

Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δ hns i Δ htpG bakterije Escherichia coli u različitim uvjetima rasta

Macuka, Marin

Master's thesis / Diplomski rad

2019

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:217:845868>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-22**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Marin Macuka

Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δhns i $\Delta htpG$ bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta

Diplomski rad

Zagreb, 2019.

Ovaj rad je izrađen u laboratoriju Zavoda za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće i doc. dr. sc. Petre Peharec Štefanić. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja profesora biologije.

ZAHVALE

Zahvalio bih se svim članovima obitelji, onima koji su još uvijek sa mnom i onima koji nažalost više nisu, jer su uvijek bili izvor ljubavi, potpore i beskrajnog razumijevanja tijekom čitavog studiranja.

Zahvalio bih se svim prijateljima koji su mi pružili neprocjenjivo iskustvo kroz ove dugogodišnje studentske dane, posebice Snježani koja je od prvog dana bila izvor potpore, smijeha i KAVE.

Kristini s kojom sam kroz mnogobrojne razgovore propitivao, mijenjao i stvarao stavove pa tako i sebe. May Stryer bless you, my dear.

Bivšoj cimerici Ivani koja mi je poklonila mnoštvo fantastične glazbe bez koje ne znam kako bih utišao i najgore dane. \m/

Moiri koja je vraćala perspektivu kad bih to trebao.

Anja, Marko, Dubravko i Maja, hvala vam na svim priuštenim gastronomskim eskapadama, my mental health thanks you.

Petar, hvala što si znao postaviti pravu riječ na pravo mjesto.

Zahvalio bih se asistentici dr. sc. Kristini Majsec na pruženom znanju i stručnosti bez čije pomoći izvođenje dijela rada ne bi bilo moguće.

Posebno bih se zahvalio svojim mentoricama izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće i doc. dr. sc. Petri Peharec Štefanić što su mi kroz razgovor i diskusiju pomogle da pronađem rješenja na probleme na koje sam nailazio tijekom provedbe eksperimenata, a naročito pisanja ovog rada. Hvala im što su pokazale značajnu ($p < 0.05$) količinu strpljenja i podrške te mi pružile priliku da sudjelujem na njihovom projektu, čime sam stekao dragocjena znanja i iskustvo.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2016-06-8861 „Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*“.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δhns i $\Delta htpG$ bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta

Marin Macuka

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas je obrambeni mehanizam mnogih prokariota od infekcija stranim nukleinskim kiselinama poput virusa i plazmida. Lokus CRISPR sastoji se od niza palindromskih ponavljajućih sekvenci razdvojenih razmaknicama, podrijetlom iz faga ili plazmida. Uz lokus CRISPR nalaze se pridruženi geni *cas*, čijom ekspresijom nastaju proteini Cas koji sudjeluju u obrambenom mehanizmu. Lokus se prepisuje u dugu prekursorsku RNA koja se procesira u manje RNA zvane CRISPR-RNA (crRNA) koje se spajaju s jednim ili više proteina Cas. Taj kompleks pronalazi strane DNA temeljem komplementarnosti sekvenci, te nakon uspješnog prepoznavanja, nastaje R-omča. Tu strukturu prepoznaje protein Cas3 koji nakon vezanja cijepa stranu DNA. Nekoliko čimbenika utječe na aktivnost sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli*: temperatura, protein H-NS, te šaperon HtpG. Pri 37 °C uočen je gubitak aktivnosti proteina Cas3 iz nepoznatih razloga. U ovom radu istraživana je količina proteina Cas3 u sojevima uzgojenim pri temperaturi od 30 °C i 37 °C, te u sojevima s mutiranim genima *hns*, *htpG* ili oba. Analizom količine proteina Cas3 u različitim mutantama bakterije *E. coli*, nije uočena razlika u količini proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi rasta, već u ovisnosti o genotipu mutanta i to mutaciji *hns*.

(44 stranice, 14 slika, 2 tablice, 30 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, Cas3, temperatura, *E. coli*

Voditeljice: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof. i dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.

Neposredni voditelj: dr. sc. Kristina Majsec

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof.
dr. sc. Petra Peharec Štefanić, doc.
dr. sc. Željka Vidaković-Cifrek, izv. prof.
dr. sc. Damir Sirovina, v. pred.

Rad prihvaćen: 18.09.2019

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Graduation Thesis

Determining the quantity of the Cas3 protein in Δhns and $\Delta htpG$ mutants in *Escherichia coli* under different growth conditions

Marin Macuka

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

The CRISPR-Cas system is a defense mechanism employed by many prokaryotes against foreign nucleic acid infections, e.g. viruses and plasmids. The locus CRISPR consists of a series of short palindromic repeats separated by spacers derived from foreign DNA. Near the CRISPR array are *cas* genes which encode Cas proteins that participate in the defense mechanism. The array is transcribed into a long precursor RNA that is processed into smaller RNA called CRISPR-RNA (crRNA) that fuse with one or more Cas proteins. This complex finds foreign DNA through complementary base pairing, which if successful, generates an R-loop. This structure is recognized by Cas3 which cleaves the foreign DNA after binding. Several factors affect the activity of CRISPR-Cas in *E. coli* - temperature, protein H-NS, and chaperon HtpG. A loss of Cas3 activity was observed at 37 °C due to unknown reasons. In this work, the amounts of Cas3 were determined in strains grown at 30 °C and 37 °C, and also in strains that contained mutation in *hns*, *htpG* gene or both. Differences in Cas3 amounts in different *E. coli* mutants weren't dependent on the growth temperature, but rather on the mutant's genotype, specifically *hns* mutation.

(44 pages, 14 figures, 2 tables, 30 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: CRISPR-Cas, Cas3, temperature, *E. coli*

Supervisors: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof. and Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.

Assistant supervisor: Dr. Kristina Majsec

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.
Dr. Petra Peharec Štefanić, Asst. Prof.
Dr. Željka Vidaković-Cifrek, Assoc. Prof.
Dr. Damir Sirovina, Senior lecturer

Thesis accepted: 18.09.2019

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. SUSTAV CRISPR-CAS	1
1.2. MEHANIZAM OBRANE SUSTAVOM CRISPR-CAS	7
1.2.1. Faza adaptacije.....	7
1.2.2. Faza ekspresije	9
1.2.3. Faza interferencije.....	10
1.3. REGULACIJA SUSTAVA CRISPR-CAS TIP A I-E.....	12
1.3.1. H-NS	12
1.3.2. Protein LeuO	13
1.3.3. Protein HtpG	13
1.4. CILJ ISTRAŽIVANJA	16
2. MATERIJALI I METODE	17
2.1. MATERIJALI.....	17
2.1.1. Bakterijski sojevi.....	17
2.1.2. Protutijela i markeri molekularnih masa.....	17
2.1.3. Gelovi i puferi.....	18
2.2. METODE.....	21
2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva	21
2.2.2. Izolacija proteina	21
2.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE).....	22
2.2.4. Prijenos proteina na membranu (Western blot).....	23
2.2.5. Izolacija ukupne RNA.....	24
2.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR).....	25
3. REZULTATI	27
3.1. PROVJERA ISPRAVNOSTI KONSTRUIRANIH SOJEVA BAKTERIJE <i>E. COLI</i>	27
3.2. OPTIMIZACIJA UVJETA DETEKCIJE PROTEINA CAS3 METODOM SDS-PAGE I WESTERN BLOT.....	28

3.3. UTJECAJ TEMPERATURE RASTA NA KOLIČINU PROTEINA CAS3	33
4. RASPRAVA	36
5. ZAKLJUČAK.....	40
6. LITERATURA.....	41

POPIS KRATICA

CRISPR	od engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
Cas	od engl. <i>CRISPR-associated genes</i>
PAM	od engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
crRNA	CRISPR RNA
Cascade	od engl. <i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>
tracrRNA	od engl. <i>trans-activating CRISPR RNA</i>
SF2	od engl. <i>superfamily 2</i>
I _{GLB}	od engl. <i>intergenic region ygcL-ygcB</i>
H-NS	od engl. <i>heat-stable nucleoid-structuring protein</i>
HtpG	od engl. <i>high-temperature protein G</i>
Hsp83	od engl. <i>heat shock protein 83</i>
LB	od engl. <i>Luria broth</i>
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
SDS	natrijev dodecilsulfat
PAGE	elektroforeza u poliakrilamidnom gelu
reH ₂ O	redestilirana voda
Tris	2-amino-2hidroksimetil-propan-1,3-diol
AA/Bis	akrilamid/bisakrilamid
APS	amonijev persulfat
TEMED	tetrametiletildiamin
CBB	<i>Coomassie brilliant blue</i>
CTD	C-terminalna domena
TAE	Tris-acetate-EDTA
qRT-PCR	od engl. <i>quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>

1. UVOD

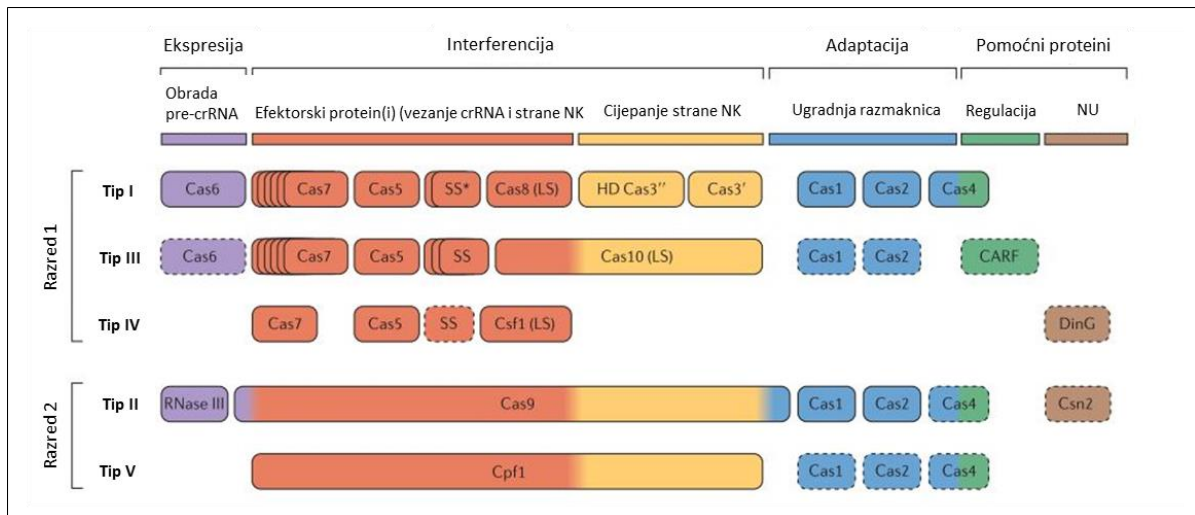
1.1. Sustav CRISPR-Cas

Prokarioti se nalaze u raznim okolišima na čije su se uvjete trebali adaptirati. Jedna od potencijalnih opasnosti za njih je infekcija stranim nukleinskim kiselinama kao što su virusi i plazmidi. Pretpostavlja se da u oceanima dolazi do oko 10^{23} infektivnih događaja u sekundi (Suttle 2007). Kako bi se obranili od napada virusa (bakteriofaga), prokarioti su razvili mnoge obrambene mehanizme poput mutacije membranskih receptora kako bi se spriječila adsorpcija bakteriofaga, altruistički suicid inficiranih stanica, obrana putem restrikcijskih endonukleaza, te sustav CRISPR-Cas (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeat; CRISPR associated*) (Gasiunas i sur. 2014; Makarova i sur. 2015).

Sustav CRISPR-Cas sastoji se od lokusa CRISPR i gena *cas* koji se nalaze u blizini lokusa. Lokus CRISPR sastoji se od niza palindromskih ponavljajućih sekvenci (engl. *repeats*) između kojih se nalaze razmaknice (engl. *spacers*). Ponavljajuće sekvence istog lokusa imaju gotovo iste sekvence, obično duljine od 21 do 48 parova baze, no značajno variraju između različitih sustava. Razmaknice su dijelovi virusa ili plazmida, koji su inficirali stanicu prokariota, te zatim ugrađeni u lokus CRISPR. Informacije u razmaknicama daju prokariotima otpornost na infekciju od tih istih bakteriofaga ili plazmida. Budući da potječu od stranih nukleinskih kiselina njihove sekvence variraju unutar samog lokusa i duljine su od 25 do 72 parova baza. Unutar jednog lokusa CRISPR može se nalaziti niz od 2 do 249 parova ponavljajućih sekvenci i razmaknica (Gasiunas i sur. 2014). Ispred prve ponavljajuće sekvence nalazi se regulatorna vodeća (engl. *leader*) sekvenca, bogata nukleotidima A i T, unutar koje se nalazi slabi

promotor (Pcrispr1) lokusa CRISPR (Pougach i sur. 2010; Pul i sur. 2010). Uz lokus CRISPR nalaze se geni *cas* čijom se ekspresijom stvaraju proteini Cas koji su uključeni u razne korake obrambenog mehanizma.

Sustavi CRISPR-Cas pronađeni su u 85 % arhealnih i 48 % bakterijskih genoma, te je u istom genomu moguće pronaći više lokusa CRISPR, npr. arheja *Metanocaldococcus jannaschii* sadrži osamnaest lokusa (Gasiunas i sur. 2014). Sustavi CRISPR-Cas danas su podijeljeni na dva razreda (klase), šest tipova i devetnaest podtipova. Klasifikacija se temelji na informacijama o jedinstvenim genima *cas* koji su specifični za razne tipove i podtipove sustava, o usporedbi sličnosti sekvenci proteina Cas koji su zajednički raznim tipovima sustava, o filogeniji proteina Cas1 koji ima najvišu evolucijsku očuvanost među proteinima Cas, te o organizaciji gena *cas* i strukturi lokusa CRISPR (Slika 1). Glavnu razliku dvaju razreda pronalazimo u strukturi proteinskih efektora. Sustavi razreda 1 stvaraju efektorski proteinski kompleks iz nekoliko različitih proteina Cas, dok je efektor razreda 2 jedan protein s više domena koji pronalazi i cijepa strane nukleinske kiseline. U razred 1 spadaju tipovi I, III i IV, a u razred 2 tipovi II, V i VI (Koonin i sur. 2017).

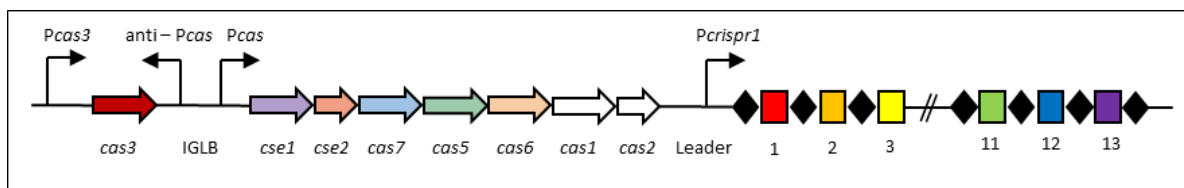


Slika 1. Klasifikacija sustava CRISPR. NK – nukleinska kiselina; NU – nepoznata uloga; LS – engl. *large subunit* (velika podjedinica); SS – engl. *small subunit* (mala podjedinica), zvjezdica označava da je SS spojena sa LS. Isprekidana linije označava elemente koji nisu neophodni za funkcioniranje sustava. Proteini koji su označeni sa više boja imaju ulogu u različitim fazama obrambenog mehanizma. Preuzeto i prilagođeno prema Makarova i sur. 2015.

Sustav CRISPR-Cas tip I najrašireniji je tip sustava. Pronalazimo ga kod 65 % arheja i 60 % bakterija. Podijeljen je na sedam podtipova, od I-A do I-F i I-U koji još nije okarakteriziran. Podtipovi se razlikuju po broju gena i organizaciji operona, no svaki sadrži jedinstveni gen *cas3* (Makarova i sur. 2015). Struktura i mehanizam rada ovog sustava detaljnije su opisani u nastavku.

Sustav CRISPR-Cas tip II nalazimo u svega 13 % bakterija (Makarova i sur. 2015) kojeg karakterizira specifični gen *cas9*. Cas9 je protein s više domena koje sadrže dva nukleazna mjesta (HNH i RuvC) i čini kompleks sa crRNA i tracrRNA. Kompleks Cas9-RNA pronalazi stranu DNA i stvara dvolančane lomove (Makarova i sur. 2015). Zbog svoje jednostavnosti, protein Cas9 pokazao se kao dobar alat za uređivanje genoma (Koonin i sur. 2017).

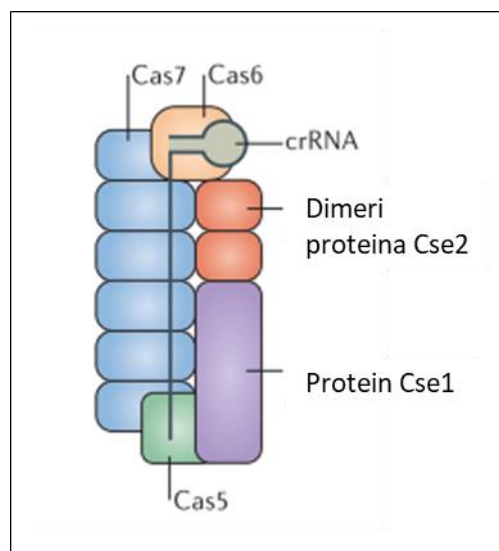
U bakteriji *E. coli* K12 nalazi se sustav CRISPR-Cas tipa I-E koji se sastoji od osam gena *cas* (*cas 3*, *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* i *cas2*) i lokusa CRISPR I koji se sastoji od 13 ponavljajućih sekvenca i 12 razmaknica. Između gena *cas3* (*ygcb*) i gena *cse1* (*ygcl*) nalazi se regija IGLB (od engl. *intergenic region ygcl-ygcb*) koja sadrži promotor gena *cas* (*Pcas*). Unutar IGLB regije nalazi se i anti-*Pcas* promotor koji potiče antisense transkripciju gena *cas3* (Pul i sur. 2010). Između gena *cas2* i prve ponavljajuće sekvence nalazi se regulatorna vodeća regija (engl. *leader region*) duljine oko 500 parova baza u kojoj se nalazi promotor lokusa CRISPR (*Pcrispr*) (Pul i sur. 2010). U genomu se nalaze još dva dodatna lokusa CRISPR, CRISPR II i CRISPR III (Brouns i sur. 2008). Građa sustava CRISPR-Cas I-E prikazana je na Slici 2.



Slika 2. Građa sustava CRISPR-Cas I-E u bakteriji *Escherichia coli* K-12. Crni kvadrati predstavljaju ponavljajuće segmente, dok kvadrati u boji razmaknice. Preuzeto i prilagođeno prema Brouns i sur. 2008.

Pet proteina Cas stvaraju kompleks Cascade (od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) za koji se veže crRNA (405 kDa, $(Cse1)_1:(Cse2)_2:(Cas7)_6:(Cas5)_1:(Cas6)_1:(crRNA)_1$) (Gasiunas i sur. 2014). Helikalni trup kompleksa Cascade, koji služi kao oslonac za ostale proteine Cas i crRNA čine šest podjedinica Cas7. Na jednom kraju trupa vezana je podjedinica Cas6e za koju se veže 3' kraj crRNA, dok se svojim 5' krajem veže za podjedinicu Cas5 vezanu za drugi

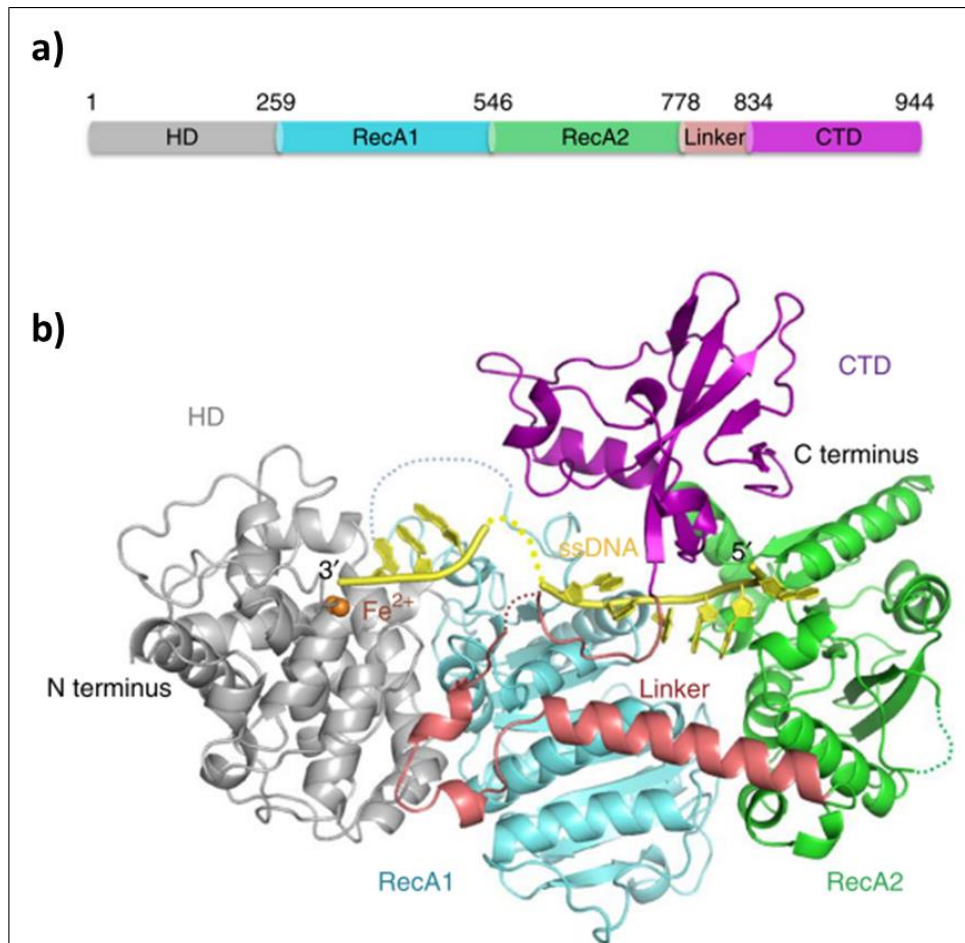
kraj trupa. Time se crRNA razvlači duž trupa kompleksa Cascade, te koordinirana podjedinicama Cas7, poprima poziciju koja joj omogućava interakciju sa stranom nukleinskom kiselinom (Plagens i sur. 2015). Velika (protein Cse1) podjedinica veže se za Cas5, dok je mala podjedinica (dimeri proteina Cse2) kompleksa Cascade vezana za Cas6 podjedinicu. Velika i mala podjedinica stvaraju “truh” kompleksa, te Cascade poprima oblik nalik morskom konjicu (Brouns i sur. 2008; Gasiunas i sur. 2014; Plagens i sur. 2015; Westra i sur. 2013). Kompleks Cascade, prikazan na Slici 3, se preko velike podjedinice veže za protein Cas3.



Slika 3. Građa kompleksa Cascade. Preuzeto i prilagođeno prema Makarova i sur. 2015.

Protein Cas3 (engl. *CRISPR - associated protein 3*), mase oko 100 kDa, sastoji se od N-terminalne HD (histidine - aspartate) nukleazne domene i C-terminalne SF2 (superfamily 2) helikazne domene (Mulepati i Bailey 2011; Slika 4). Helikaza proteina Cas3, koja se sastoji od dvije RecA, linker i C terminalne domene (Huo i sur. 2014), prepoznaje i veže kratku jednolančanu DNA (engl. ssDNA), te uz utrošak ATPa

odmotava lance DNA u 3'→5' smjeru (Sinkunas i sur. 2011). Slaba aktivnost nukleaze (ssDNAse) ovisna je o ionima željeza i cijepa prezentiranu ssDNA. Mutacije u tim domenama smanjuju afinitet proteina Cas3 prema proteinskom kompleksu Cascade (Huo i sur. 2014).



Slika 4. Građa proteina Cas3: a) organizacija domena; b) kristalna struktura. Nukleazna HD domena obilježena je srebrnom bojom, C-terminalna domena ljubičastom, RecA1 domena plavom, RecA2 domena zelenom, te linker domena rozom bojom. Žutom bojom obilježena je vezana ssDNA. Preuzeto i prilagođeno prema Huo i sur. 2014.

Proteine Cas1 i Cas2 pronalazimo u gotovo svim sustavima CRISPR-Cas, te pokazuju visoku evolucijsku očuvanost između vrsta (Makarova i sur. 2015).

Međusobno stvaraju stabilni kompleks koji prepoznaje kratke dvolančane fragmente DNA i nužan su dio faze adaptacije. Cas1 i Cas2 su nukleaze, no samo endonukleazna aktivnost proteina Cas1 je nužna za proces ugradnje nove razmaknice (Amitai i Sorek 2016).

1.2. Mehanizam obrane sustavom CRISPR-Cas

Mehanizam obrane putem sustava CRISPR-Cas odvija se u tri različite faze: faza adaptacije, faza ekspresije i faza interferencije. Proteinski kompleks prepoznaje strane nukleinske kiseline, procesira ih i ugrađuje u lokus CRISPR. Lokus se prepisuje, a prekursorska RNA se procesira u manje segmente zvane CRISPR-RNA (crRNA) koji se spajaju s jednim ili više proteina Cas. Kompleks proteina Cas i crRNA pronalazi strane nukleinske kiseline, te ukoliko dođe do uspješnog prepoznavanja, strana nukleinska kiselina se cijepa i degradira (Amitai i Sorek 2016).

Principi obrambenog mehanizma zajednički su svim sustavima, no građa i broj komponenata koje provode ovaj složeni mehanizam razlikuju se među tipovima sustava CRISPR-Cas, te je u ovome radu mehanizam obrane opisan na primjeru sustava tipa I-E bakterije *E. coli* (Slika 5).

1.2.1. Faza adaptacije

Tijekom faze adaptacije dolazi do prepoznavanja stranih nukleinskih kiselina koje se obrađuju i u obliku nove razmaknice ugrađuju unutar lokusa CRISPR uz duplikaciju nove ponavljajuće sekvence (Amitai i Sorek 2016). Glavni dio adaptacijskog procesa obavlja proteinski heksamer koji je načinjen od dva dimera proteina Cas1 koji su međusobno spojeni jednim dimerom proteina Cas2 (kompleks Cas1-Cas2). Kompleks

Cas1-Cas2 prepoznaje dsDNA s jednolančanim krajevima. Takve fragmente stvara egzonukleazna aktivnost enzim RecBCD, koji prepoznaje dvolančane lomove, odmotava molekulu DNA i cijepa do tzv. chi mjesta (sekvenca od 8 nt). Nastali jednolančani fragmenti mogu hibridizirati i postati potencijalni supstrat za kompleks Cas1-Cas2. Cas1 podjedinice vežu 3'- krajeve pronađenog fragmenta, prepoznaju PAM, te režu lance, čime stvaraju protorazmaknicu karakteristične duljine od oko 33 parova baza. Dvolančani dio protorazmaknice stabiliziran je interakcijama sa Cas2 dimerom (Amitai i Sorek 2016; Westra i sur. 2013; Yosef i sur. 2012).

Nova razmaknica se uvijek ugrađuje između vodeće sekvence i prve ponavljajuće sekvence lokusa CRISPR (Yosef i sur. 2012) kroz dvije transesterifikacijske reakcije. Pretpostavlja se da podjedinica Cas1 kompleksa Cas1-Cas2 za koju nije vezan 3'-kraj protorazmaknice prepoznaje mjesto insercije na temelju nekoliko faktora. Istraživanja su pokazala da samo na mjestima superzavojnica može doći do insercije nove razmaknice (Amitai i Sorek 2016). Osim toga, potrebne su i palindromske regije koje imaju potencijal poprimanja strukture ukosnice (strukture koju prepoznaju integraze), te heterodimer IHF koji se veže za vodeću sekvencu, inducira savijanje molekule DNA, što naposljetku određuje točno mjesto ugradnje nove razmaknice (Amitai i Sorek 2016; Jackson i sur. 2017; Nuñez i sur. 2016). Uspješna ugradnja nove razmaknice neovisna je o broju ponavljajućih sekvenci, no potrebna je minimalno jedna (Yosef i sur. 2012), a ispravnu orijentaciju nove razmaknice određuje 3'-citozin PAM-a (5'-CTT-3') (Amitai i Sorek 2016).

1.2.2. Faza ekspresije

Prisutnost stranog genetičkog materijala potiče prepisivanje lokusa CRISPR čime nastaje dugački transkript - pre-crRNA (Gasiunas i sur. 2014). Kod bakterije *E. coli* zadnja ponavljajuća sekvenca vrlo je degradirana i predstavlja potencijalni signal za terminaciju transkripcije kako bi se spriječilo antisense prepisivanje nizvodnih gena (Pougach i sur. 2010).

Pre-crRNA sadrži ponavljajuće sekvence koje zbog svoje palindromske prirode mogu stvarati omče (engl. *hairpin loop*). Omče uklanja endonukleaza Cas6e koja ostaje vezana za 3'-kraj zrele crRNA, zatim se za 5'-kraj veže protein Cas5e, te ostali proteini Cas čineći kompleks Cascade. Podjedinica Cse1 svojom domenom L1 prepoznaje PAM na 3'-kraju protorazmaknice (Hochstrasser i sur. 2014), te sparivanjem baza crRNA i protorazmaknice, dolazi do istiskivanja nekomplementarnog lanca i stvaranja R-omče (Gasiunas i sur. 2014; Plagens i sur. 2015; Westra i sur. 2013). Formiranje R-omče započinje na PAM proksimalnome 3'-kraju protorazmaknice nakon uspješnog prepoznavanja "seed" sekvence crRNA i "seed" regije protorazmaknice (Semenova i sur. 2011). Ukoliko se R-omča proširi do kraja protorazmaknice, ona postaje vrlo stabilna te postaje signal koji potiče vezanje proteina Cas3 za kompleks Cascade (Rutkauskas i sur. 2015). Mutacije u "seed" regiji protorazmaknice mogu zaustaviti i spriječiti formiranje R-omče i omogućiti bijeg bakteriofaga (Semenova i sur. 2011).

1.2.3. Faza interferencije

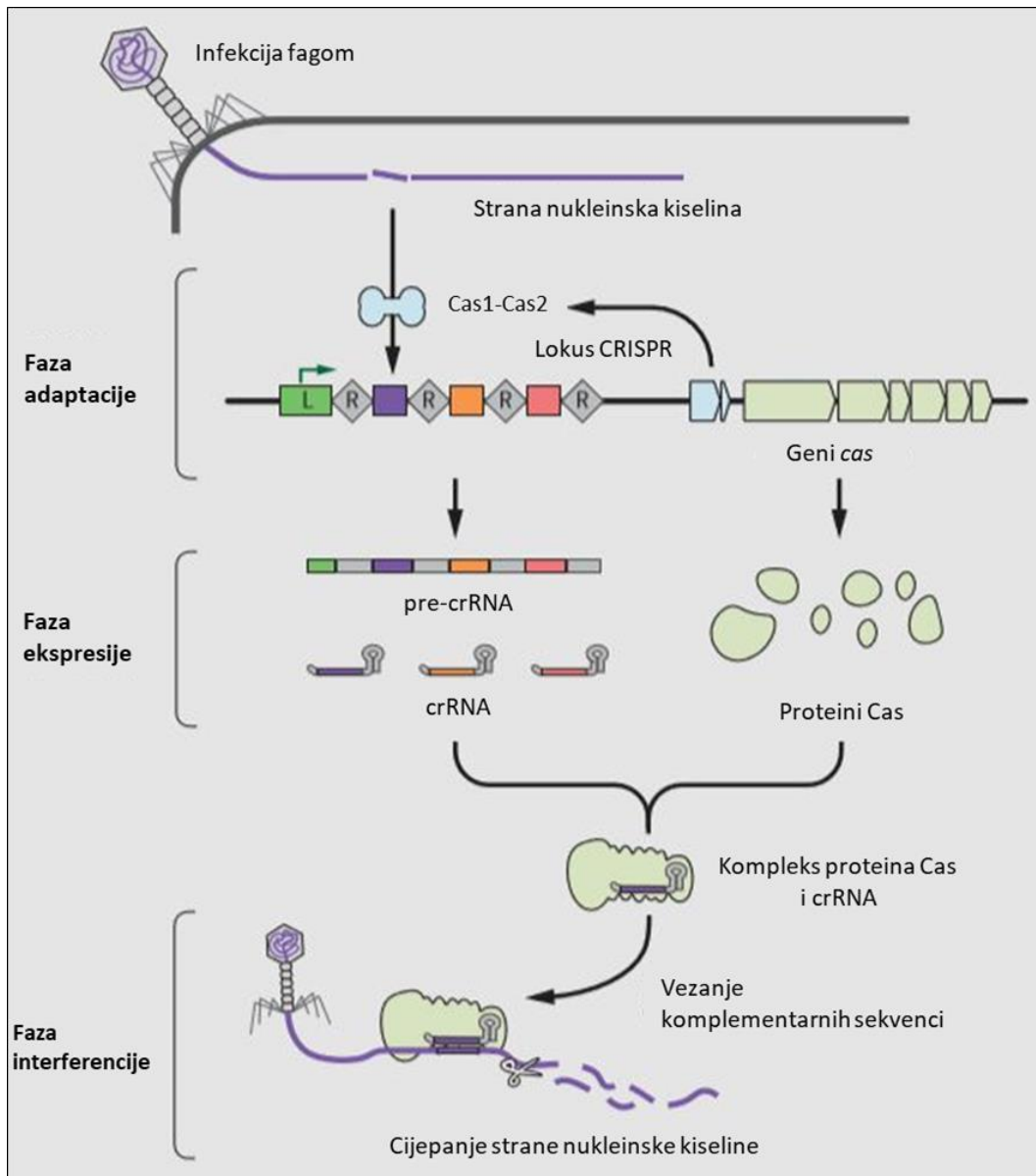
Tijekom faze interferencije kompleks Cascade dovodi protein Cas3 koji cijepa protorazmaknicu.

Kompleks Cascade, s formiranom i stabilnom R-omčom, veže protein Cas3 svojom podjedinicom Cse1 (Hochstrasser i sur. 2014), čime se otvaraju mjesta za vezanje nukleinskih kiselina u helikaznoj i nukleaznoj domeni proteina Cas3. Istisnuti lanac DNA protorazmaknice se izbočuje i približava HD nukleazi proteina Cas3 čija endonukleazna aktivnost stvara lom u nekomplementarnom lancu. Nakon cijepanja, protein Cas3 se translocira na novonastali jednolančani (ss od engl. single-stranded) ssDNA lanac te helikaznom aktivnošću započinje odvajanje lanaca u 3'→5' smjeru uz utrošak ATPa (Hochstrasser i sur. 2014; Westra i sur. 2012; Xiao i sur. 2018). Helikaza pomiče i prezentira 3'-kraj ssDNA HD nukleazi koja cijepa lanac na mjestima bogatim nukleotidom T (Loeff i sur. 2018). Cas3 ima tendenciju "proklizavanja" unatrag, što omogućava opetovano prezentiranje ssDNA HD nukleazi koja zbog slabe aktivnosti može propustiti pogodna mjesta za cijepanje (Künne i sur. 2016; Loeff i sur. 2018).

Produkti egzonukleazne aktivnosti proteina Cas3 slične su duljine razmaknicama i mogu hibridizirati. Takvi dvolančani fragmenti čiji jednolančani privjesci mogu sadržavati konsenzus 5'-CTT-3' PAM sekvencu predstavljaju potencijalni supstrat za kompleks Cas1-Cas2 koji ih iskorištava u fazi adaptacije (Künne i sur. 2016; Loeff i sur. 2018).

Mutacije u PAM ili regiji "seed" protorazmaknice mogu prouzrokovati suboptimalno sparivanje protorazmaknice i kompleksa Cascade te smanjiti efikasnost interferencije (Westra i sur. 2013). Tada postoji mogućnost da mutirani bakteriofag ili plazmid izbjegne mehanizam obrane, te naštetiti stanici, no tako suboptimalno sparen kompleks

Cascade i protorazmaknica postaju meta za kompleks Cas1-Cas2, koji mutiranu protorazmaknicu koristi u procesu adaptacije (Amitai i Sorek 2016). Ovim mehanizmom pripremljene (engl. primed) adaptacije, bakterija *E. coli* neutralizira mutante koji su izbjegli početni korak obrane temeljen na već postojećoj razmaknici.



Slika 5. Faze obrambenog mehanizma CRISPR-Cas. Preuzeto i prilagođeno prema Jackson i sur. 2017.

1.3. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E

Razni faktori utječu na aktivnost sustava CRISPR-Cas tipa I-E. Oni mogu biti okolišni kao što su promjene temperature, osmolarnosti, pH, "quorum sensing" signali, razni anti-Cas proteini nastali tijekom evolucijske utrke prokariota i bakteriofaga, pa i sami proteini domaćina koji nisu produkt gena *cas*. Neki proteini koji reguliraju aktivnost sustava CRISPR-Cas tipa I-E su H-NS (od engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein*), LeuO i HtpG (od engl. *high-temperature protein G*).

1.3.1. Protein H-NS

Protein H-NS, mase oko 15 kDa, sastoji se od N- i C- terminalne domene spojene veznom domenom. Monomeri proteina H-NS spajaju se N-domenom, te postoje unutar stanice u obliku dimera, no mogu i oligomerizirati. Dimeri svojom C-domenom prepoznaju i vežu molekulu DNA. Protein H-NS ima afinitet prema savijenim dijelovima molekule DNA koji su bogati nukleotidima A i T. Dimeri se prvo vežu za mjesta visokog afiniteta, nakon čega oligomeriziraju i pokrivaju okolna mjesta nižeg afiniteta (engl. *DNA stiffening*). Oligomeri mogu prekriti promotorska mjesta ili zatočiti RNA polimerazu unutar protein-DNA kompleksa i spriječiti transkripciju gena (Dorman i Deighan 2003; Fang i Rimsky 2008). Regija IGLB, u kojoj se nalazi sekvenca bogata nukleotidima A i T, sadrži promotor *Pcas*, dok vodeća sekvenca sadrži promotor *Pcrispr1*. Oba promotora veže i utišava protein H-NS čime negativno regulira transkripciju gena *cas* i lokusa CRISPR (Pul i sur. 2010). Majsec i sur. (2016) pokazali su da protein H-NS negativno regulira transkripciju gena *cas3* osobito ako su stanice uzgojene do stacionarne faze rasta na 37 °C. Osim na regulaciju gena, protein H-NS sudjeluje u organizaciji kromosomske DNA (Fang i Rimsky 2008). Utjecaj proteina H-

NS može smanjiti promjena u temperaturi, osmolarnosti, pH, te razni proteini koji su sa njim u kompeticiji (Pul i sur. 2010).

1.3.2. Protein LeuO

Za obranu od stranih nukleinskih kiselina potrebno je poništiti represiju gena *cas* uzrokovanu proteinom H-NS kako bi se aktivirao sustav CRISPR-Cas. Na represiju sustava CRISPR-Cas proteinom H-NS utječu razni faktori, npr. promjena temperature, pH, osmolarnosti, te razni proteini. Jedan od takvih proteina je LeuO. Protein LeuO je regulator koji pripada porodici LysR transkripcijskih faktora i djeluje kao antagonist proteinu H-NS. Delecija gena *hns* ili povećana ekspresija gena *leuO* povećava transkripciju gena *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* i *cas2*, i akumulaciju zrelih crRNA.

Proteini H-NS i LeuO vežu se za regiju IGLB gdje protein LeuO sprječava daljnje vezanje i oligomeriziranje proteina H-NS. Prisutnost proteina LeuO smanjuje osjetljivost stanica bakterije *E. coli*, koje u lokusu CRISPR sadrže razmaknicu komplementarnu dijelu genoma faga λ , na infekciju fagom λ .

Nakon infekcije stranom nukleinskom kiselinom, moguće je da dolazi do redistribucije proteina H-NS te se time smanjuje represija sustava CRISPR-Cas, ali i gena *leuO*. Veća transkripcija gena *leuO* pozitivno utječe na transkripciju lokusa CRISPR (Westra i sur. 2010).

1.3.3. Protein HtpG

Protein HtpG iz bakterije *E. coli* homologan je eukariotskom proteinu Hsp83 (od engl. *heat shock protein 83*) i spada u skupinu šaperona Hsp90. Šaperoni se za

vrijeme povišene temperature, infekcije virusom ili u prisustvu toksične tvari intenzivnije sintetiziraju, kako bi pomogli zauzimanje pravilne konformacije drugih proteina (Bardwell 1987). Pretpostavlja se da protein HtpG utječe na razinu funkcionalnog proteina Cas3 time što sudjeluje u njegovom ispravnom smatanju i/ili sprječavanju njegove agregacije. Nedostatak aktivnog proteina Cas3, u nedostatku proteina HtpG, može se nadomjestiti povećanom količinom proteina Cas3 (ekspresija sa plazmida) (Yosef i sur. 2011). Utjecajem na razinu aktivnog proteina Cas3, protein HtpG posredno regulira aktivnost sustava CRISPR-Cas.

U bakteriji *E. coli* potrebno je aktivirati sustav CRISPR-Cas kako bi zaštitio stanice od infekcije virusima i/ili plazmidima. Konstruirani mutanti u kojima je deletiran gen *hns* (Δhns) i kojima je u lokus CRISPR ugrađena razmaknica anti-lambda $\lambda T3$ koja je komplementarna dijelu genoma faga λ postaju otporni na infekciju fagom λ (Westra i sur. 2010). Soj $\Delta hns + \lambda T3$ pokazuje 100000 puta veću otpornost na infekciju fagom λ , nego soj Δhns koji ne posjeduje razmaknicu $\lambda T3$, samo ako se stanice uzgajaju na 30 °C. Poput soja bez razmaknice, soj $\Delta hns + \lambda T3$ gubi stečenu otpornost na infekciju ako su stanice uzgajane na 37 °C. Stanice s aktivnim genom *hns* (*hns*⁺) osjetljive su na infekciju fagom λ neovisno o temperaturi uzgoja ili prisutnosti razmaknice $\lambda T3$ (Majsec i sur. 2016). Ovi rezultati pokazuju da je za uspješnu otpornost nužan uzgoj bakterija nakon infekcije na 30 °C.

Analizom transkripata gena *cas3* u sojevima *hns*⁺ i Δhns uočena je razlika u količini transkripata ovisna o fazi rasta, no ne o temperaturi. Naime, količina transkripcije gena *cas3* bila je slična u logaritamskoj fazi rasta, dok su u stacionarnoj fazi količine transkripata bile značajno veće kod soja Δhns nego kod soja *hns*⁺, neovisno o temperaturi rasta (Majsec i sur. 2016). Stoga je zaključeno da osjetljivost soja Δhns

na fag λ pri temperaturi 37 °C vjerojatno nije posljedica smanjene transkripcije gena *cas3*, nego posljedica smanjene količine proteina Cas3 i/ili njegove narušene stabilnosti (Majsec i sur. 2016).

Povećana ekspresija proteina Cas3 s plazmida vratila je otpornost mutantima Δhns koji su uzgajani na 37 °C, no pri istoj temperaturi rasta soj postaje osjetljiv na infekciju fagom ako je deletiran gen *htpG*. Otpornost se kod dvostrukog mutanta ($\Delta htpG \Delta hns$) vratila ako su stanice uzgajane samo na 30 °C. Zaključeno je da otpornost soja Δhns ovisi o povećanoj količini proteina Cas3 pri 30 °C, dok na 37 °C dodatno ovisi o prisutnosti proteina HtpG (Majsec i sur. 2016; Westra i sur. 2010).

1.4. Cilj istraživanja

Cilj istraživanja bio je odrediti količine proteina Cas3 metodom *Western blot* pri uzgoju stanica na 30 °C i 37 °C, te ovise li o mutacijama u genima *hns* i *htpG*.

2. MATERIJALI I METODE

2.1. Materijali

2.1.1. Bakterijski sojevi

U Tablici 1 prikazani su genotipovi četiri mutanata soja bakterije *E. coli* koja su korištena u ovom radu.

Tablica 1. Sojevi bakterije *E. coli* korišteni u istraživanju

Soj	Genotip	Referenca
IIB1088	BW25113 His6x-cas3::kan	ovaj rad
IIB1103	BW25113 His6x-cas3::kan Δ hns::cat	ovaj rad
IIB1104	BW25113 His6x-cas3::kan Δ htpG::FRT	ovaj rad
IIB1105	BW25113 His6x-cas3::kan Δ htpG::FRT Δ hns::cat	ovaj rad

2.1.2. Protutijela i markeri molekulskih masa

U ovom radu su korišteni slijedeći markeri i protutijelo:

1. Protutijelo - Monoclonal Anti-polyHistidine Peroxidase Conjugate Clone HIS-1 (Sigma-Aldrich)
2. Marker masa za proteine - Pierce™ Unstained Protein MW Marker, ThermoFisher Scientific
3. Marker za nukleinske kiseline Gene Ruler 1 kb, DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

2.1.3. Gelovi i puferi

U ovom poglavlju prikazani su puferi korišteni za lizu uzorkovanih stanica i denaturanciju izoliranih ukupnih proteina, puferi i gelovi za razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE), te puferi potrebni za detekciju proteina od interesa metodom *Western blot*.

Pufer za lizu:

25 mM Tris-HCl pH 8

300 mM NaCl

1 mM PMSF

Pufer za denaturaciju proteina (Laemmli sample buffer):

125 mM Tris-HCl pH 6.8

4 % (w/v) SDS

4 % (w/v) β -merkaptoetanol

32 % (v/v) glicerol

Kap bromfenol plavog

Elektrodni pufer pH 8,3:

25 mM Tris

192 mM glicin

1 % (w/v) SDS

Tablica 2. Poliakrilamidni gelovi korišteni za razdvajanje proteina elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Gel za razdvajanje (10 ml)		Gel za koncentriranje (5 ml)	
reH2O	4 ml	reH2O	3,050 ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,8	2,5 ml	1,5 M Tris-HCl pH 6,8	1,250 ml
30 % AA/Bis	3,35 ml	30 % AA/Bis	0,665 ml
10 % SDS	100 µl	10 % SDS	50 µl
10 % APS	50 µl	10 % APS	35 µl
TEMED	5 µl	TEMED	8 µl

Pufer za prijenos pH 8,3:

28 mM Tris

192 mM glicin

10 % (v/v) metanol

1 x TBS pufer pH 7,5:

20 mM Tris

73 mM NaCl

1 x PBS pufer pH 7,4:

10 mM Na₂HPO₄

1,7 mM KH₂PO₄

130 mM NaCl

2,7 mM KCl

Pufer za blokiranje (30 ml):

1,5 g mlijeka u prahu

30 ml 1x PBS

Pufer za ispiranje (25 ml):

25 ml 1x PBS

12,5 µl TWEEN 20 detergent

2.2. Metode

2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi uzgojeni su na krutom hranjivom (LB) (10 g/L baktotripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar) mediju na temperaturi od 37 °C dok ne formiraju pojedinačne kolonije. Pojedinačne kolonije inokulirane su u tekući LB medij (10 g/L baktotripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl), dodana je L-arabinoza (krajnja koncentracija: 0,2 %) kako bi se inducirala transkripcija obilježenog gena *His6x-cas3*, te su zatim kolonije inkubirane u različitim tresilicama na 30 °C i 37 °C preko noći (oko 18 sati) kako bi dostigle stacionarnu fazu razvoja.

Sojevi su uzgojeni do logaritamske faze rasta tako što se tekući LB medij (20 ml) inokulirao s 0,5 ml prekonoćne kulture te inkubirao u različitim tresilicama na 30 °C i 37 °C. Pri optičkoj gustoća medija od $OD_{600} = 0,5$ dodana je L-arabinoza (krajnja koncentracija: 0,2 %) kako bi se inducirala transkripcija obilježenog gena *His6x-cas3*. Sojevi su uzorkovani svakih sat vremena kroz tri sata nakon indukcije transkripcije. U LB medij dodan je antibiotik kanamicin (50 µg/ml).

2.2.2. Izolacija proteina

Stanice su sakupljene centrifugiranjem (Centrifuga *Eppendorf 5430 R*) 0,5 ml prekonoćne kulture bakterija uzgojene do stacionarne faze rasta, odnosno 2 ml za stanice uzgojene do logaritamske faze rasta (20 800 rcf, 5 minuta, sobna temperatura), supernatant (LB medij) je dekantiran te su stanice resuspendirane u 300 µl pufera za lizu. Stanice su lizirane sonikatorom (*High Intensity Ultrasonic Processor* (Bioblock Scientific)) 10 puta po 2 sekunde uz pauzu od 4 sekunde između svakog soniciranja pri +4 °C. Nakon sonikacije, uzorci su centrifugirani (20 800 rcf, 10 minuta,

+4 °C), te odvojen supernatant u kojem se nalaze topivi proteini i protein Cas3 s histidinskim privjeskom ((His)₆-Cas3).

Koncentracija proteina u supernatantu izmjerena je pomoću spektrofotometra UV/VIS (Unicam) pri valnoj duljini 595 nm, koristeći metodu prema Bradfordu (Bradford 1976).

Izolirani proteini su se pomiješali sa puferom za denaturaciju, te denaturirali u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf) 5 minuta pri 95 °C.

2.2.3. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE)

Elektroforeza je provedena u uređaju Mini-PROTEAN Cell 3 (Bio-Rad). Prvo je pripremljen 10 %-tni gel za razdvajanje (Tablica 2) koji je izliven između dviju staklenih ploča. Gelovi su nadsvodnjeni otopinom 20 %-tnog etanola obojenom bromfenol plavim, te ostavljeni da se polimeriziraju 45 minuta. Nakon polimerizacije, odstranjen je etanol, pripremljena otopina 4 %-tnog gela za koncentriranje koji je izliven na gel za razdvajanje (Tablica 2). U tek izliveni gel za koncentriranje umetnut je „češljic“ koji stvara jažice. Gel za koncentriranje se polimerizira oko 15 minuta. Nakon polimerizacije „češljic“ je odstranjen i u svaku jažicu nanesa je jednaka količina (9 µg) denaturiranih proteina. Gelovi s uzorcima su stavljeni u kadnicu sa elektrodnim puferom, te su proteini razdvojeni elektroforezom. Elektroforeza je tekla 15 minuta na 100 V kako bi proteini ušli u gel za koncentriranje i sabrali se na granici dvaju gelova. Time su proteini dovedeni u gotovo istu početnu poziciju, što omogućuje ravnomjerno razdvajanje proteina u zasebne vrpce. Razdvajanje je teklo na 200 V oko 45 minuta. Gelovi su obojani bojom Coomassie Brilliant Blue R-250 (0,1 % (w/v) CBB R-250, 45

% (v/v) metanol, 10 % (v/v) ledena octena kiselina) u trajanju od 60 minuta, zatim odbojeni u otopini za odbojavanje (10 % octena kiselina, 10 % etanol). Gelovi s obojenim vrpčama su skenirani i slike pohranjene na računalu.

2.2.4. Prijenos proteina na membranu (*Western blot*)

Denaturirani proteini razdvojeni su elektroforezom po postupku opisanog u prošlom poglavlju, a zatim preneseni na nitrocelulozne membrane (*Whatman Protan BA 83* (GE Healthcare)) u puferu za prijenos mokrim prijenosom (*Western blot*). Prijenos je trajao 60 minuta pri 60 V. Nakon prijenosa, membrane su kratko obojane crvenom bojom *Rouge Ponceau S* (0,2 % *Ponceau*, 3 % octena kiselina) kako bi provjerili uspješnost prijenosa, isprane destiliranom vodom, te su obojane vrpce markera označene grafitnom olovkom. Crvena boja s membrana uklonjena je kratkim ispiranjem 1 x TBS puferom, zatim se membrane inkubiraju 60 minuta u puferu za blokiranje kako bi se sva ostala slobodna vezna mjesta na membrani zasitila proteinima iz mlijeka. Time se sprječava nespecifično vezanje antitijela, a time i stvaranje lažnog signala prilikom detekcije.

Nakon blokiranja, membrane se ispiru tri puta po 5 minuta s po 25 ml pufera za ispiranje, te se inkubiraju dva sata u 20 ml otopine protutijela anti-His (10 μ l "stock" otopine protutijela (1 mg/ml) razrijeđeno u 20 ml pufera za ispiranje). Nakon inkubiranja, membrane su isprane tri puta po 5 minuta s po 25 ml pufera za ispiranje. Proteini na membrani su detektirani kemiluminiscentno pomoću reagensa za detekciju *ECL Western Blotting Substrate* (Promega). Kemiluminiscentnu detekciju omogućavaju protutijela anti-His, vezana za proteine, koja su obilježena peroksidazom iz hrena (horseradish peroxidase). 1 ml otopine luminol pojačivača

pomiješano je s 1 ml otopine peroksida, preliveno preko membrane i inkubirano u mraku na 5 minuta. Signal je detektiran pomoću uređaja *C-DiGit Blot Scanner* (Li-COR, Biosciences), te intenziteti istih određeni pomoću softverskog paketa *Image Studio v.4.0* (Li-COR).

Statistička analiza dobivenih podataka provedena je u programu Microsoft Excel, određene su srednje vrijednosti i standardne devijacije. Srednje vrijednosti dvaju uzoraka uspoređene su pomoću studentovog t-test koristeći alat „*data analysis*“ programa Microsoft Excel koristeći opciju „*t-Test: Paired Two Sample for Means*“. T-testom određujemo postoji li značajna razlika između srednjih vrijednosti dviju grupa podataka, odnosno koja je vjerojatnost da je razlika proizvod slučajnosti. U ovom radu to su dvije srednje vrijednosti količina proteina Cas3 jednog soja uzgojenog na dvije različite temperature. Razina značajnosti postavljena je na 0.95, te su razlike srednjih vrijednosti dvaju uzoraka smatrane značajnima ako je p-vrijednost bila manja od 0.05.

2.2.5. Izolacija ukupne RNA

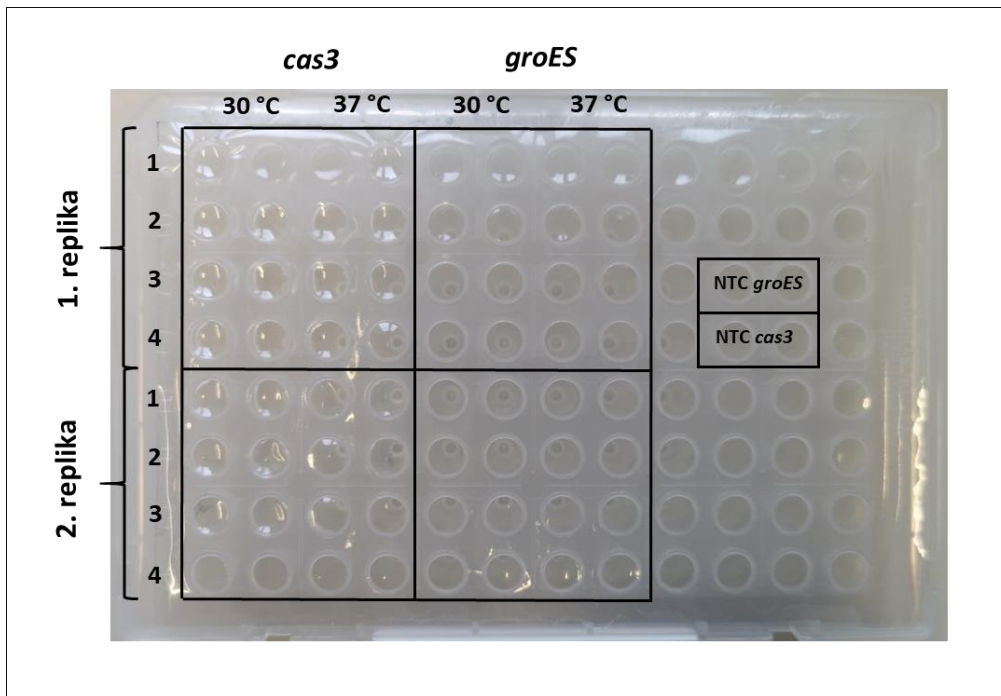
Izolacija ukupne RNA iz sojeva bakterije *E. coli* izvedena je prema uputama proizvođača kita RNeasy Mini Kit (QIAGEN). Koncentracija i čistoća izolata izmjerena je pomoću spektrofotometra NanoVue. Potencijalni raspad izolirane RNA provjeren je gel elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (30 ml 1 x pufer TAE (40 mM Tris, 20 mM CH₃COOH, 1 mM EDTA), 0.3 g agaroz, 2 µl boje SyberGreen dye) i vizualizaciji razdvojenih vrpca pomoću Kodak kamere. Elektroforeza se odvijala u 1 x puferu TAE oko 15 minuta na 100 V. Izolirani uzorci RNA tretirani su DNazom, za čiju reakciju se koristio DNazni pufer (40 mM Tris-HCl pH 7.5, 6 mM MgCl₂). Reakcija DNazom trajala

je 10 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega su se uzorci inkubirali 10 minuta u termobloku pri 70 °C kako bi se DNaza inaktivirala.

2.2.6. Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR)

Izolirani uzorci ukupne RNA iz sojeva bakterije *E. coli* korišteni su za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR) kako bi se provjerila ispravnost inducibilnog konstrukta gena *cas3*. Uzorci ukupne RNA (kalup) dodani su na PCR „pločicu“ zajedno sa reakcijskom otopinom (engl. *master mix*) sa završnim volumenom od 20 µl. U zasebne jažice su naneseni početnice za tzv. *house-keeping* gene - geni sa konstitutivnom i stalnom stopom ekspresije. Jedan od tih gena je i gen *groES* koji zajedno s genom GroEL kodira za šaperon uključen u procese pravilnog smatanja mnogih proteina, te je korišten za usporedbu relativnih količina transkripata. Na „pločici“ su dodane jažice bez kalupa kao kontrola kontaminacije jažica ili reagenata stranom DNA ili stvaranja primer dimera (NTC, engl. *no template control*). Na istoj „pločici“ za svaku reakciju napravljene su dvije tehničke replike (Slika 6).

Lančana reakcija polimerazom u stvarnom vremenu izvedena je prema uputama proizvođača One Step SYBR® PrimeScript™ RT-PCR Kit II (TaKaRa), uz napomenu da su se u reakciji koristili uzorci RNA krajnje koncentracije 0.1 ng/µl, koristeći instrument Applied Biosystems 7500/7500 Fast Real-Time PCR System.



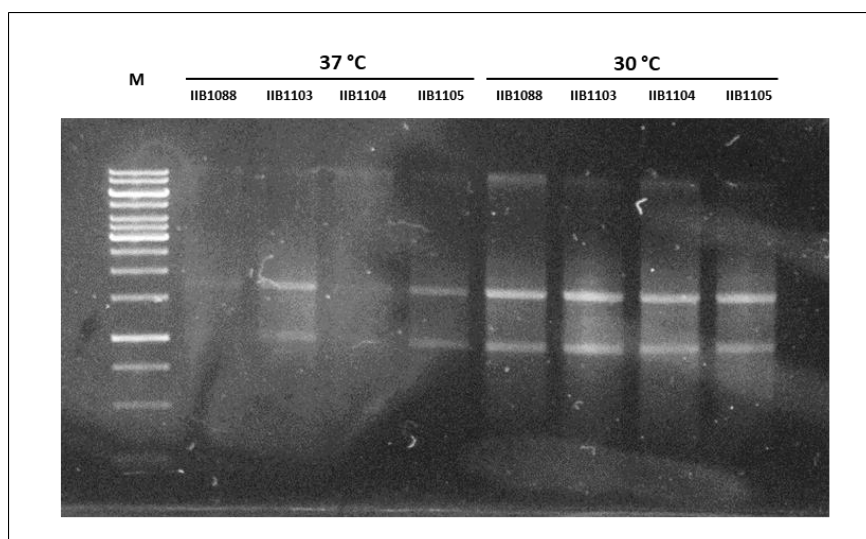
Slika 6. Priprema „pločice“ za lančanu reakciju polimerazom u stvarnom vremenu (qRT-PCR). Na „pločici“ su naneseni uzorci iz dvije biološke replike. Sojevi: 1 - IIB1088 (*wt*), 2 - IIB1103 (Δhns), 3 - IIB1104 ($\Delta htpG$) i 4 - IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojeni do stacionarne faze rasta; NTC – no template control.

3. REZULTATI

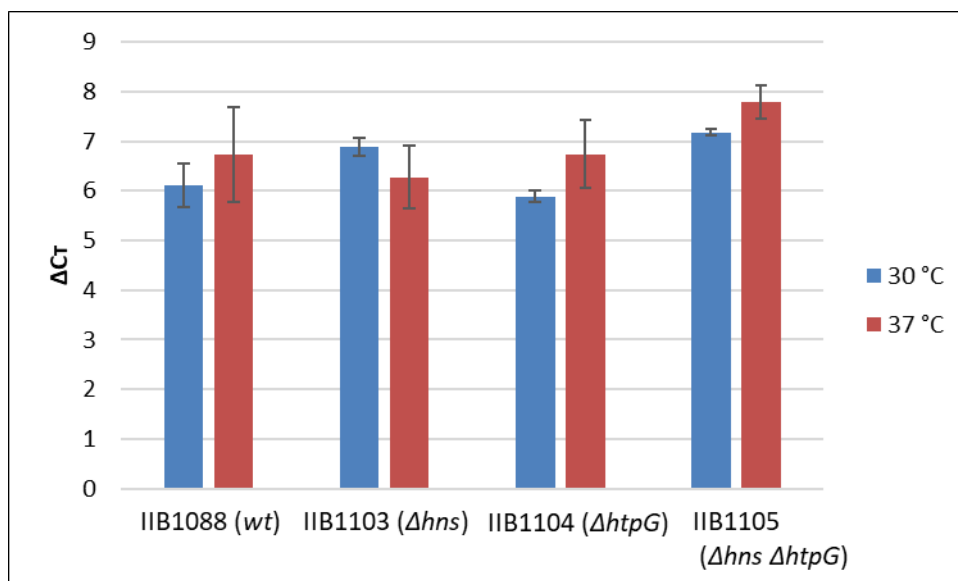
3.1. Provjera ispravnosti konstruiranih sojeva bakterije *E. coli*

Za potrebe ovog istraživanja konstruirani su različiti sojevi (Tablica 1) bakterije *E. coli*. Svi konstruirani sojevi imaju gen *cas3* obilježen s histidinskim privjeskom His6 na 5' kraju i gen *cas3* je stavljen pod inducibilni promotor p_{BAD} kako bi se inducirala ekspresija dodatkom 0,2 % L-arabinoze. U ovaj početni bakterijski soj („divlji tip, *wt*“) zatim su uvedene mutacije u gene *hns* i/ili *htpG* kako bi se istražio mogući utjecaj ovih gena na stabilnost, odnosno količine proteina Cas3.

Sojevi su uzgojeni do stacionarne faze rasta na dvije različite temperature (30 °C i 37 °C) i izolirana je ukupna RNA iz uzorkovanih stanica (Slika 7). Metodom qRT-PCR, u kojoj je korištena izolirana ukupna RNA iste količine (s uklonjenom DNA, rezultati nisu prikazani), kvantificirana je količina transkripata gena *cas3* u konstruiranim sojevima i prikazana grafički na Slici 8.



Slika 7. Izolacija ukupne RNA iz sojeva uzgojenih do stacionarne faze uz induktor L-arabinozu na 30 °C i 37 °C.



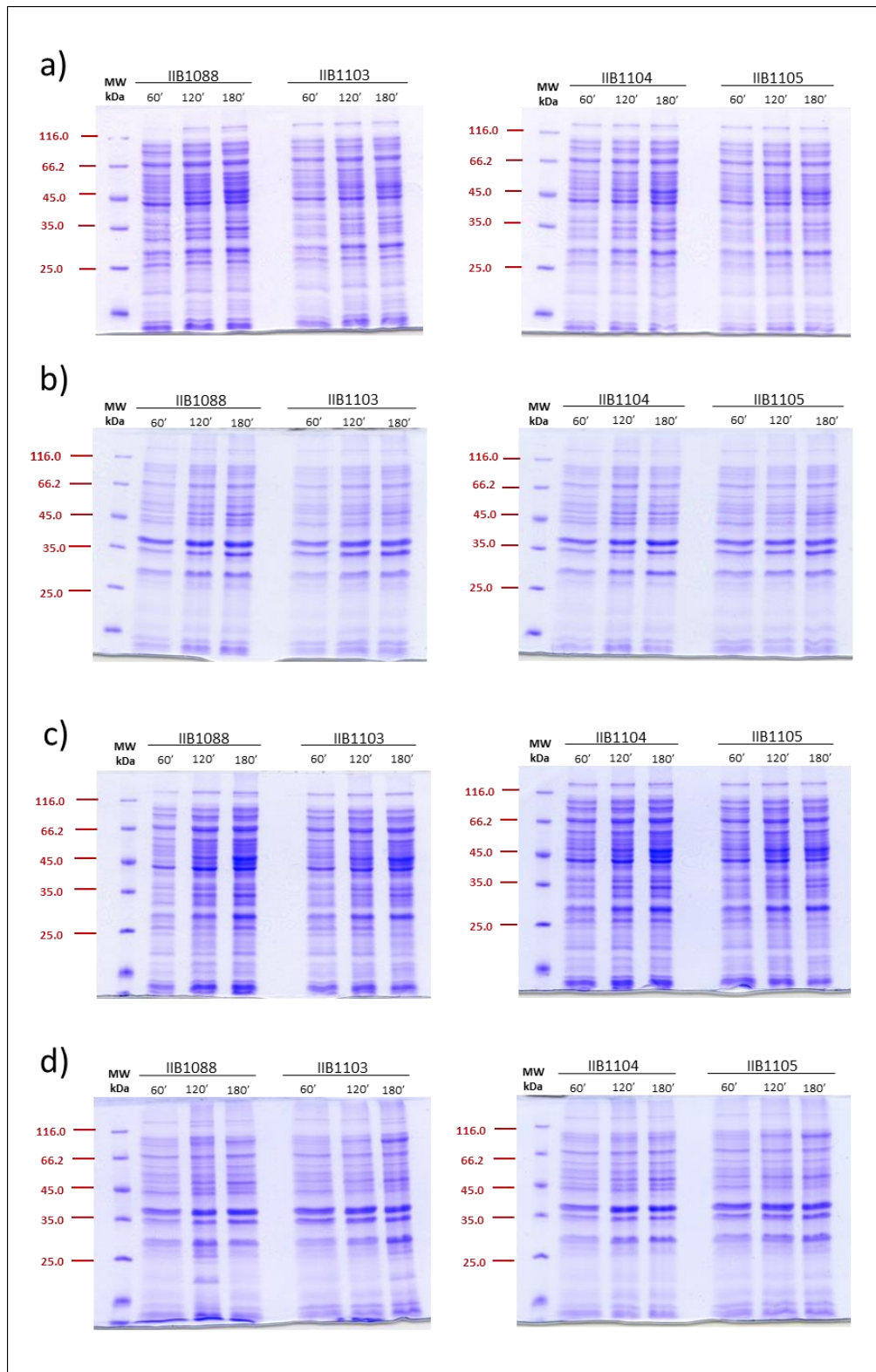
Slika 8. Kvantifikacija transkripata gena *cas3* u konstruiranim sojevima IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$), uzgojenih do stacionarne faze uz induktor L-arabinozu na 30 °C i 37 °C. Omeđenim crnim linijama su označene standardne devijacije. Prikazane su srednje vrijednosti iz dvije biološke replike.

Analizom je utvrđeno da do transkripcije gena *cas3* dolazi u svim konstruiranim sojevima u sličnim količinama, oko 6 - 8 puta, što potvrđuje aktivnost arabinoznog promotora. Kako su količine transkripata gena *cas3* slične neovisno o temperaturi ili genotipu to ukazuje da transkripcija ovisi samo o jačini promotora.

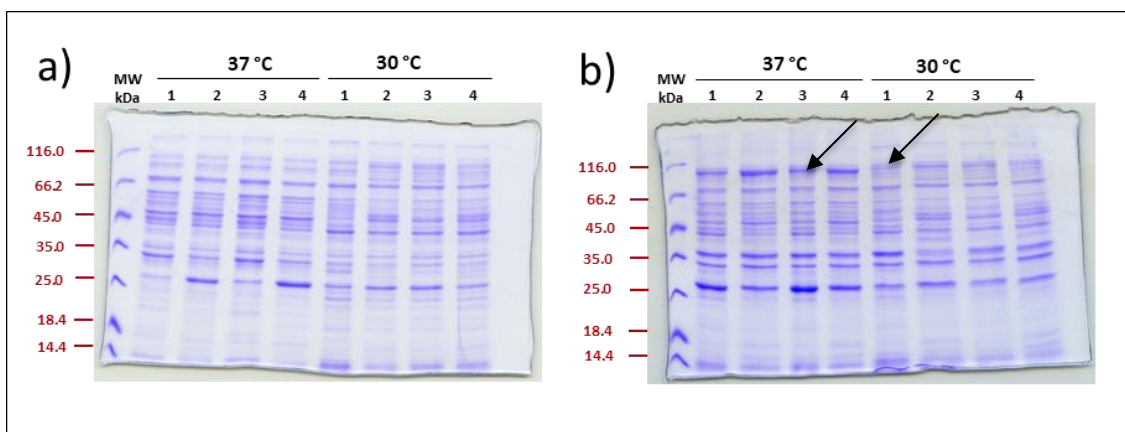
3.2. Optimizacija uvjeta detekcije proteina Cas3 metodom SDS-PAGE i Western Blot

Sva četiri soja su uzgojena do stacionarne i logaritamske faze rasta na dvije različite temperature što je detaljnije opisano u materijalima i metodama (Tablica 1). Stanicama uzgojenim do log faze uzorci su uzimani nakon 60, 120 i 180 minuta nakon dodavanja

induktora L-arabinoze, dok su stanice uzgojene do stacionarne faze raste rasle cijelu noć uz induktor. Frakcije izoliranih ukupnih proteina analizirane su elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE), te su gelovi obojani bojom *Coomassie brilliant blue* (Slika 9 i 10). Vizualizacijom vrpca ukupnih proteina na Slici 9 ne uočavaju se razlike u količinama ukupnih proteina između različitih sojeva uzgojenih u istim uvjetima do logaritmaske faze rasta. U stacionarnim stanicama se uočava jača proteinska vrpca od oko 100 kDa u talogu što odgovara molekularnoj masi proteina Cas3 (Slika 10b).

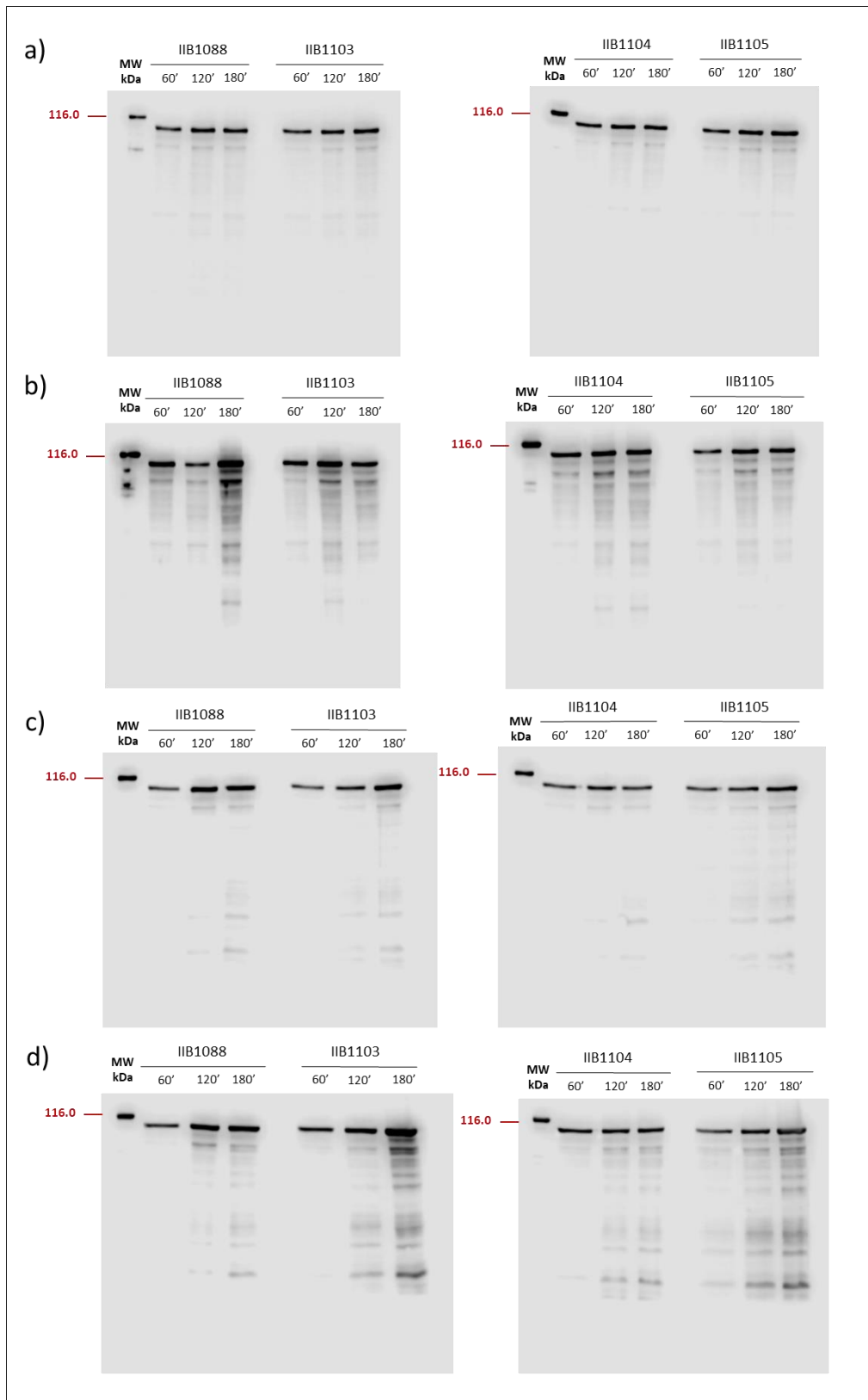


Slika 9. Analiza ukupnih staničnih proteina izoliranih iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojenih do logaritamske faze rasta na poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE) obojani bojom *Coomassie brilliant blue*: a) supernatant 30 °C; b) talog 30 °C; c) supernatant 37 °C; d) talog 37 °C.



Slika 10. Analiza ukupnih staničnih proteina iz sojeva 1 - IIB1088 (*wt*), 2 - IIB1103 (Δhns), 3 - IIB1104 ($\Delta htpG$) i 4 - IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojenih do stacionarne faze rasta na poliakrilamidnim gelovima (SDS-PAGE) obojani bojom *Coomassie brilliant blue*: a) supernatant; b) talog.

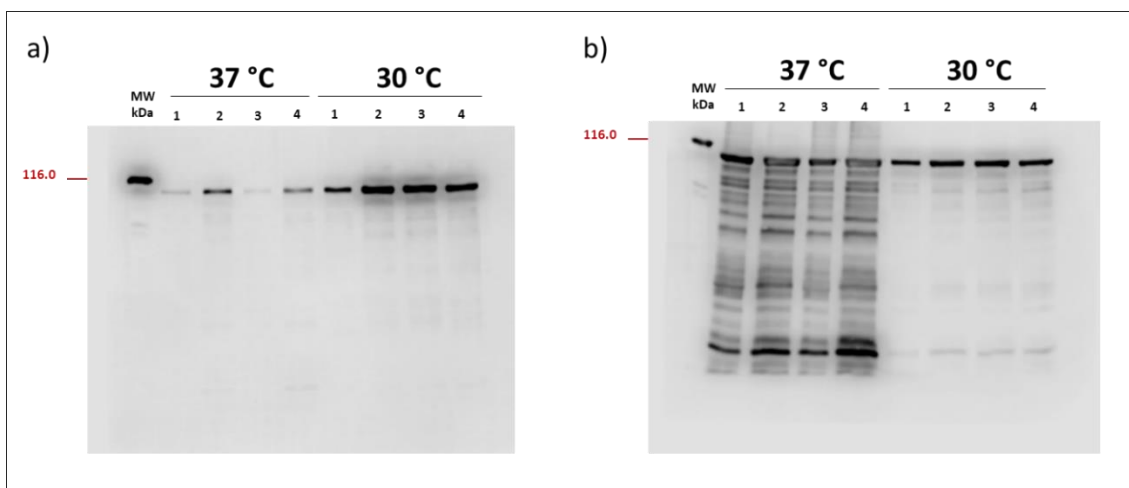
Detekcija proteina Cas3 napravljena je metodom *Western blot* pomoću anti-His antitijela koji specifično veže biljeg od šest aminokiselina histidina (His6). Vizualizacijom proteina Cas3 metodom *Western blot* vidljivo je da se količina proteina Cas3 ne mijenja kroz 3 sata nakon indukcije niti u supernatantu, niti talogu u sva 4 tipa logaritamskih stanica (sojeva) na obje temperature (Slika 11a-d). U stanicama uzgojenim na 37 °C, i naročito u talogu, vide se razne nečistoće ili razgrađeni protein Cas3. Iz prikazanih rezultata može se zaključiti da je protein Cas3 prisutan u sličnim količinama u sva 4 tipa logaritamskih stanica na obje temperature.



Slika 11. Detekcija proteina Cas3 iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojenih do logaritamske faze metodom *Western blot*: a) Supernatant 30 °C; b) Talog 30 °C; c) Supernatant 37 °C; d) Talog 37 °C.

Slično kao u frakciji taloga stanica uzgojenih do logaritamske faze, količina proteina Cas3 ne razlikuje se ovisno o temperaturi rasta u frakciji taloga različitih stacionarnih stanica (Slika 12b). Međutim, uočava se veća količina nečistoća u talogu svih stacionarnih stanica uzgojenih na 37 °C. Nasuprot tome, količine proteina Cas3 u frakciji supernatanta (Slika 12a) ukazuju na moguće razlike koje ovise o temperaturi rasta, gdje sojevi uzgojeni na nižoj temperaturi (30 °C) pokazuju jači intenzitet vrpca proteina Cas3 u odnosu na iste sojeve uzgojene na višoj temperaturi (37 °C).

Na temelju dobivenih preliminarnih rezultata (Slika 11 i 12) za daljnje istraživanje odabrani su uvjeti uzgoja stanica do stacionarne faze rasta uz dodani induktor, te analiza količine proteina Cas3 u frakciji supernatanta u ovisnosti o temperaturi rasta.



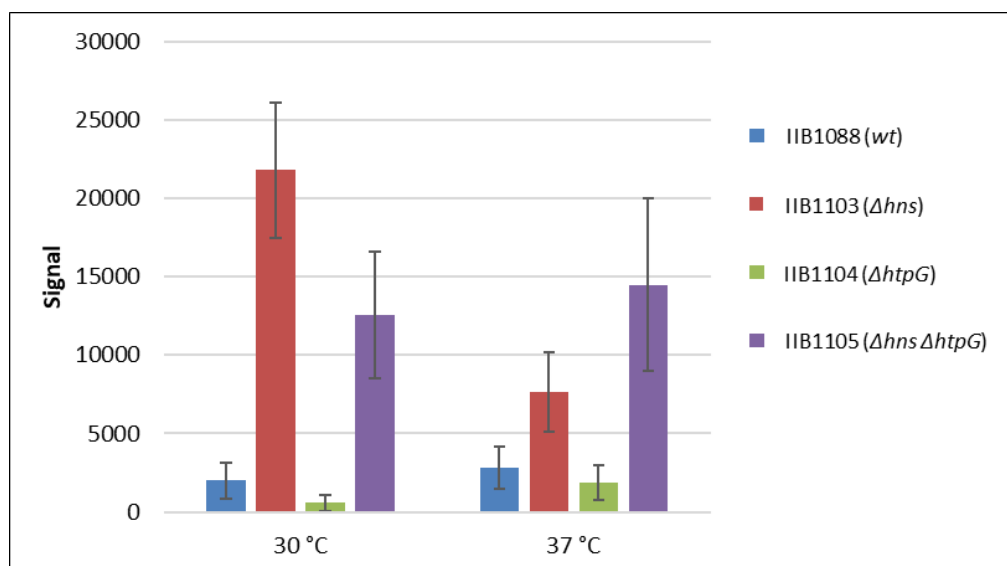
Slika 12. Detekcija proteina Cas3 iz sojeva 1 - IIB1088 (*wt*), 2 - IIB1103 (Δhns), 3 - IIB1104 ($\Delta htpG$) i 4 - IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojenih do stacionarne faze metodom *Western blot*. a) supernatant; b) talog.

3.3. Utjecaj temperature rasta na količinu proteina Cas3

Nakon što smo odredili najbolje uvjete za uzgoj stanica za analizu količina proteina Cas3, sojevi su uzgojeni na dvije različite temperature (30 °C i 37 °C) do stacionarne faze rasta (Tablica 1), izolirani su ukupni proteini te je detektirana prisutnost proteina

Cas3 u frakciji supernatanta metodom *Western blot*. Proteini Cas3 su detektirani kemiluminiscentno, a intenziteti luminiscencije (signali) na nitroceluloznoj membrani određeni su pomoću softverskog paketa Image Studio v.4.0 (Li-COR). Signali su analizirani pomoću programa Microsoft Excel te prikazani grafički.

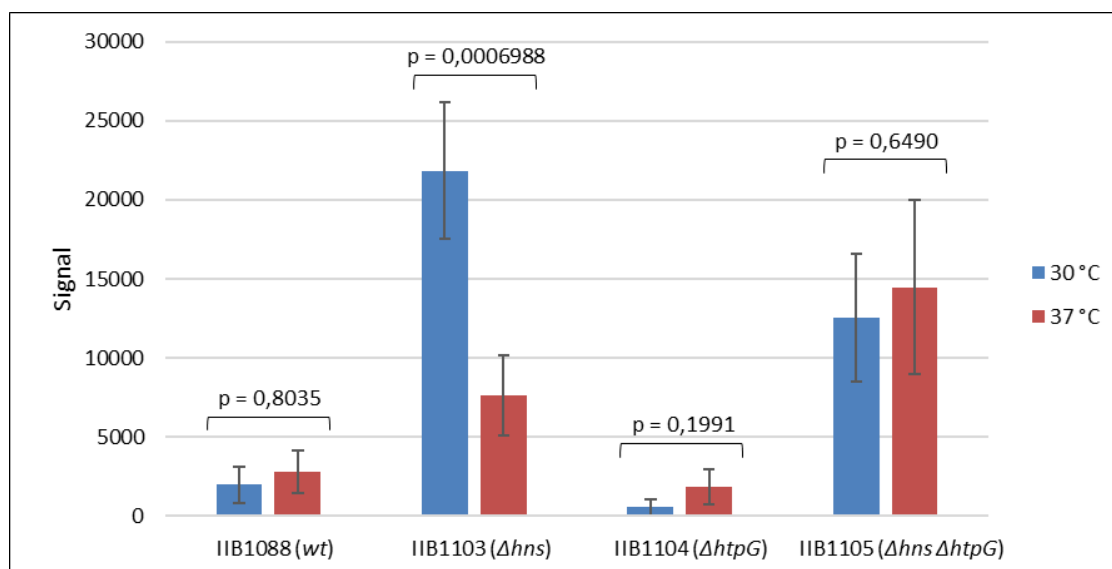
Na slici 13 može se uočiti da temperatura inkubiranja ne utječe značajno na količine proteina Cas3, već da je veći utjecaj genotipa istraživanog bakterijskog soja. U sojevima uzgojenima na 30 °C najveća količina proteina Cas3 (oko 11 puta veća u odnosu na divlji tip) izmjerena je kod soja IIB1103 (Δhns), oko 6 puta veća u soju IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$), dok je količina proteina Cas3 u soju IIB1104 ($\Delta htpG$) najmanja (oko 3 puta manja u odnosu na divlji tip).



Slika 13. Intenziteti signala kemiluminiscencije za protein Cas3 u sojevima IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) uzgojenih do stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C. Omeđenim crnim linijama su označene standardne devijacije. Prikazane su srednje vrijednosti iz četiri biološke replike.

Kod sojeva uzgojenih na 37 °C nešto veće količine proteina Cas3 (oko 3, odnosno 5 puta) izmjerene su u sojevima IIB1103 (Δhns) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$), dok su niže količine proteina Cas3 izmjerene u sojevima IIB1088 i IIB1104. Sojevi IIB1088 (*wt*) i IIB1104 ($\Delta htpG$) međusobno pokazuju sličnu količinu proteina Cas3 (Slika 13).

Uspoređujući isti soj na dvije temperature uočeno je da nema značajne razlike u količini proteina Cas3 u sojevima IIB1088, IIB1104 i IIB1105 u ovisnosti o temperaturi rasta, dok jedini soj koji pokazuje razliku u količinama proteina Cas3 je soj IIB1103 (Δhns). Soj IIB1103 uzgojen na 30 °C sadrži statistički značajno ($p < 0.05$) veću količinu proteina Cas3 u odnosu na isti soj uzgojen na 37 °C unatoč tome što je ekspresija gena *cas3* inducirana dodatkom induktora i ne ovisi o represoru H-NS. Veće količine proteina Cas3 u odnosu na divlji tip uočene su u sojevima IIB1103 i IIB1105, opet sojevima s deletiranim genom *hns* uz deletiran gen *htpG*, u odnosu na ostale (Slika 14).



Slika 14. Usporedba količine proteina Cas3 u istraživanim sojevima IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δhns), IIB1104 ($\Delta htpG$) i IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) ovisno o temperaturi rasta. Omeđenim crnim linijama su označene standardne devijacije. Provedena je statistička analiza sa razinom značajnosti od 0.05.

4. RASPRAVA

Majsec i sur. (2016.) pokazali su kako soj Δhns gubi otpornost na infekciju fagom λ ako su stanice nakon infekcije uzgajane na 37 °C, dok je otpornost bila prisutna na temperaturi rasta od 30 °C. Transkripcija gena *cas3* nije ovisila o temperaturi nego o fazi rasta te je predloženo da je osjetljivost soja Δhns na fag λ pri 37 °C vjerojatno posljedica smanjene količine proteina Cas3 i/ili njegove narušene stabilnosti.

U ovome radu odlučio sam provjeriti tu hipotezu i odrediti količine proteina Cas3 metodom *Western blot* pri uzgoju stanica pri 30 °C i 37 °C, te ulogu mutacija u genima *hns* i *htpG*, kako bi se bolje razumio razlog gubitka otpornosti pri 37 °C. U tu svrhu koristio sam sojeve bakterije *E. coli* u kojima transkripcija gena *cas3* ne ovisi o genotipu, već samo jačini inducibilnog promotora što je potvrđeno sličnom povećanom količinom transkripata *cas3* u svim istraživanim sojevima metodom qRT-PCR (Slika 8).

Izmjerene količine proteina Cas3 kod svih sojeva koji su uzgojeni do logaritamske faze rasta bile su podjednake neovisno o temperaturi rasta i analiziranoj frakciji, dok je kod sojeva uzgojenih do stacionarne faze uočena razlika u količini proteina Cas3 u frakciji supernatanta ovisno o temperaturi rasta. Kako bi se detaljnije istražila ta razlika, učinjene su četiri biološke replike iz čijih rezultata se može vidjeti da zapravo nema razlike u količini proteina Cas3 ovisno o temperaturi rasta, već razlike postoje ovisno o genotipu (Slika 13 i Slika 14).

Sojevi sa deletiranim globalnim represorom H-NS (IIB1103 i IIB1105) imali su veće količine proteina Cas3 u odnosu na ostale *hns*⁺ sojeve (IIB1088 i IIB1104) neovisno o temperaturi rasta (Slika 13 i Slika 14). U sojevima Δhns , iako je gen *cas3* pod

inducibilnim promotorom te represor H-NS nema utjecaja na njegovu transkripciju, nedostatak represora ipak nekako utječe na količinu proteina Cas3. Zanimljivo, samo se kod soja IIB1103 (Δhns) uočava statistički značajna razlika (oko 3 puta; $p < 0.05$) u količini proteina Cas3, gdje su veće količine proteina Cas3 uočene pri temperaturi od 30 °C, a manje na 37 °C što je u skladu s očekivanjima. No da bi rezultati bili pouzdaniji mogla bi se odrediti količina kontrolnog proteina čija se količina ne mijenja (engl. *loading control*). Time se sprječava utjecaj pogreške koja nastaje ukoliko nije došlo do jednolikog nanošenja proteina na gel između jažica i prijenosa istih sa gela na nitroceluloznu membranu. Iz rezultata analize ukupnih staničnih proteina metodom SDS-PAGE (Slika 9 i Slika 10) može se uočiti da su količine nanesenih proteina za istraživane sojeve slične, tako da smatram da su rezultati dobiveni metodom *Western blot* pouzdani.

Budući da je količina proteina Cas3 u stanicama Δhns 3 puta manja na 37 °C u odnosu na 30 °C, gubitak otpornosti stanica pri temperaturi od 37 °C mogla bi se objasniti nedovoljnom količinom proteina Cas3. Ovaj rezultat bi mogao objasniti nalaz da se povećanom ekspresijom proteina Cas3 s plazmida uspostavila otpornost stanica Δhns na infekciju fagom λ (Majsec i sur. 2016).

Međutim, soj IIB1105 ($\Delta hns \Delta htpG$) ne sadrži veće količine proteina Cas3 na 30 °C u odnosu na 37 °C, već je količina proteina Cas3 na obje temperature slična i veća oko 5 puta u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 13 i Slika 14). U odnosu na soj IIB1103, u soju IIB1105 dodatno je deletiran gen *htpG*. Zanimljivo, količina proteina Cas3 veća je u stanicama $\Delta hns \Delta htpG$ u odnosu na Δhns stanice na 37 °C, ali je manja u stanicama $\Delta htpG$ u odnosu na *wt* stanice na obje temperature. Za šaperon HtpG je poznato da povećava količine proteina Cas3 i utječe na aktivnost sustava CRISPR-

Cas (Yosef i sur. 2011; Majsec i sur. 2016), pa je smanjena količina proteina Cas3 u stanicama $\Delta htpG$ u skladu s literaturom. Međutim, iako stanice $\Delta hns \Delta htpG$ pokazuju više proteina Cas3 one nisu otporne na infekciju fagom (Majsec i sur. 2016). Sve navedeno ukazuje da se iz izmjerene količine proteina Cas3 ne može pouzdano zaključiti o aktivnosti sustava CRISPR-Cas (ne uočava se korelacija). Šaperon HtpG vjerojatno utječe na način da stabilizira protein Cas3. Neobjavljeni rezultati iz grupe prof. Ivančić Baće pokazuju da protein Cas3 mijenja konformaciju pri temperaturi od 35 °C pa postoji mogućnost da protein Cas3 ne može zauzeti pravilnu konformaciju bez proteina HtpG i zato gubi aktivnost.

Sumarno, dobiveni rezultati ukazuju da protein H-NS, osim što negativno regulira ekspresiju sustava CRISPR-Cas, moguće negativno regulira sustav CRISPR-Cas i na post-translacijskoj razini na način da utječe na stabilnost proteina Cas3 na, za sada, nepoznat način. U nedostatku gena *hns* dolazi do povećane transkripcije svih gena *cas* (Pul i sur. 2010; Westra i sur. 2010; Majsec i sur. 2016), a ovi rezultati pokazuju da dolazi i do promjene u količini proteina Cas3. Količina proteina Cas3 je oko 11 puta veća u stanicama Δhns u odnosu na stanice divljeg tipa na 30 °C, a povećana je i u stanicama $\Delta hns \Delta htpG$ iako transkripcija gena *cas3* nije ovisila o proteinu H-NS. Kako je protein H-NS globalni represor i utječe na ekspresiju mnogih gena, moguće je da nedostatak ovog represora aktivira transkripciju nekih drugih faktora koji povećava količine proteina Cas3. Moguće je da se primjerice poveća efikasnost translacije ili da se inhibira proteaza koja je uključena u degradaciju proteina Cas3 ili da se šaperoni vežu i štite protein Cas3 od proteaza. Ipak treba imati na umu da sojevi s kojima je provedeno istraživanje imaju inducibilan promotor, a ne nativan, pa postoji mogućnost da zbog sinteze nefizioloških količina proteina Cas3 rezultati nisu pouzdani. Kao

kontrolu mogli bi se konstruirati sojevi s nativnim promotorom i genom *cas3* obilježenim s histidinskim biljekom. Međutim, tu postoji opasnost da su količine proteina Cas3 preniske da bi se mogle detektirati metodom *Western blot*. Bit će potrebna daljnja istraživanja da se potvrdi i razjasni uloga proteina H-NS na post-translacijskoj razini, te utvrdi koju ulogu u tom procesu ima protein HtpG.

5. ZAKLJUČAK

Na temelju dobivenih rezultata možemo zaključiti sljedeće:

1. Transkripcija gena *cas3* podjednaka je u svim istraživanim sojevima i ovisi o inducibilnom promotoru pBad, odnosno dodatku induktora L-arabinoze

2. Količine proteina Cas3 su podjednake u obje frakcije u svim istraživanim sojevima uzgojenim do logaritamske faze rasta

3. Razlike u količini proteina Cas3 uočene su ovisno o genotipu soja, a ne o temperaturi rasta u frakciji supernatanta kada su sojevi uzgojeni do stacionarne faze rasta.

4. Sojevi sa deletiranim globalnim represorom transkripcije H-NS (IIB1103 i IIB1105) imaju veće količine proteina Cas3 u odnosu na druga *hns⁺* dva soja (IIB1088 i IIB1104), neovisno o temperaturi rasta.

5. Utjecaj proteina HtpG na količinu proteina Cas3 u konstruiranim sojevima na obje temperature nije sasvim jasan, no rezultati ukazuju da stabilizira protein Cas3.

6. Dobiveni rezultati ukazuju da protein H-NS negativno utječe na stabilnost proteina Cas3 na 30 °C na post-translacijskoj razini na nepoznat način.

6. Literatura

Amitai G., Sorek R. (2016): CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* **14**: 67–76.

Bardwell J.C.A. (1987): Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 5177–5181.

Bradford M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248–254.

Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Rik J.H., Snijders A.P.L., Dickman M.J., Makarova K.S., Eugene V. (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science*. **321**: 960–964.

Dorman C.J., Deighan P. (2003): Regulation of gene expression by histone-like proteins in bacteria. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **13**: 179–184.

Fang F.C., Rimsky S. (2008): New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr. Opin. Microbiol.* **11**: 113–120.

Gasiunas G., Sinkunas T., Siksnyš V. (2014): Molecular mechanisms of CRISPR-mediated microbial immunity. *Cell. Mol. Life Sci.* **71**: 449–465.

Hochstrasser M.L., Taylor D.W., Bhat P., Guegler C.K., Sternberg S.H., Nogales E., Doudna J.A. (2014): CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 6618–6623.

Huo Y., Nam K.H., Ding F., Lee H., Wu L., Xiao Y., Farchione M.D., Zhou S., Rajashankar K., Kurinov I., Zhang R., Ke A. (2014): Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**: 771–7.

Jackson S.A., McKenzie R.E., Fagerlund R.D., Kieper S.N., Fineran P.C., Brouns S.J.J. (2017): CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science*. **356**: eaal5056.

Koonin E. V., Makarova K.S., Zhang F. (2017): Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems. *Curr. Opin. Microbiol.* **37**: 67–78.

Künne T., Kieper S.N., Bannenberg J.W., Vogel A.I.M., Mielliet W.R., Klein M., Depken M., Suarez-Diez M., Brouns S.J.J. (2016): Cas3-derived target DNA degradation fragments fuel primed CRISPR adaptation. *Mol. Cell* **63**: 852–864.

Loeff L., Brouns S.J.J., Joo C. (2018): Repetitive DNA reeling by the Cascade-Cas3 complex in nucleotide unwinding steps. *Mol. Cell* **70**: 385-394.e3.

Majsec K., Bolt E.L., Ivančić-Baće I. (2016): Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS. *BMC Microbiol.* **16**: 28.

Makarova K.S., Wolf Y.I., Alkhnbashi O.S., Costa F., Shah S.A., Saunders S.J., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Haft D.H., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Terns R.M., Terns M.P., White M.F., Yakunin A.F., Garrett R.A., Oost J. van der, Backofen R., Koonin E. V. (2015): An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**: 722–736.

Mulepati S., Bailey S. (2011): Structural and biochemical analysis of nuclease domain of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 3 (Cas3). *J. Biol. Chem.* **286**: 31896–31903.

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.

Plagens A., Richter H., Charpentier E., Randau L. (2015): DNA and RNA interference mechanisms by CRISPR-Cas surveillance complexes. *FEMS Microbiol. Rev.* **39**: 442–463.

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.

Pul Ü., Wurm R., Arslan Z., Geißen R., Hofmann N., Wagner R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* **75**: 18.

Rutkauskas M., Sinkunas T., Songailiene I., Tikhomirova M.S., Siksnys V., Seidel R. (2015): Directional R-loop formation by the CRISPR-cas surveillance complex cascade provides efficient off-target site rejection. *Cell Rep.* **10**: 1534–1543.

Semenova E., Jore M.M., Datsenko K.A., Semenova A., Westra E.R., Wanner B., Oost J. van der, Brouns S.J.J., Severinov K. (2011): Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**: 10098–10103.

Sinkunas T., Gasiunas G., Fremaux C., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2011): Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J.* **30**: 1335–1342.

Suttle C.A. (2007): Marine viruses - Major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 801–812.

Westra E.R., Erp P.B.G. van, Künne T., Wong S.P., Staals R.H.J., Seegers C.L.C., Bollen S., Jore M.M., Semenova E., Severinov K., Vos W.M. de, Dame R.T., Vries R. de, Brouns S.J.J., Oost J. van der (2012): CRISPR immunity relies on the consecutive binding and degradation of negatively supercoiled invader DNA by cascade and Cas3. *Mol. Cell* **46**: 595–605.

Westra E.R., Pul Ümit, Heidrich N., Jore M.M., Lundgren M., Stratmann T., Wurm R., Raine A., Mescher M., Heereveld L. Van, Mastop M., Wagner E.G.H., Schnetz K., Oost J. Van Der, Wagner R., Brouns S.J.J. (2010): H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in

Escherichia coli K12 can be relieved by the transcription activator LeuO. Mol. Microbiol. **77**: 14.

Westra E.R., Semenova E., Datsenko K.A., Jackson R.N., Wiedenheft B., Severinov K., Brouns S.J.J. (2013): Type I-E CRISPR-Cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. PLoS Genet. **9**

Xiao Y., Luo M., Dolan A.E., Liao M., Ke A. (2018): Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3. Science. **361**

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. **108**: 20136–20141.

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.

CURRICULUM VITAE

Edukacija

2019. Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet, Biološki odsjek, smjer prof. biologije
2003. Geodetski tehničar, Tehnička škola, Pula

Vještine

- Jezici: hrvatski – materinski jezik
sposobnost komunikacije (govor, čitanje, pisanje) na engleskom i talijanskom jeziku
- Rad na računalu:
Softverski paket Office 365 - Word, Excel, Powerpoint
Programi - Image Studio v.4.0., AutoCAD, CorelDRAW

Dodatne informacije

- siječanj - rujan 2019. Zavod za javno zdravstvo Istarske županije - sezonski rad
- kolovoz - listopad 2017. Aquarium Pula - sezonski rad
- srpanj 2016. - veljača 2017. Izrada diplomskog rada
Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovni-matematički fakultet, Zavod za molekularnu biologiju
Tema: Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δ hns i Δ htpG bakterije Escherichia coli u različitim uvjetima rasta
Mentorice: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće i doc. dr. sc. Petra Peharec Štefanić