origin of CRISPR-Cas Technology: From Prokaryotes to Mammals. *Trends Microbiol.* **24**, 811 – 820
43. Molecular devices (2017): Measure long-term cell growth using a discontinuous kinetic reading. <https://www.moleculardevices.com> (pristupljeno: 25. 9. 2022.)
44. Mosterd C., Rousseau G. M., Moineau S. (2020): A short overview of the CRISPR-Cas adaptation stage. *Can. J. Microbiol.* **67**, 1 – 12
45. Mrežni udžbenik iz genetike (2022): <https://www.genetika.biol.pmf.hr/> (pristupljeno: 25.9.2022.)
46. Nuñez J. K., Bai L., Harrington L. B., Hinder T. L., Doudna J. A. (2016): CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Mol. Cell* **62**, 824 – 833
47. Nuñez J. K., Harrington L. B., Kranzusch P. J., Engelman A. N., Doudna J. A. (2015): Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* **527**, 535 – 538
48. Nuñez J. K., Kranzusch P. J., Noeske J., Wright A. V., Davies C. W., Doudna J. A. (2014): Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 528 – 534
49. Nuñez J. K., Lee A. S., Engelman A., Doudna J. A. (2015): Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* **519**, 193 – 198



50. Pećina-Šlaus N., Nikuševa-Martić T., Radić K., Bulić-Jakuš F. (2003): OPERON regulacija genske ekspresije u prokariota. *MEDICINAR*
51. Pougach K., Semenova E., Bogdanova E., Datsenko K. A., Djordjevic M., Wanner B. L., Severinov K. (2010): Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **77**, 1367 – 1379
52. Pourcel C., Salvignol G., Vergnaud G. (2005): CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading)*. **151**, 653 – 663
53. Pratt L. A., Silhavy T. J. (1998): Crl stimulates RpoS activity during stationary phase. *Mol. Microbiol.* **29**, 1225 – 1236
54. Provence D. L., Curtiss R 3rd. (1992): Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli*: a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or Curli production. *Infect Immun.* **60**, 4460 – 4467
55. Pul U., Wurm R., Arslan Z., Geisser R., Hofmann N., Wagner R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-Cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* **75**, 1495 – 1512
56. Radovčić M. (2021): Uloga enzima RecBCD i drugih nukleaza u CRISPR-Cas naivnoj adaptaciji u bakteriji *E. coli*. Doktorska disertacija. Biološki odsjek. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
57. Radovčić M., Killealea T., Savitskaya E., Wettstein L., Bolt E. L., Ivančić-Baće I. (2018): CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Res.* **46**, 10173 – 10183
58. Ramachandran A., Summerville L., Learn B. A., DeBell L., Bailey S. (2020): Processing and integration of functionally oriented pre-spacers in the *Escherichia coli* CRISPR system depends on bacterial host exonucleases. *J. Biol. Chem.* **295**, 3403 – 3414
59. Rolfe M. D., Rice C. J., Lucchini S., Pin C., Thompson A., Cameron A. D., Alston M., Stringer M. F., Betts R. P., Baranyi J., Peck M. W., Hinton J. C. (2012): Lag phase is a distinct growth phase that prepares bacteria for exponential growth and involves transient metal accumulation. *J. Bacteriol.* **194**, 686 – 701
60. Sashital D. G., Wiedenheft B., Doudna J. A. (2012): Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Mol Cell.* **46**, 606 – 615
61. Schellhorn H. E. (2020): Function, Evolution, and Composition of the RpoS Regulon in *Escherichia coli*. *Front Microbiol.* **11**:560099

62. She Q., Singh R. K., Confalonieri F., Zivanovic Y., Allard G., Awayez M. J., Chan-Weiher C. C., Clausen I. G., Curtis B. A., De Moors A., Erauso G., Fletcher C., Gordon P. M., Heikamp-de Jong I., Jeffries A. C., Kozera C. J., Medina N., Peng X., Thi-Ngoc H. P., Redder P., Schenk M. E., Theriault C., Tolstrup N., Charlebois R. L., Doolittle W. F., Duguet M., Gaasterland T., Garrett R. A., Ragan M. A., Sensen C. W., Van der Oost J. (2001): The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc. Natl Acad Sci U. S. A.* **98**, 7835 – 7840
63. Shimizu K. (2014): Regulation Systems of Bacteria such as *Escherichia coli* in Response to Nutrient Limitation and Environmental Stresses. *Metabolites.* **4**, 1 – 35
64. Shmakov S., Smargon A., Scott D., Cox D., Pyzocha N., Yan W., Abudayyeh O. O., Gootenberg J. S., Makarova K. S., Wolf Y. I., Severinov K., Zhang F., Koonin E. V. (2017): Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **15**, 169 – 182
65. Sternberg S. H., Redding S., Jinek M., Greene E. C., Doudna J. A. (2014): DNA interrogation by the CRISPR RNA-guided endonuclease Cas9. *Nature.* **507**, 62 – 67
66. Taylor D. W., Zhu Y., Staals R. H., Kornfeld J. E., Shinkai A., van der Oost J., Nogales E., Doudna J. A. (2015): Structural biology. Structures of the CRISPR-Cmr complex reveal mode of RNA target positioning. *Science.* **348**, 581 – 58
67. Typas A., Barembuch C., Possling A., Hengge R. (2007): Stationary phase reorganisation of the *Escherichia coli* transcription machinery by Crl protein, a fine-tuner of sigmas activity and levels. *EMBO. J.* **26**, 1569 – 1578
68. Wang J., Li J., Zhao H., Sheng G., Wang M., Yin M., Wang Y. (2015): Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell.* **163**, 840 – 853
69. Wiedenheft B., van Duijn E., Bultema J. B., Waghmare S. P., Zhou K., Barendregt A., Westphal W., Heck A. J., Boekema E. J., Dickman M. J., Doudna J. A. (2011): RNA-guided complex from a bacterial immune system enhances target recognition through seed sequence interactions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10092 – 10097
70. Wright A. V., Liu J. J., Knott G. J., Doxzen K. W., Nogales E., Doudna J. A. (2017): Structures of the CRISPR genome integration complex. *Science.* **357**, 1113 – 1118
71. Xiao Y., Ng S., Nam K. H., Ke A. (2017): How type II CRISPR-Cas establish immunity through Cas1-Cas2-mediated spacer integration. *Nature.* **550**, 137 – 141
72. Xue C., Sashital D. G. (2019): Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus* **8**, 100 – 106

73. Yosef I., Goren M. G., Kiro R., Edgar R., Qimron U. (2011): High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 20136 – 20141
74. Yosef I., Goren M. G., Qimron U. (2012): Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic. Acids. Res.* **40**, 5569 – 5576
75. Zhang Y., Shi C., Yu J., Ren J., Sun D. (2012): RpoS regulates a novel type of plasmid DNA transfer in *Escherichia coli*. *PLoS One.* **7**:e33514

## 8. ŽIVOTOPIS

Rođena sam 28. svibnja 1998. godine u Čakovcu. Završila sam **Osnovnu školu Štrigova** 2013. godine, a te iste godine upisala **opću gimnaziju** u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec. Srednju školu završila sam 2017. godine te sam nakon toga, te iste godine, upisala **Integrirani preddiplomski i diplomski studij Biologije i kemije – smjer nastavnički** na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom zadnje godine studija odradila sam metodičku praksu iz biologije u **V. gimnaziji** i metodičku praksu iz kemije u **Osnovnoj školi Rudeš**. Nakon odrađenih praksi stekla sam puno novog i životnog iskustva, stekla socijalne vještine i iskusila kako je to raditi s učenicima. Diplomski rad radila sam na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće i mag. biol. mol. Damjana Mitića na temu „Utjecaj brzine rasta na efikasnost adaptacije sustavom CRISPR-Cas u bakterija *Escherichia coli* različitih genetičkih pozadina“.

U sklopu provedbe projekta *Mobilni ZEZ centar Udruge Profesor Baltazar* iz Zagreba prošla sam edukaciju na Institutu Ruđer Bošković pod nazivom „Kako provoditi radionice popularizacije znanosti“. U sklopu tog istog projekta volontirala sam kao edukator u osnovnim školama diljem Republike Hrvatske. Moje volontiranje sastojalo se od pripreme materijala i lokacije na kojoj sam provodila radionice te provedba samih radionica iz područja kemije i biologije. Volontirala sam i na projektu *STEM edukatori Instituta za popularizaciju znanosti* kao volonter edukator u sklopu čega sam također posjećivala osnovne škole i pokušala učenike zainteresirati za STEM područje. U sklopu fakulteta priključila sam se studentskoj sekciji Hrvatskog kemijskog društva – **Znanstvene čarolije**. One su mi omogućile da djelić svog kemijskog znanja prenesem najmlađima te ih potaknem da zavole kemiju od malih nogu. Posjetila sam brojne vrtiće i škole u Zagrebu te djeci kroz jednostavne kemijske pokuse prenosila brojna kemijska znanja. Također, sudjelovala sam u izvedbi popularno-znanstvene manifestacije *Otvoreni dan Kemije* (koji je dio cjelodnevnog događanja *Dan i noć na PMF-u*) gdje smo na zanimljiv način prezentirali učenicima srednjih škola sve sadržaje koje fakultet nudi te ih pokušali što više zainteresirati da postanu budući studenti PMF-a. Sudjelovala sam u projektu **Geoekološka studija Parka Maksimir i Značajnog krajobraza Savica** u kojem sam anketirala ljude na području Parka Maksimir te na taj način razvijala svoje vještine komuniciranja, a naučila i ponešto o ekosustavu. Također bila sam i dio projekta u sklopu fakulteta – **Sustav mentorstva**, u kojem sam imala ulogu mentorice – pomagala sam studentima nižih godina da se što lakše snađu na fakultetu, predavanjima, s profesorima,

literaturom i ostalim aspektima studiranja. U lipnju 2022. godine sudjelovala sam u **regionalnom ljetnom kampu** u Ivanovim Koritima (Crna Gora) u sklopu Horizont 2020 projekta *TeRRIFICA*. Ljetni kamp bavio se temom klimatskih promjena, a naš zadatak bio je osmisliti klimatski svjestan grad 2030. godine. U listopadu 2022. godine sudjelovala sam kao pasivni sudionik na **7. Simpoziju studenata kemičara**.

## 9. PRILOZI

Ovaj rad sastoji se od 6 priloga. Svaki od priloga sadrži tablicu i grafički prikaz srednjih vrijednosti optičke gustoće jednog od šest različitih bakterijskih sojeva *E. coli* koji se nalazi u jednoj od tri različite genetičke pozadine (BW25113, MG1655 i AB1157).

Popis priloga:

Prilog 1. Soj IIB1404 (genetička pozadina AB1157).

Prilog 2. Soj IIB1165 (genetička pozadina BW25113).

Prilog 3. Soj IIB1410 (genetička pozadina BW25113).

Prilog 4. Soj IIB1425 (genetička pozadina BW25113).

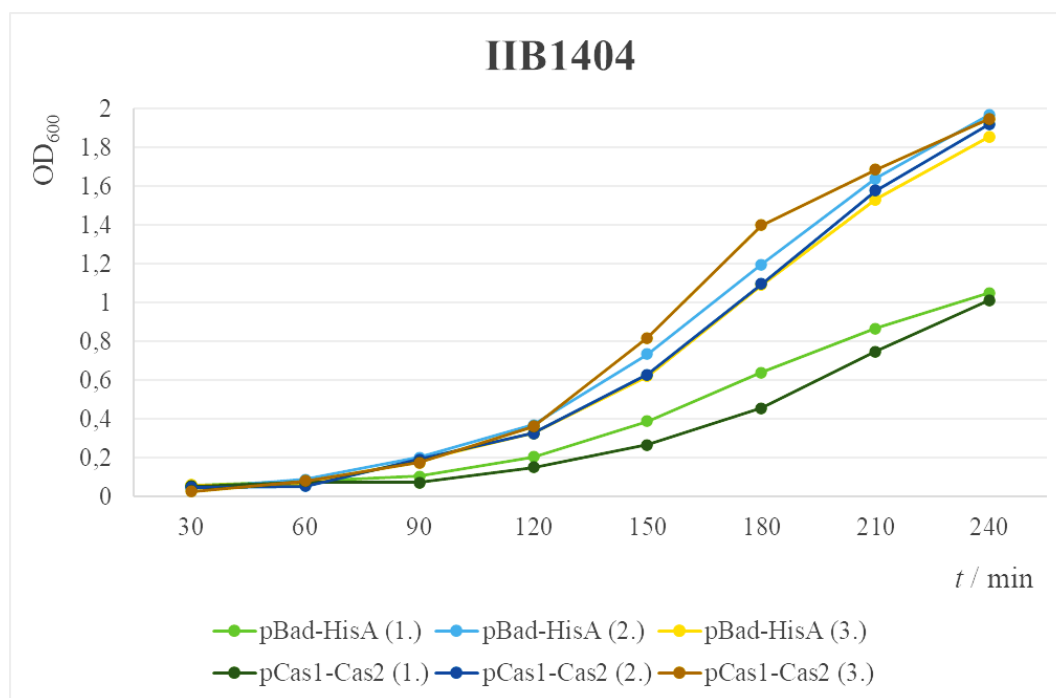
Prilog 5. Soj IIB1414 (genetička pozadina MG1655).

Prilog 6. Soj IIB1421 (genetička pozadina MG1655).

## Prilog 1.

**Tablica P1.** Srednje vrijednosti (za četiri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1404 koji se nalazi u genetičkoj pozadini AB1157. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u tri uzastopne pasaže (1., 2., 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2).

IIB1404						
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(1.)	(1.)	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0,06	0,055	0,045	0,05	0,06	0,0275
60	0,08	0,075	0,09	0,055	0,065	0,0825
90	0,105	0,075	0,2025	0,1925	0,1875	0,1775
120	0,205	0,1525	0,37	0,3275	0,3275	0,3625
150	0,39	0,2675	0,735	0,63	0,623333	0,82
180	0,64	0,4575	1,1975	1,0975	1,093333	1,4
210	0,8675	0,75	1,64	1,5775	1,5325	1,685
240	1,0525	1,015	1,97	1,92	1,8575	1,9475

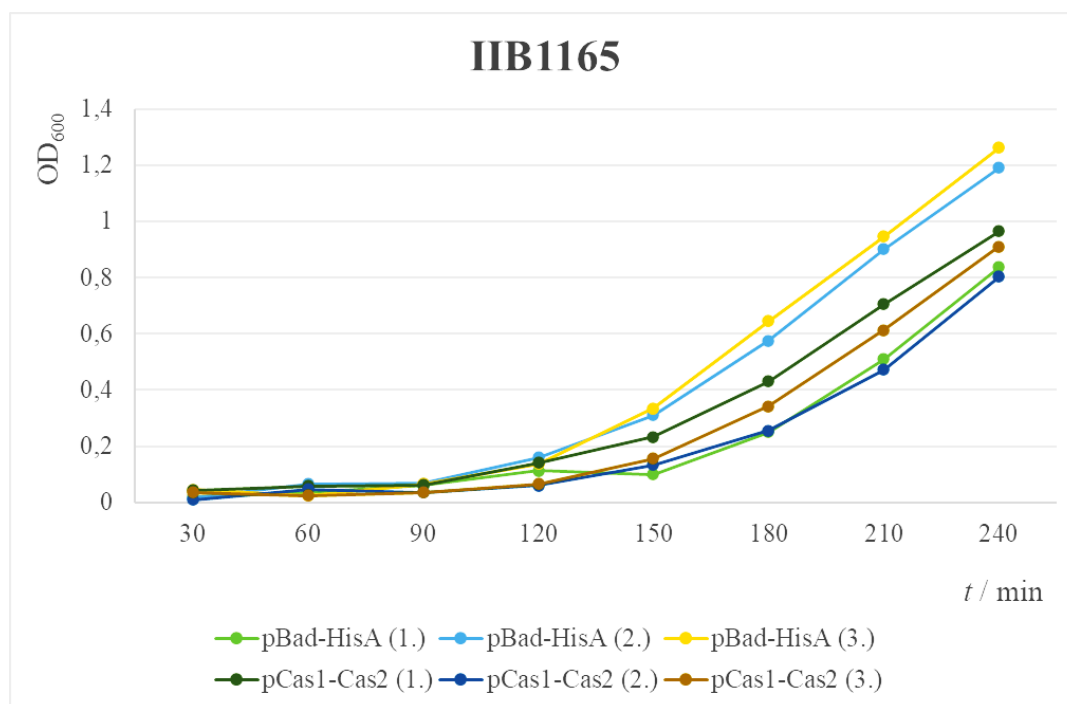


**Slika P1.** Srednje vrijednosti optičke gustoće soja IIB1404 koji se nalazi u genetičkoj pozadini AB1157 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.

## Prilog 2.

**Tablica P2.** Srednje vrijednosti (za četiri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1165 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u tri uzastopne pasaže (1., 2., 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2).

IIB1165						
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(1.)	(1.)	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0,02	0,0425	0,015	0,01	0,045	0,035
60	0,035	0,0575	0,065	0,0475	0,025	0,025
90	0,06	0,0625	0,0675	0,035	0,065	0,035
120	0,1125	0,14	0,16	0,06	0,1375	0,065
150	0,1	0,233333	0,31	0,1325	0,335	0,155
180	0,25	0,43	0,575	0,255	0,645	0,3425
210	0,51	0,705	0,9	0,4725	0,945	0,6125
240	0,8375	0,965	1,19	0,8025	1,2625	0,91



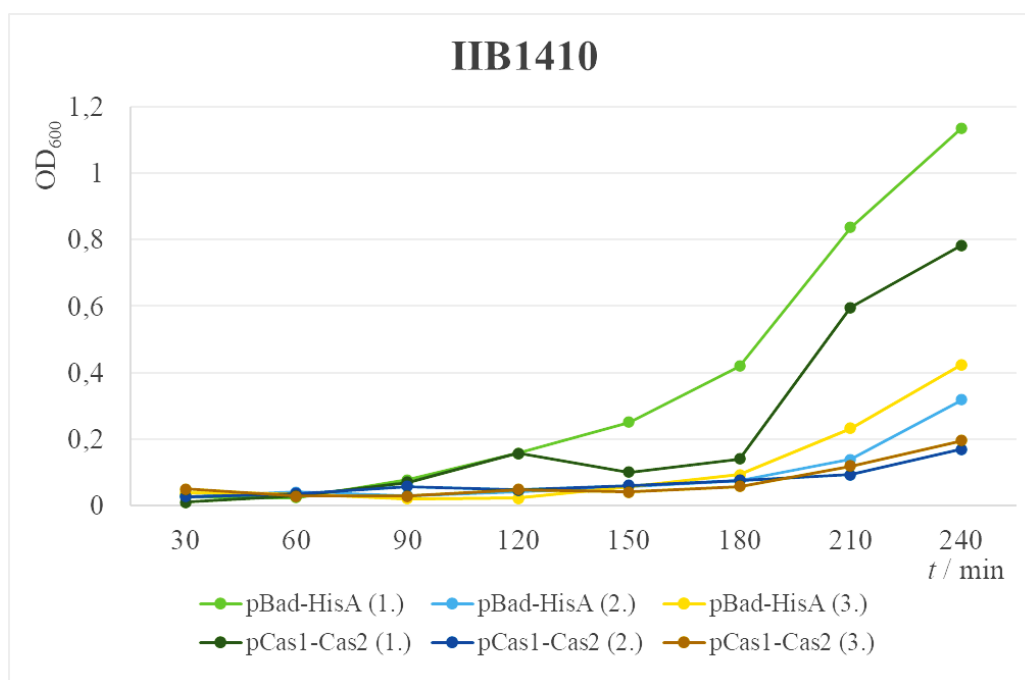
**Slika P2.** Srednje vrijednosti optičke gustoće soja IIB1165 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.



### Prilog 3.

**Tablica P3.** Srednje vrijednosti (za pet mjerenja) optičke gustoće soja IIB1410 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u tri uzastopne pasaže (1., 2., 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2).

IIB1410						
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(1.)	(1.)	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0,026667	0,01	0,026	0,026	0,038	0,05
60	0,023333	0,03	0,04	0,036	0,034	0,028
90	0,076667	0,07	0,03	0,058	0,02	0,028
120	0,156667	0,156667	0,042	0,046	0,022	0,048
150	0,25	0,1	0,058	0,06	0,058	0,04
180	0,42	0,14	0,076	0,076	0,092	0,058
210	0,836667	0,596667	0,138	0,092	0,232	0,118
240	1,136667	0,783333	0,318	0,17	0,424	0,196

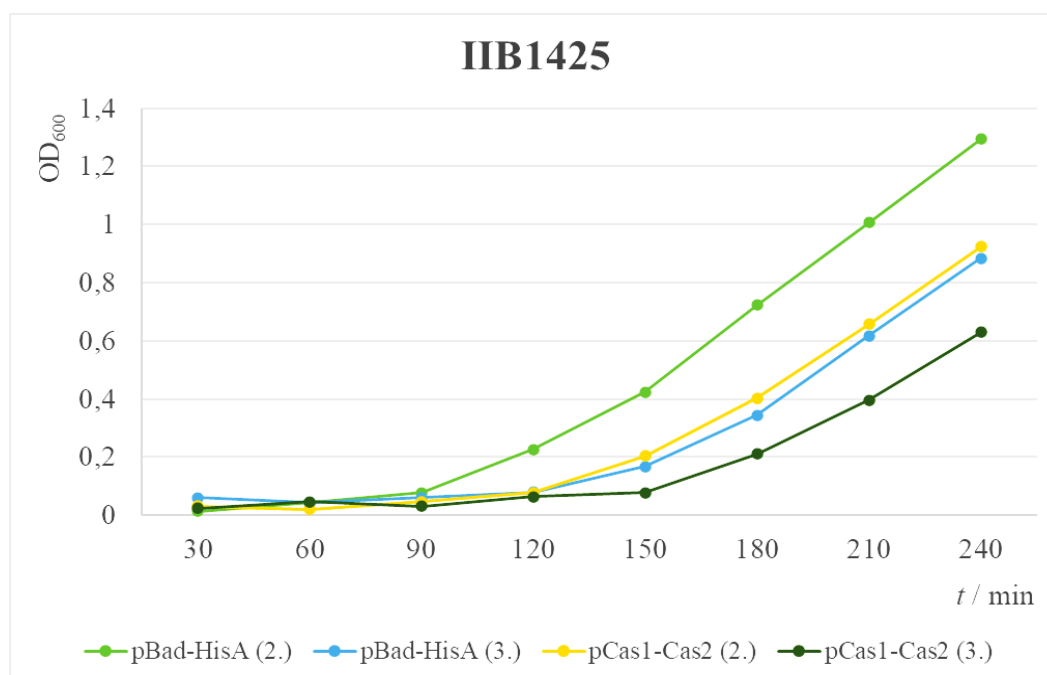


**Slika P3.** Srednje vrijednosti optičke gustoće soja IIB1410 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.

## Prilog 4.

**Tablica P4.** Srednje vrijednosti (za tri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1425 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u dvije uzastopne pasaže (2. i 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2). Za ovaj bakterijski soj mjerila sam samo drugu i treću pasažu zato jer sam primijetila da je prva jako varirala i zbog toga sam ju prestala mjeriti.

IIB1425				
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0,013333	0,03	0,06	0,023333
60	0,043333	0,02	0,043333	0,046667
90	0,076667	0,046667	0,06	0,03
120	0,226667	0,076667	0,08	0,063333
150	0,423333	0,203333	0,166667	0,076667
180	0,723333	0,403333	0,343333	0,21
210	1,006667	0,656667	0,616667	0,396667
240	1,293333	0,923333	0,883333	0,63

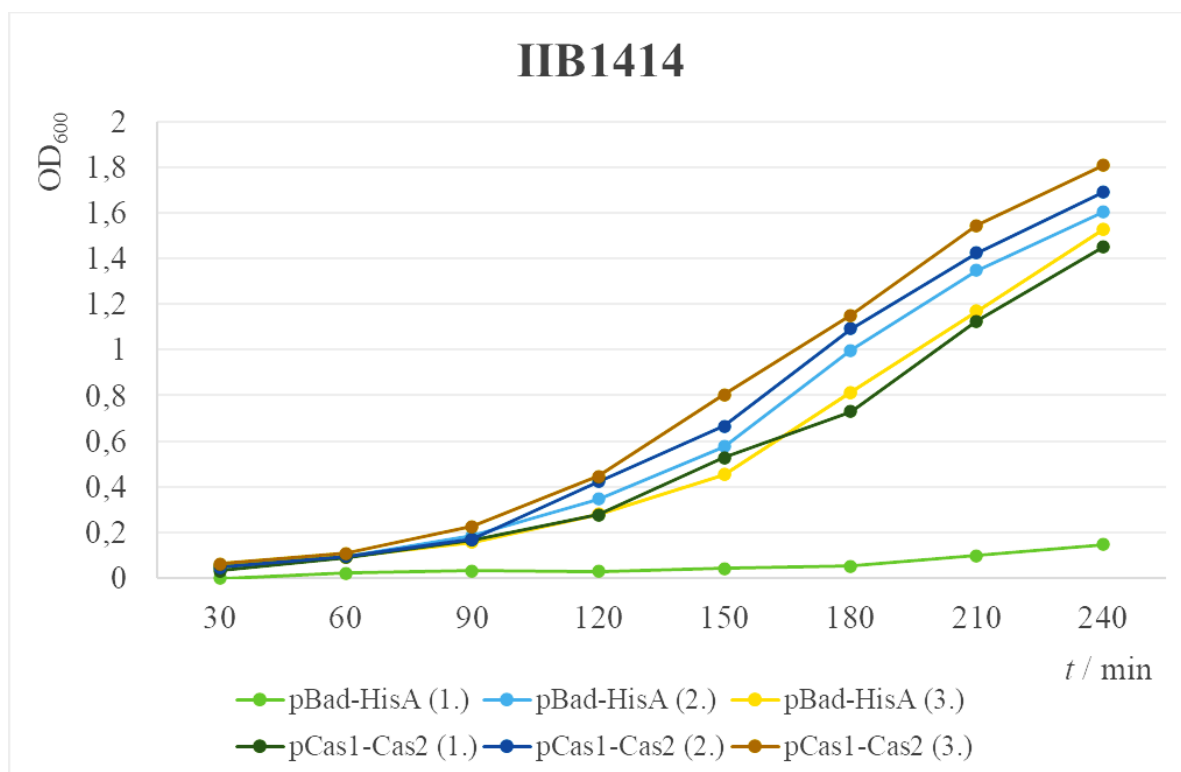


**Slika P4.** Srednje vrijednosti optičke gustoće soja IIB1425 koji se nalazi u genetičkoj pozadini BW25113 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.

## Prilog 5.

**Tablica P5.** Srednje vrijednosti (za tri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1414 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u tri uzastopne pasaže (1., 2., 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2).

IIB1414						
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(1.)	(1.)	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0	0,033333	0,056667	0,046667	0,046667	0,063333
60	0,023333	0,09	0,093333	0,096667	0,093333	0,11
90	0,033333	0,166667	0,186667	0,17	0,156667	0,226667
120	0,03	0,276667	0,346667	0,423333	0,28	0,446667
150	0,043333	0,526667	0,576667	0,666667	0,453333	0,803333
180	0,053333	0,73	0,996667	1,093333	0,813333	1,15
210	0,1	1,126667	1,346667	1,423333	1,17	1,543333
240	0,146667	1,45	1,603333	1,69	1,526667	1,806667

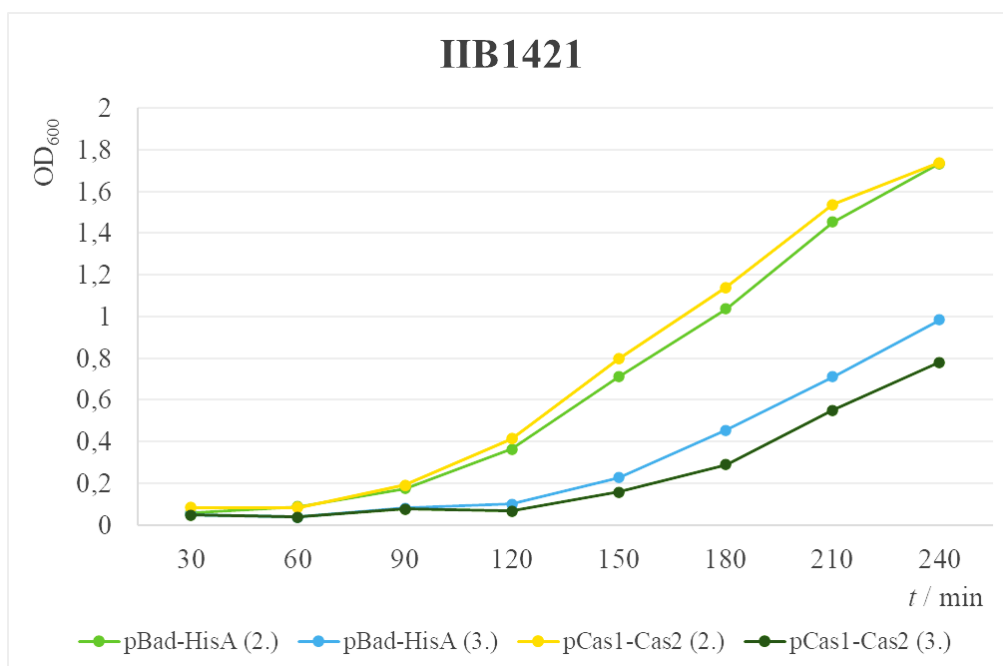


**Slika P5.** Srednje vrijednosti optičke gustoće soja IIB1414 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.

## Prilog 6.

**Tablica P6.** Srednje vrijednosti (za tri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1421 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655. Izmjerene su vrijednosti optičke gustoće ( $OD_{600}$ ) kroz 240 minuta u dvije uzastopne pasaže (2. i 3.). U jedan soj dodan je plazmid pBad-HisA, a u drugi plazmid pEB628 (pCas1-Cas2). Za ovaj bakterijski soj mjerila sam samo drugu i treću pasažu zato jer sam primijetila da je prva jako varirala i zbog toga sam ju prestala mjeriti.

IIB1421				
$OD_{600}$	pBad-HisA	pEB628	pBad-HisA	pEB628
$t / \text{min}$	(2.)	(2.)	(3.)	(3.)
30	0,06	0,083333	0,05	0,046667
60	0,086667	0,083333	0,036667	0,036667
90	0,173333	0,19	0,08	0,076667
120	0,363333	0,413333	0,1	0,066667
150	0,71	0,796667	0,226667	0,156667
180	1,036667	1,14	0,453333	0,29
210	1,453333	1,536667	0,71	0,55
240	1,733333	1,736667	0,983333	0,78



**Slika P6.** Srednje vrijednosti (za tri mjerenja) optičke gustoće soja IIB1421 koji se nalazi u genetičkoj pozadini MG1655 transformiran „praznim“ plazmidom pBad-HisA i plazmidom pCas1-Cas2.