# Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 i zaštitu od infekcije fagom lambda u ovisnosti o temperaturi u bakteriji Escherichia coli

**Pravica, Mihaela**

**Master's thesis / Diplomski rad**

**2020**

*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://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:474070

*Rights / Prava:* In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-04-23**

*Repository / Repozitorij:*

Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mihaela Pravica

# Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 i zaštitu od infekcije fagom lambda u ovisnosti o temperaturi u bakteriji *Escherichia coli*

Diplomski rad

Zagreb, 2020.

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. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

Zahvaljujem se svojoj mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na strpljenju, pomoći i savjetima u izradi ovog diplomskog rada.

Nadalje, zahvaljujem se djelatnicima Zavoda za molekularnu biologiju, ponajviše asistentima, što su mi pružili podršku i pomoć te osigurali ugodno okruženje tijekom laboratorijskog rada.

Posebno se zahvaljujem mag. biol. mol. Damjanu Mitiću na velikoj pomoći, stručnim savjetima te strpljenju i uloženom vremenu u nastajanju ovoga rada.

Zahvaljujem se svim mojim kolegama i prijateljima s fakulteta što su uljepšali moje studentske dane, čineći dugotrajne pauze među predavanjima, predispitno vrijeme i terene lakšim i zabavnijim. Zahvaljujem se kolegama s projekta i ostalih aktivnosti na beskrajnim idejama, kreativnosti i predanosti stvaranju nečeg novog.

Hvala od srca mojim dragim prijateljicama na razumijevanju, nezaboravnim trenucima, putovanjima, smijehu i ohrabrujućim riječima u teškim trenucima.

Zahvaljujem se svojim bližnjima što su mi uvijek pružili neizmjernu podršku, razumijevanje i ljubav kako tijekom čitavog školovanja, tako i tijekom izrade ovog diplomskog rada.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2016-06-8861 pod nazivom „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

## Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 i zaštitu od infekcije fagom lambda u ovisnosti o temperaturi u bakteriji *Escherichia coli*

Mihaela Pravica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas je važan mehanizam obrane mnogih prokariota od infekcije stranom DNA poput faga i plazmida. Sastoji se od lokusa CRISPR koji sadrži ponavljajuće palindromske sekvence DNA odvojene razmaknicama koje potječu od strane DNA faga ili plazmida te gena *cas* čijom ekspresijom nastaju proteini koji sudjeluju u obrani od infekcije. U bakteriji *Escherichia coli* efikasnost zaštite bakterija od faga sustavom CRISPR-Cas ovisi o aktivnosti proteina Cas3 koja pak ovisi o temperaturi inkubiranja i šaperonu HtpG. U ovom radu je istraživano utječe li šaperon HtpG na količinu ili konformaciju proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi. Utjecaj suviška proteina HtpG na količinu proteina Cas3 određen je metodom *Western-blot*, a utjecaj na konformaciju proteina Cas3 određen je mjerenjem efikasnosti zaštite određenih točkastih mutanata *cas3* od infekcije fagom λ. Dobiveni rezultati ukazuju da šaperon HtpG povećava količinu proteina Cas3 te da potiče smatanje točkastih mutanata Cas3, ali samo na 30 °C.

(44 stranica, 12 slika, 14 tablica, 58 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, Cas3, temperatura, fag lambda, HtpG

Voditeljica: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof

Ocjenitelji: dr. sc. Ivana Ivančić Baće, izv. prof
dr. sc. Mirela Sertić Perić, doc.
dr. sc. Draginja Mrvoš-Sermek, izv. prof.
Zamjena: dr. sc. Iva Juranović Cindrić, prof.

Rad prihvaćen: 29. listopada 2020.

# BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb

Faculty of Science

Department of Biology

Graduation Thesis

## The effect of HtpG chaperone on Cas3 protein levels and protection against phage lambda infection depending on the temperature in *Escherichia coli*

Mihaela Pravica

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

For many prokaryotes, the CRISPR-Cas system is an important defense mechanism against foreign DNA infections, such as phages or plasmids. It is composed of the locus CRISPR, which consists of short palindromic DNA sequences separated by spacers derived from foreign DNA phages or plasmids, and *cas* genes whose expression produces Cas proteins that participate in the defense against infection. In bacteria *Escherichia coli* the efficiency of protection of the bacteria against phages by the CRISPR-Cas system depends on the activity of the Cas3 protein, which depends on the incubation temperature and HtpG chaperone. In this work, we investigated whether the HtpG chaperone influences the amount or conformation of the Cas3 protein as a function of temperature. The influence of elevated HtpG levels on the amounts of the Cas3 protein is determined using the Western blot method, and the influence on the conformation of the Cas3 protein is determined by measuring the efficiency of protection of specific *cas3* point mutants against infection with the λ phage. The results suggest that the HtpG chaperone increases the amounts of Cas3 protein and induces the folding of Cas3 point mutants, but only at 30 °C.

(44 pages, 12 figures, 14 tables, 58 references, original in: Croatian)

Thesis deposited in the Central Biological Library.

Key words: CRISPR-Cas, Cas3, temperature, phage lambda, HtpG

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.

Reviewers: Dr. Ivana Ivančić Baće, Assoc. Prof.
Dr. Mirela Sertić Perić, Asst. Prof.
Dr. Draginja Mrvoš-Sermek, Assoc. Prof.
Substitution: Dr. Iva Juranović Cindrić, Prof.

Thesis accepted: October 29, 2020

**SADRŽAJ**

1. UVOD ..... 1
1.1. Sustav CRISPR-Cas ..... 1
1.2. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas ..... 2
1.3. Mehanizam obrane adaptivnog imunosnog sustava CRISPR-Cas ..... 5
1.4. Sustav CRISPR-Cas tipa I-E ..... 6
1.5. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E ..... 9
1.5.1. H-NS ..... 10
1.5.2. HtpG ..... 10
1.6. Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja ..... 10

2. MATERIJALI I METODE ..... 12
2.1. Materijali ..... 12
2.1.1. Sojevi ..... 12
2.1.2. Plazmidi ..... 13
2.1.3. Hranidbene podloge ..... 13
2.1.4. Komercijalni kompleti ..... 14
2.1.5. Proteinski markeri ..... 14
2.1.6. Boje ..... 15
2.1.7. Antitijela ..... 15
2.1.8. Otopine ..... 16
2.2. Metode ..... 18
2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva ..... 18
2.2.2. Priprema kemijski kompetentnih bakterija i transformacija bakterijskih sojeva plazmidima ..... 18
2.2.3. Izolacija proteina ..... 19
2.2.4. Određivanje koncentracije proteina ..... 19
2.2.5. Elektroforeza u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata (SDS-PAGE) ..... 20
2.2.6. Metoda mokrog prijenosa proteina na nitrocelulozu membranu (Western blot) ..... 21
2.2.7. Određivanje broja plakova faga lambda pri različitim temperaturama inkubacije ..... 22

3. REZULTATI ..... 24
3.1. Utjecaj šaperona HtpG na količinu proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi inkubiranja ..... 24
3.2. Utjecaj šaperona HtpG na aktivnost proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vivo* ..... 29

4. RASPRAVA ..... 34

5. ZAKLJUČAK ..... 37

6. LITERATURA ..... 38

**POPIS KRATICA**

| | |
|---|---|
| CRISPR | od eng. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats* |
| Cas | od eng. *CRISPR-associated genes* |
| crRNA | CRISPR RNA |
| PAM | od eng. *protospacer adjacent motif* |
| Cascade | od eng. *CRISPR-associated complex for antiviral defence* |
| tracrRNA | od eng. *trans-activating CRISPR RNA* |
| HEPN | od eng. *higher eukarytoes and prokaryotes nucleotide-binding domain* |
| ATP | adenozin trifosfat |
| SF2 | od eng. *Superfamily 2* |
| CTD | C-terminalna domena |
| LB | od eng. *Luria broth* |
| PCR | od eng. *polymerase chain reaction* |
| SDS | natrijev dodecilsulfat |
| PAGE | elektroforeza u poliakrilamidnom gelu |
| $dH_2O$ | destilirana voda |
| Tris | 2-amino-2-hidroksimetil-propan-1,3-diol |
| AA/Bis | akrilamid/bisakrilamid |
| APS | amonijev persulfat |
| TEMED | tetrametiletilendiamin |
| CBB | od eng. *Commassie brilliant blue* |
| NCBI | od eng. *National Center for Biotechnology Information database* |
| PFU | od eng. *plaque-forming units* |
| Trp | triptofan |
| H-NS | od engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein* |
| HtpG | od engl. *high-temperature protein G* |

| | |
|---|---|
| BSA | od engl. *bovine serum albumin* |
| GAPDH | gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza |
| PMSF | fenilmetilsulfonil fluorid |
| IPTG | Izopropil-β-D-1-tiogalaktopiranozid |
| PBS | fosfat puferirana fiziološka otopina (od engl. *phosphate-buffered saline*) |
| PFS | engl. *protospacer flanking site* |

# 1. UVOD

## 1.1. Sustav CRISPR-Cas

Sustav CRISPR-Cas, poznat kao sustav stečene odnosno adaptivne imunosti, predstavlja važan mehanizam obrane prokariota od infekcije stranom DNA kao što su fagi i plazmidi. Ovaj sustav sastoji se od lokusa CRISPR (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) i gena *cas* (od eng. *CRISPR-associated*), čijom ekspresijom nastaju proteini Cas odgovorni za obrambeni mehanizam bakterija.

Lokus CRISPR identificirali su Ishino i suradnici 1987. godine prilikom istraživanja u kojemu su analizirali sekvencu kromosomske DNA koja sadrži gen *iap* kako bi razjasnili njegovu ulogu u konverziji izozima alkalne fosfataze u *E. coli*. Nizvodno od gena *iap* zamijetili su pet homolognih sekvenci od 29 ponavljajućih nukleotida razdvojenih neponavljajućim kratkim sekvencama (razmaknicama) od 32 nukleotida (Ishino i sur. 1987). Naziv CRISPR koji opisuje strukturu navedenog lokusa usuglasili su 2002. godine Jansen i suradnici, a niz gena u neposrednoj blizini lokusa čijom ekspresijom nastaju proteini važni u koracima obrane nazvali su geni *cas* (Jansen i sur. 2002). Analizom sekvenci razmaknica lokusa CRISPR otkriveno je da su razmaknice homologne sekvencama strane DNA bakteriofaga i plazmida, od kojih vjerojatno i potječu, što je upućivalo na njihovu ulogu u imunosnom sustavu prokariota (Mojica i sur. 2005). Uloga sustava CRISPR-Cas kao sustava adaptivne imunosti u obrani od infekcije fagom otkrivena je u bakteriji *Streptococcus thermophilus* prilikom čega je primijećeno da dolazi do ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR nakon infekcije, a koje potječu iz faga, čime se pruža dodatna otpornost na invaziju fagom (Barrangou i sur. 2007). Lokus CRISPR se sastoji od svega dvije do 250 ponavljajućih palindromskih sekvenci DNA (engl. *repeats*), veličine između 25 i 70 parova baza, razdvojeni razmaknicama (engl. *spacers*) slične veličine. Uzvodno od lokusa CRISPR nalaze se vodeće sekvence koje se sastoje od nukleotida adenina i timina te sadrže promotor koji sudjeluje u transkripciji lokusa (Pougach i sur. 2010). Ekspresijom gena *cas* koji se nalaze uzvodno i nizvodno od lokusa CRISPR nastaju proteini Cas, koji su odgovorni za pojedine korake u obrani bakterija (Marraffini i Sontheimer 2010).

### 1.2. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas

Slično drugim biološkim obrambenim mehanizmima, arhealni i bakterijski sustav CRISPR-Cas pokazuje značajnu raznolikost u sekvencama proteina Cas, u sastavu i dužini gena te lokusu (Makarova i sur. 2020). Ubrzana evolucija većine gena *cas* i značajna varijabilnost u lokusu CRISPR predstavlja veliki izazov u konzistentnoj klasifikaciji sustava CRISPR-Cas i proteina Cas (Makarova i sur. 2011). Haft i suradnici svrstali su proteine Cas u 45 porodica te osam podtipova, a svaki podtip nazvan je prema vrsti u kojoj se javlja (Haft i sur. 2005). Prema novijoj klasifikaciji razlikuju se dva razreda, šest tipova te 33 podtipova sustava CRISPR – Cas (Makarova i sur. 2020). Primijenjen je pristup klasifikaciji u dva koraka prilikom čega se prvo identificiraju svi geni *cas* u svakom lokusu CRISPR-Cas, a potom determiniraju jedinstveni geni za pojedine lokuse koji omogućuju podjelu prema tipovima i podtipovima (Makarova i sur. 2015). Prema navedenoj klasifikaciji, razredu 1 pripadaju sustavi CRISPR-Cas (tipovi I, III i IV) koji posjeduju efektorski kompleks koji se sastoji od više proteina Cas, od kojih neki tvore kompleks s crRNA (kao što je kompleks Cascade u tipu I) te posredovanjem dodatnih Cas proteina sudjeluju u procesiraju pre-crRNA i interferenciji (Makarova i sur. 2020). U razred 2 svrstavaju se sustavi (tipovi II, V) kod kojih sve funkcije efektorskog kompleksa obavlja jedan protein, kao što je Cas9 u tipu II sustava (Makarova i sur. 2015). Daljnjom analizom sustava CRISPR-Cas identificirani su novi podtipovi sustava CRISPR-Cas tipa V te novi tip sustava CRISPR-Cas – tip VI koji pripada razredu 2 i posjeduje tri dodatna podtipa (Koonin i sur. 2017; Yan i sur. 2019). Navedeni tipovi razlikuju se prema pojedinim proteinima (Cas3 u tipu I, Cas9 u tipu II i Cas10 u tipu III, Csf1 (velika podjedinica nalik Cas8) u tipu IV, Cas12 u tipu V i Cas13 u tipu VI (Makarova i sur. 2018) te mehanizmu procesiranja CRISPR transkripata i interferencije (Makarova i sur. 2011).

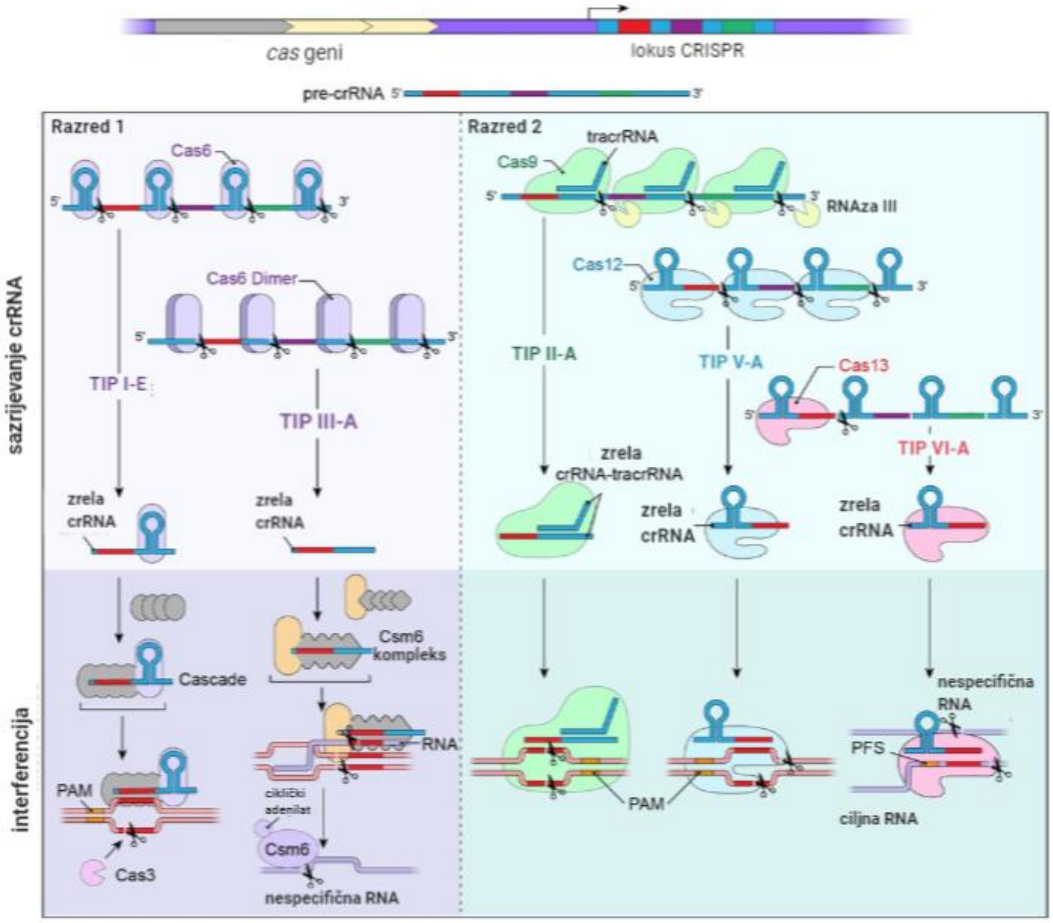
U većini sustava CRISPR-Cas prisutni su proteini Cas1 i Cas2 koji sudjeluju u fazi adaptacije i imaju ključnu ulogu u inserciji razmaknica u lokus CRISPR (Makarova i sur. 2015), uz moguću dodatnu uključenost restrikcijske endonukleaze Cas4 (Hooton i sur. 2014) ili kod tipa II CRISPR-Cas sustava proteina Cas9 (Heler i sur. 2015). U fazi ekspresije i interferencije posreduje kompleks koji se sastoji od više proteinskih podjedinica ili pojedinačnog velikog proteina (npr. Cas9) i crRNA koji vežu pre-crRNA koja se potom procesira u zrelu crRNA u koraku kataliziranom RNA endonukleazom (kod tipa I i III to je Cas6) ili u koraku koji uključuje RNazu III i tracrRNA (od engl. *trans-activating CRISPR RNA*) (tip II) (Deltcheva i sur. 2011), kao što je prikazano na **Slici 1.** U fazi interferencije crRNA efektorski kompleks (u tipu I i III sustava) ili Cas9 (u tipu II) kombinira nukleaznu aktivnost sa specifičnim vezanjem

RNA. Vezanje ciljne DNA temelji se na komplementarnosti s razmaknicom crRNA (Makarova i sur. 2015). Cijepanje strane DNA kataliziranо je HD nukleaznom domenom Cas3 u sustavu tipa I, kombinirana je aktivnost Cas7 i Cas10 koji čine Csm kompleks kod tipa III ili Cas9 kod sustava tipa II (Jinek i sur. 2012)., kao što je prikazano na **Slici 1.**

Tipovi I, III i IV sustava CRISPR-Cas koji pripadaju razredu 1 posjeduju jedinstveni gen *cas3* ili njegovu varijantu *cas3'* koji kodira za protein Cas3 (Hsu i sur. 2014, Makarova i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa I podijeljeni su na sedam podtipova, od I-A do I-F i I-U koji se razlikuju prema organizaciji operona (Makarova i sur. 2015). Transkripcijom lokusa CRISPR nastaju pre-crRNA koje se procesiraju djelovanjem ribonukleaze Cas6 u kratke zrele crRNA (**Slika 1.**). Zrela crRNA pomoću proteina Cascade (od eng. *CRISPR-associated complex for antiviral defence*) formira kompleks koji prepoznaje te veže komplementarnu stranu DNA. Ulogu u inaktivaciji strane DNA u zadnjem koraku obrane ima protein Cas3 (osim kod podtipova I-F i I-B) koji sadrži helikazne i nukleazne domene (Hsu i sur. 2014; Makarova i sur. 2015). Sustavi CRISPR-Cas tipa III sadrže gen *cas10*, čijom ekspresijom nastaje protein koji čini najveću podjedinicu kompleksa crRNA i efektorskih proteina tipa III te je često fuzioniran za HD nukleaznu domenu (koja se razlikuje od nukleazne domene sustava CRISPR-Cas tipa I), osim kod podtipa III-D koji je nema (Makarova i sur. 2006). Lokus tipa III kodira za malu podjedinicu koja je specifična za svaki podtip, Cas5 i nekoliko podjedinica proteina Cas7 (Makarova i sur. 2015). Podijeljeni su u šest podtipova (od III-A do III-F), a razlikuju se po tome sadrže li kao malu podjedinicu protein Csm2 (Cas11) (III-A, III-D, III-E), Cmr5 (III-B i III-C) ili posjeduju samo jedan protein nalik Cas7 (III-F). Podtip III-A posjeduje i gene *cas1*, *cas2* i *cas6*, dok kod većine lokusa III-B nedostaju (Makarova i sur. 2015). Navedeni podtipovi mogu cijepati stranu DNA ili RNA (Samai i sur. 2015). Slično većini lokusa podtipa III-B, tipu IV sustava CRISPR-Cas nedostaju geni *cas1* i *cas2*. Ovaj tip sustava kodira za efektorski kompleks koji se sastoji od crRNA i djelomično degradirane velike podjedinice Csf1, Cas5 i Cas7 te u nekim slučajevima manje podjedinice, dok *csf1* služi kao jedinstveni gen za raspoznavanje ovoga tipa sustava (Makarova i sur. 2011).

Razredu 2 sustava CRISPR-Cas pripadaju tipovi II, V i VI te posjeduju kompleks crRNA i pojedinačni efektorski protein. Tip II sustava CRISPR-Cas, za razliku od tipa I i III, ima puno manji broj gena. Specifični gen za tip II je *cas9*, koji kodira za protein koji se sastoji od više domena i koji sudjeluje cijepanju DNA te fazi adaptacije. Svi CRISPR-Cas lokusi tipa II sadrže i gene *cas1* i *cas2*, a većina lokusa kodira i tracrRNA koja je djelomično komplementarna ponavljajućim sekvencama koje se nalaze u lokusu CRISPR (Makarova i sur. 2015). tracrRNA se veže na ponavljajuće komplementarne sekvence u transkriptu pre-crRNA, stvarajući hibrid

kojeg stabilizira Cas9, a zatim ih RNaza III cijepa i obrađuje. Hibrid zrele crRNA i tracrRNA usmjerava protein Cas9 do ciljne DNA (**Slika 1.**). Cas9 je protein koji se sastoji od nukleazne domene HNH u sredini proteina koja cijepa lanac DNA komplementaran sekvenci razmaknice u crRNA i N-terminalne nukleazne domene RuvC koja cijepa lanac nasuprot komplementarnog lanca (Deltcheva i sur. 2011), što rezultira dvolančanim cijepanjem ciljne DNA (Garneau i sur. 2010). Razvojem strukture koja kombinira tracrRNA i crRNA u jednu molekulu, tzv. single-guide RNA koja zajedno s Cas9 čini kompleks koji uspješno cijepa ciljnu DNA, došlo je i do primjene sustava tipa II u svrhe genetičkog inženjerstva (Jinek i sur. 2012). Kod tipa II-A protein Csn2 je uključen u fazu adaptacije (Makarova i sur. 2019). Za razliku od tipa II, kod tipa V efektori Cas12a, Cas12b i Cas12c sadrže samo RuvC domenu koja cijepa oba lanca strane DNA (Makarova i sur. 2019), dok Cas12a ne treba dodatnu tracrRNA za cijepanje stranog genoma (Shmakov i sur. 2010) (prikazano na **Slici 1.**). Sustavima CRISPR-Cas tipa VI također nije potrebna tracrRNA. Podijeljeni su u tri podtipa, VI-A, VI-C i dvije varijante VI-B. Efektori tipa VI (Cas13) sadrže dvije HEPN (od eng. *higher eukarytoes and prokaryotes nucleotide-binding domain*) domene kojim kompleks Cas13:crRNA cijepa ciljnu RNA (Anantharaman i sur. 2013) nakon vezanja na ciljna mjesta s motivima PFS (eng. *protospacer flanking site*) (Abudayyeh i sur. 2016). Cas13 ima dvojaku ribonukleaznu aktivnost: omogućava procesiranje pre-crRNA te cijepanje strane RNA (Abudayyeh i sur. 2017), te vjerojatno cilja virusnu DNA cijepanjem virusnih transkripata, a zatim inducira mirovanje bakterije potaknuto infekcijom virusa (Meeske i sur. 2019) ili kao finalni odgovor programiranu staničnu smrt (Koonin i Zhang 2017).




**Slika 1.** Tipovi sustava CRISPR-Cas (preuzeto i prilagođeno prema: Strich i sur. 2019). Dva su razreda sustava CRISPR-Cas: razred 1 kojemu pripadaju tipovi I, III i IV te razred 2 kojemu pripadaju tipovi II, V i VI. Navedeni tipovi razlikuju se prema načinu stvaranja crRNA i efektorskim proteinima. Svakome tipu je karakterističan određeni protein: tipu I Cas3, tipu III Cas 10, tipu IV Cas Csf1, tipu II Cas9, tipu V Cas12, a tipu VI Cas13.

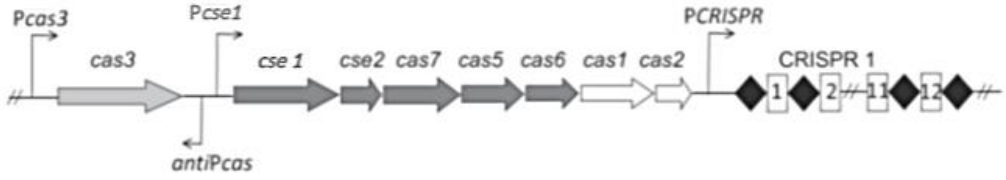
### 1.3. Mehanizam obrane adaptivnim imunosnim sustavom CRISPR-Cas

Mehanizam imunosnog odgovora posredovanog sustavom CRISPR-Cas odvija se u tri glavne faze. Tijekom prve faze, koja se naziva adaptacija, nakon infekcije fagom bakterija integrira fragmente strane DNA u lokus CRISPR kao novu razmaknicu, što rezultira otpornošću na strane genetske elemente koji posjeduju tu sekvencu (Barrangou i sur. 2007; Horvath i sur. 2008). Kompleks proteina Cas veže se na ciljnu DNA, često nakon prepoznavanja kratke sekvence PAM (od eng. *protospacer adjacent motif*), a potom izrezuje sekvence strane DNA koje se nazivaju protorazmaknice (eng. *protospacer*). Kratka sekvenca PAM ne ugrađuje se u lokus CRISPR što omogućuje bakteriji razlikovanje strane od vlastite DNA (Mojica i sur. 2009). Protorazmaknica se procesira i kompleks ju ugrađuje u lokus CRISPR kao razmaknicu (eng. *spacer*) (Makarova i sur. 2019). Tijekom faze ekspresije, lokus CRISPR je obično

prepisan kao pojedinačni dugački transkript pre-crRNA, koji se zatim procesira u zrele kratke crRNA od kojih svaka sadrži sekvencu razmaknice. Tijekom faze interferencije crRNA ostaje vezana za proteinski kompleks i služi kao smjernica u prepoznavanju sekvenci protorazmaknice u invadirajućem genomu virusa ili plazmida koji se potom cijepa i inaktivira posredstvom Cas nukleaza koje su ili dio efektorskog kompleksa, ili proteina koji se aktiviraju tijekom faze interferencije (Makarova i sur. 2015).

### 1.4. Sustav CRISPR-Cas tipa I-E

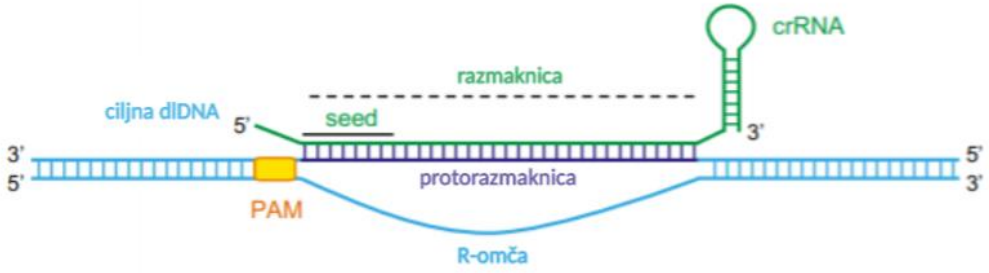
CRISPR-Cas sustav tipa I-E u bakteriji *Escherichia coli* K12 sastoji se od osam gen *cas*: *cas3, casA (cse1), casB (cse2), casC (cas7), casD (cas5), casE (cas6e), cas1, cas2* i nizvodno smještenog lokusa CRISPR-1, a prisutan je i lokus CRISPR-2.




**Slika 2.** Građa sustava CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *Escherichia coli* K12 (preuzeto i prilagođeno prema: Mitić i sur. 2020).

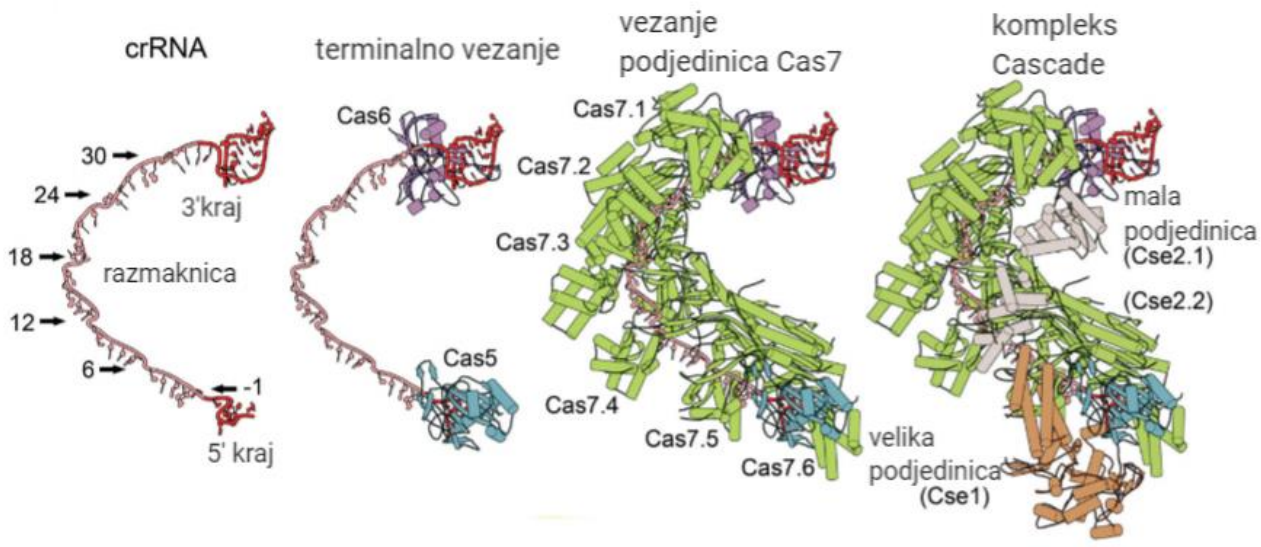
Pet gena *cas* (*casA-E*) kodira za proteinske podjedinice koje zajedno s crRNA tvore kompleks Cascade (Brouns i sur. 2008). Kompleks Cascade tipa I-E sastoji se od jedne crRNA od 61 nukleotida i 11 podjedinica Cas proteina ($(Cse1)_1$-$(Cse2)_2$-$(Cas5)_1$-$(Cas7)_6$-$(Cas6e)_1$), a njegova ukupna masa iznosi 405 kDa (Brouns i sur. 2008; Jore i sur. 2011). Cascade prepoznaje DNA kao stranu ako sadrži sekvencu komplementarnu crRNA (razmaknici) i sekvencu PAM (Semenova i sur. 2011; Mojica i sur. 2009; Goren i sur. 2012). Lokus CRISPR ne sadrži PAM sekvencu i na taj način je zaštićen od djelovanja kompleksa Cascade (Semenova i sur. 2011; Mojica i sur. 2009). Kada se kompleks Cascade veže na stranu DNA, podjedinica proteina CasA (Cse1) prepoznaje sekvencu PAM (Sashital i sur. 2012; Mulepati i sur. 2012). Potom slijedi sparivanje crRNA i komplementarne protorazmaknice ciljnog lanca DNA, što uzrokuje stvaranje R-omče, a istiskuje se lanac koji nije komplementaran crRNA (Jore i sur. 2011). Sparivanje započinje unutar sekvence razmaknice od 8 nukleotida (*seed* sekvenca) u

neposrednoj blizini PAM sekvence, a potom u cijeloj protorazmaknici (Semenova i sur. 2011; Sashital i sur. 2012), kao što je prikazano na **Slici 3**.




**Slika 3.** Prikaz komplementarnog sparivanja razmaknice crRNA i protorazmaknice ciljne DNA prilikom čega nastaje R-omča (preuzeto i prilagođeno prema: Hochstrasser i sur. 2014).

Nakon transkripcije lokusa CRISPR nastaje zrela crRNA specifičnim cijepanjem pomoću endoribonukleaze Cas6e unutar ponavljajućih sekvenci transkripta pre-crRNA (Gesner i sur 2011; Sashital, Jinek i Doudna 2011). Protein Cas6e ostaje vezan na 3' kraj strukture omče zrele crRNA i nakon cijepanja (Jackson i sur. 2014). Kompleks Cascade se potom zajedno s proteinom Cas5 (CasD) veže na 5' kraj crRNA i 6 podjedinica proteina Cas7 (CasC) veže se na svaku šestu poziciju u sekvenci razmaknice (Brouns i sur. 2008; Jore i sur. 2011), kao što je prikazano na **Slici 4**. Uz proteine Cas7, Cas6e je povezan na trup kompleksa Cascade interakcijama s proteinom Cse2 (Jackson i sur. 2014). Dva dodatna proteina Cse1 (CasA) i dimer Cse2 (CasB) predstavljaju veliku i malu podjedinicu Cascade (Brouns i sur. 2008). Obje podjedinice uključene su u vezanje kompleksa na stranu DNA, dok velika podjedinica sudjeluje u selekciji ciljne DNA (Jore i sur. 2011; Wiedenheft i sur. 2011; Sashital, Wiedenheft i Doudna 2012). Kako bi se kompleks Cascade vezao, potrebna je komplementarnost crRNA i ciljne DNA (Wiedenhaft i sur. 2011). Za nekomplementarni lanac veže se protein Cas3 i inicijalno je mjesto cijepanja strane DNA (Mulepati i sur. 2013).

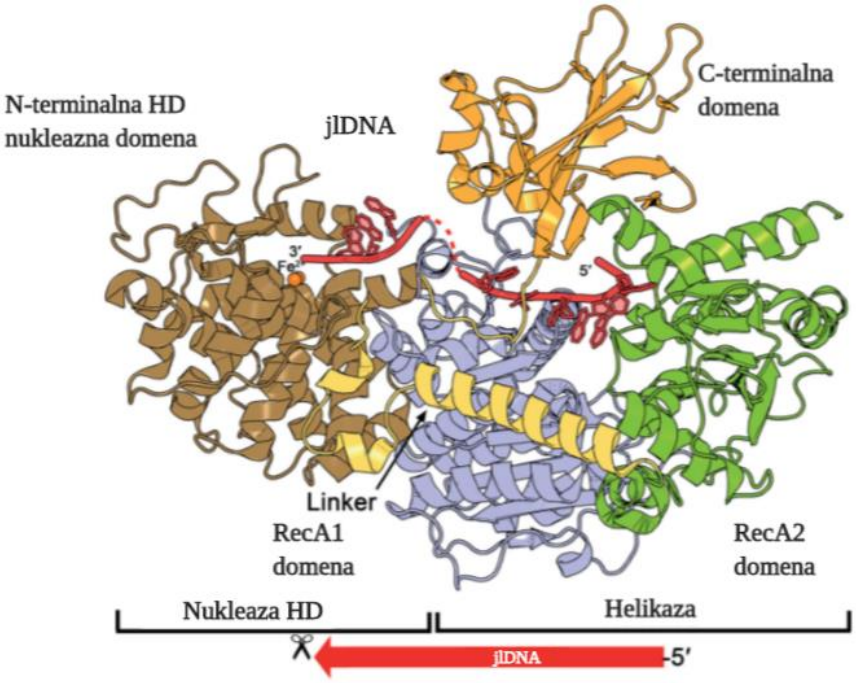



**Slika 4.** Nastajanje kompleksa Cascade CRISPR-Cas sustava tipa I-E. (preuzeto i prilagođeno prema: Plagens i sur. 2015).

U zadnjem koraku u fazi interferencije helikaza i endonukleaza Cas3, protein specifičan za tip I sustava CRISPR-Cas, degradira ciljnu DNA (Brouns i sur. 2008; Westra i sur. 2012). Cas3 se aktivira posredovanjem proteina CasA (Cse1) kompleksa Cascade koji prepoznaje ciljnu DNA i smješta Cas3 u blizinu sekvence PAM (Hochstrasser i sur. 2014). Protein Cas3 veže se CTD domenom na podjedinicu Cse1 kompleksa Cascade i cijepa istisnuti lanac DNA 11 nukleotida od početka R-omče (Mulepati i Bailey 2013; Sinkunas i sur. 2013). To omogućuje vezanje helikazne domene koja stabilizira vezu između kompleksa Cascade i Cas3 (Loeff i sur. 2018).

Cas3 je ATP-ovisna jednolančana DNA translokaza/helikaza koja je u velikom broju sustava CRISPR vezana na HD-nukleaznu domenu. Translokaza i nukleaza Cas3 aktivira degradaciju DNA tako što ju reducira u kraće fragmente od desetak nukleotida u procesu CRISPR interferencije (He i sur. 2020). Cas3 sadrži HD (histidin-aspartat)-nukleaznu domenu vezanu za dvije RecA domene koje su karakteristične za helikaze superfamily-2 (SF2) (He i sur. 2020). Između dviju domena RecA1 i RecA2 u helikaznoj jezgri nalazi se rascjep u kojem dolazi do konformacijskih promjena prilikom vezanja i hidrolize ATP-a. To uzrokuje odmatanje dvolančane strane DNA u 3'→5' smjeru, koja se zatim usmjerava prema HD nukleaznoj domeni (Huo i sur. 2014). HD domena vrši metal ovisnu nukleaznu aktivnost na jednolančanoj DNA (Mulepati i sur. 2011, Sinkunas i sur. 2011; Beloglazova i sur. 2011). Cas3 progresivno odmotava i degradira stranu DNA, što je posredovano ATP-ovisnom helikaznom i nukleaznom

aktivnošću (Westra i sur. 2012). Pomicanje Cas3 po DNA kataliziranо je ATP-om koji se veže na domenu RecA1, što inducira rotaciju i zatvaranje prema domeni RecA2 prilikom čega se izlažu važni aminokiselinski ostaci hidrolizi ATP-a. Nakon hidrolize ATP-a i disocijacije, domene RecA vraćaju se u početni položaj (Huo i sur. 2014). Odmotavanje lanca DNA osigurava supstrat jednolančane DNA za nukleaznu domenu te otpuštanje Cascade s protorazmaknice. Cas3 cijepa oba lanca unutar protorazmaknice i uzvodno od PAM sekvence (Mulepati i sur. 2013, Loeff i sur. 2018, Xiao i sur. 2018). Protein Cas3 nije u interakciji sa kompleksom Cascade u odsutnosti ciljne DNA (Westra i sur. 2012). Na **slici 5**. prikazana je kristalna struktura proteina Cas3 iz bakterije *Thermobifida fusca*.




**Slika 5.** Kristalna struktura proteina Cas3 bakterije *Thermobifida fusca* (preuzeto i prilagođeno prema: Plagens i sur. 2015). N-terminalna HD nukleazna domena označena je smeđom, RecA1 domena ljubičastom, RecA2 domena zelenom, C-terminalna domena (CTD) narančastom, poveznica (linker) žutom bojom, a jednolančana DNA crvenom bojom.

### 1.5. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E

Na aktivnost sustava CRISPR-Cas tipa I-E utječu različiti faktori, među ostalim i proteini koji nisu dio skupine Cas proteina, kao što su protein H-NS (od engl. *heat-stable nucleoid-structuring protein*) te šaperon HtpG (od engl. *high-temperature protein G*).

### 1.5.1. H-NS

Protein H-NS vrlo je zastupljen prokariotski protein koji ima važnu ulogu u organizaciji kromosomske DNA i utišavanju gena (Pul i sur. 2010). U bakteriji *E. coli* protein H-NS ima ulogu represora i sprječava transkripciju gena *cas3*, te lokusa CRISPR i gena koji kodiraju za kompleks Cascade, Cas1 i Cas2 vezanjem za sekvencu IGLB (od engl. *intergenic region ygcL-ygcB*) između gena *cas3* i *casA*, unutar koje se nalazi promotor $P_{cas}$ (Majsec i sur. 2016, Pul i sur. 2010). Stanice divljeg tipa bakterije *E. coli* K12 koje imaju anti-lambda razmaknicu komplementarnu protorazmaknici strane DNA (fag λ) nisu pokazale rezistenciju na infekciju fagom λ, dok su one kojima uz to još i nedostaje represor H-NS (Δ*hns*) pokazale otpornost na infekciju (Pougach i sur. 2010; Majsec i sur. 2016).

### 1.5.2. HtpG

Protein HtpG iz bakterije *E. coli* homologan je proteinu Hsp83 (od engl. *heat shock protein 83*) izoliranom iz vrste *Drosophila melanogaster* i spada u skupinu šaperona Hsp90, a njegova se količina povećava pri povišenoj temperaturi, infekciji fagom ili u prisustvu toksičnih tvari (Bardwell i Craig 1987). Yosef i sur. (2011.) pokazali su da je šaperon HtpG važan u održavanju funkcionalne razine proteina Cas3, važnog proteina za fazu CRISPR interferencije u bakterija. Naime, nedostatak proteina HtpG dovodi do smanjenja aktivnog proteina Cas3 koji se može nadomjestiti povećanom količinom proteina Cas3 ekspresijom s plazmida. Prekomjerna ekspresija šaperona HtpG uzrokuje povećanu količinu Cas3 u mutantu Δ*htpG*, što podupire objašnjenje da je HtpG uključen u smatanje i/ili stabilizaciju proteina Cas3 (Barrangou i sur. 2013). Općenita uloga proteina HtpG u pomaganju proteinu Cas3 za druge bakterije ili za arheje nije poznata jer HtpG nije rasprostranjen među arhejama (Yosef i sur. 2011).

## 1.6. Temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i ciljevi istraživanja

Dosadašnja istraživanja pokazala su da zaštita bakterija *E. coli* od infekcije fagom lambda (λ) ovisi o temperaturi inkubiranja kada su kompleks Cascade, crRNA i Cas3 eksprimirani dok je inaktiviran H-NS (mutant Δ*hns*), transkripcijski represor sustava CRISPR-Cas. Protein Cas3 se tada pokazao kao limitirajući faktor u rezistenciji na infekciju fagom na 37 °C što je zaključeno na temelju slijedećih rezultata: i) povećana količina proteina Cas3 eksprimirana s plazmida, vratila je rezistenciju na fag λ kod stanica s nedostatkom gena *hns* s anti-lambda

razmaknicama pri temperaturi od 37 °C, ii) aktivnost proteina Cas3 ovisila je i o šaperonu HtpG jer u stanicama bez gena *hns* i *htpG* povećana količina proteina Cas3 nije mogla vratiti rezistenciju na fag λ (Majsec i sur. 2016). Ovi rezultati su ukazali da su za obranu od infekcije fagom na 37 °C potrebne povećane količine proteina Cas3 i prisutnost kromosomskog gena *htpG*, iii) povećana ekspresija samo šaperona HtpG nije mogla uspostaviti otpornost Δ*hns* stanica na infekciju fagom na 37 °C, pa uloga šaperona HtpG u stabilnosti proteina Cas3 pri različitim temperaturama nije u potpunosti razjašnjena.

Kako bi se razjasnila temperaturna osjetljivost proteina Cas3 i utjecaj šaperona HtpG, ciljevi ovog diplomskog rada su:

1) Istražiti utjecaj točkastih mutacija u genu *cas3* na aktivnost tih proteina u rezistenciji na infekciju fagom λ u ovisnosti o temperaturi inkubiranja s i bez šaperona HtpG. Na taj način istražiti utječe li protein HtpG na konformaciju proteina Cas3.

2) Istražiti kako šaperon HtpG utječe na količinu proteina Cas3 u sojevima *wt*, Δ*hns*, Δ*htpG* i Δ*hns* Δ*htpG* pri različitim temperaturama uzgoja metodom *Western blot* kako bi se razjasnila moguća uloga ovog proteina u stabilnosti proteina Cas3 *in vivo*.

## 2. MATERIJALI I METODE

### 2.1. MATERIJALI

U Tablicama 1. i 2. prikazani su sojevi bakterije *Escherichia coli* K-12 i plazmidi koji su korišteni u ovom istraživanju.

#### 2.1.1. Sojevi

**Tablica 1.** Popis bakterijskih sojeva bakterije *Escherichia coli* K-12 koji su korišteni u istraživanju.

| **Soj** | **Genotip** | **Referenca ili izvor** |
|---|---|---|
| BL21 (AI) | *E. coli* B F$^-$ *ompT gal dcm lon hsdS$_B$*($r_B^- m_B^-$) [*malB*$^+$]$_{K\text{-}12}$($\lambda^S$) *araB*::*T7RNAP-tetA* | Invitrogen |
| IIB1266 | BL21 (AI) λc λT3 Δ*cas1*::*kan cas3*$^+$*cse1-cas6*$^+$ | I. Ivančić Baće |
| BW25113 | *F$^-$ rrnB ΔlacZ4748 (*::*rrnB-3) hsdR514* Δ *(araBAD) 567* Δ *(rhaBAD) 568 rph-1 λ$^-$* | Datsenko i sur. (2000.) |
| BW39651 | BW25113 + λT3 spacer | Pougach K. |
| IIB1088 | BW25113+ *His6x-cas3*::*kan* | I. Ivančić Baće |
| IIB1103 | BW25113 + *His6x-cas3*::*kan* Δ*hns*::*cat* | I. Ivančić Baće |
| IIB1104 | BW25113 + Δ*htpG*::FRT *His6x-cas3*::*kan* | I. Ivančić Baće |
| IIB1105 | BW25113 + Δ*htpG*::FRT Δ*hns*::*cat His6x-cas3*::*kan* | I. Ivančić Baće |
| IIB1309 | BW39651+ λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan* | I. Ivančić Baće |
| IIB1342 | 1309 + λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan cas3* W406A | I. Ivančić Baće |
| IIB1343 | 1309 + λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan cas3* W149/152A | I. Ivančić Baće |
| IIB1344 | 1309 + λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan cas3* W41A | I. Ivančić Baće |
| IIB1345 | 1309 + λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan cas3* W230A | I. Ivančić Baće |
| IIB1346 | 1309 + λT3 λc Δ*cas1*::FRT Δ*hns*:: *kan cas3* D75A | I. Ivančić Baće |

### 2.1.2. Plaz midi

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

| **Plazmid** | **Opis** | **Referenca ili izvor** |
|---|---|---|
| pBAD-HisA | komercijalni plazmid, $Amp^R$ | Thermo Fisher Scientific |
| pAH4 | *cas3* u pBAD-HisA | Ed Bolt |
| pDM6 | *cas3W42A* u pBAD-HisA | D. Mitić |
| pDM7 | *cas3D75A* u pBAD-HisA | D. Mitić |
| pDM8 | *cas3W406A/D75A* u pBAD-HisA | D. Mitić |
| pW41A | *cas3W41A* u pBAD-HisA | D. Mitić |
| pIIB37 | *cas3W230A* u pBAD-HisA | I. Ivančić Baće |
| pIIB39 | *cas3W406A* u pBAD-HisA | I. Ivančić Baće |
| pCDF-1b | komercijalni plazmid, $Str^R$ | Novagen |
| pIIB44 (pHtpG) | *htpG* u pCDF-1b | I. Ivančić Baće |
| pACYC-Duet | komercijalni plazmid, $Chl^R$ | Novagen |
| pEB549 | $Cascade^+$ (*casA-casE*) u pACYC-Duet | Ed Bolt |

### 2.1.3. Hranidbene podloge

U Tablicama 3. i 4. navedene su hranidbene podloge, antibiotici i induktori koji su primijenjeni za uzgoj bakterijskih sojeva u ovom istraživanju.

**Tablica 3**. Sastav hranidbenih podloga korištenih za uzgoj bakterijskih sojeva

| **Hranidbene podloge** | **Sastav** |
|---|---|
| kruta LB podloga (*Luria broth*) | 10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 15 g/L agar |
| tekući LB medij | 10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl |
| meki agar (6%) | 10 g/L bakto-tripton, 5 g/L ekstrakt kvasca, 10 g/L NaCl, 6 g/L agar |

**Tablica 4.** Antibiotici i induktori korišteni u uzgoju bakterijskih sojeva

| **Antibiotik** | **Konačna koncentracija** |
|---|---|
| ampicilin | 100 μg/ml |
| streptomicin | 50 μg/ml |
| kloramfenikol | 34 μg/ml |
| **Induktor** | |
| IPTG | 1 mM (238 μg/ml) |
| L-arabinoza | 0,2 %-tna otopina |

### 2.1.4. Komercijalni kompleti

U **Tablici 5.** navedeni su komercijalni komplet kemiluminiscentnih reagensa za detekciju konjugata peroksidaze hrena (HRP) na imunoblotima.

**Tablica 5.** Komercijalni kompleti

| **Komercijalni kompleti** | **Proizvođač** |
|---|---|
| *ECL Western Blotting Substrate* | Promega |

### 2.1.5. Proteinski markeri

**Tablica 6.** Proteinski markeri korišteni u ovom istraživanju.

| **Proteinski markeri** | **Proizvođač** |
|---|---|
| *Precision Plus Protein All Blue Standards* | Bio-Rad |
| *Unstained Protein Molecular Weight Marker* | Thermo Fisher Scientific |

### 2.1.6. Boje

U tablici 7. navedene su boje koje su korištene u ovom istraživanju.

**Tablica 7.** Otopine boja

| **Boje** | **Sastav** |
|---|---|
| *Coomassie brilliant blue* (CBB) R-250 | 0,1 % (w/v) CBB R-250 (Thermo Scientific), 45 % (v/v) metanol, 10 % (v/v) ledena octena kiselina |
| *Bromfenol plava* | Otopina bromfenol plave u 20 %-tnom etanolu |

### 2.1.7. Antitijela

U tablici 8. navedena su antitijela anti-His koja su se specifično vezala za His6x-Cas3 histidinski privjesak te primarna i sekundarna antitijela koja se vežu za protein GAPDH koji služi kao kontrola za provjeru količine nanesenih uzoraka.

**Tablica 8.** Antitijela korištena u metodi *Western blot*

| **Antitijela** | **Sastav** |
|---|---|
| antitijela anti-His (Sigma-Aldrich) | 10 µL koncentrirane (*stock*) otopine antitijela anti-His obilježena peroksidazom iz hrena (1 mg/ml) razrijeđeno u 20 ml pufera za ispiranje (*Western blot*) |
| primarna anti-GAPDH antitijela (Genetex) | 1,25 µL koncentrirane (*stock*) otopine anti-GAPDH primarnog antitijela u 15 mL pufera za ispiranje (*Western blot*) |
| sekundarna anti-rabbit antitijela (Sigma-Aldrich) | 2 µL koncentrirane (*stock*) otopine anti-rabbit HRP antitijela u 15 mL pufera za ispiranje (*Western blot*) |

### 2.1.8. Otopine

**Tablica 9.** Otopine koje su korištene u ovom istraživanju i njihov sastav.

| **Otopina** | **Sastav** |
|---|---|
| 20 %-tna otopina L-arabinoze | Otopina L-arabinoze u Milli-Q vodi |
| Pufer za lizu | 1 M Tris-HCl, pH=8, 5 M NaCl, 50 mM PMSF (inhibitor proteaza) – 0,00879 g PMSF u 1 mL 96 % otopine etanola, redestilirana voda |
| Pufer za denaturaciju (*Laemmli sample buffer*) | 125 mM Tris HCl, pH=6,8; 4 % (*w/v*) SDS; 10 % (v/v) β-merkaptoetanol; 32 % (v/v) glicerol; kap bromfenola plavog |
| Elektrodni pufer | 25 mM Tris, 192 mM glicin, 1 % (*w/v*) SDS, pH=8,3 |
| Otopina za bojanje (SDS-PAGE) | 0,1 % (w/v) CBB R-250; 45 % (v/v) metanol; 10 % (v/v) ledene octene kiseline |
| Otopina za odbojavanje (SDS-PAGE) | 10 % (v/v) octena kiselina, 10 % (v/v) etanol |
| 10 % (*w/v*) amonijev persulfat (APS) | 500 mg APS u 5 mL redestilirane vode |
| 1,5 M Tris-HCl (pH=8,8) | 18,2 g Tris-HCl, 6 M HCl (do pH=8,8), redestilirana voda do 100 mL |
| 0,5 M Tris-HCl (pH=6,8) | 6 g Tris-HCl, 6 M HCl (do pH=6,8), redestilirana voda do 100 mL |
| 30 % AA/Bis | 30 % otopina akrilamid / bisakrilamid (*Rotiphorese*) |
| N,N,N′,N′-tetrametiletilendiamin (TEMED) | 99 % otopina N,N,N′,N′-tetrametiletilendiamin (TEMED) (*Sigma Aldrich*) |
| Pufer za prijenos | 28 mM Tris, 192 mM glicin, 10 % (*v/v*) metanol, pH=8,3 |
| PBS | 10 mM $Na_2HPO_4$, 1,7 mM $KH_2PO_4$, 0,13 M NaCl, 2,7 mM KCl, pH=7,4 |
| Pufer za blokiranje | 3 g mlijeka u prahu (*Gramm*) u 60 ml PBS-a |
| Pufer za ispiranje (*Western blot*) | 200 μL detergenta Tween 20 otopljenog u 400 mL PBS-a |

| | |
|---|---|
| Bradford matična otopina | 0,01 % CBB G-250; 31,35 % (v/v) etanol; 58,6 % (v/v) $H_3PO_4$ |
| Bradford radna otopina | 2,85 % (v/v) etanol; 5,28 % (v/v) $H_3PO_4$; 6 % (v/v) Bradford matična otopina |
| Otopina albumina goveđeg seruma (BSA) (za pripremu baždarnog pravca) | 2 mg/mL BSA u puferu za lizu |
| 10 mM otopina magnezijeva sulfata ($MgSO_4$) | Otopina $MgSO_4$ u MilliQ vodi |
| 50 mM otopina kalcijeva klorida ($CaCl_2$) | Otopina $CaCl_2$ u MilliQ vodi |
| 1 M otopina izopropil-β-D-tiogalaktopiranozida (IPTG) | 2,83 g IPTG-a u 10 mL $dH_2O$ |

## 2.2. METODE

### 2.2.1. Uzgoj bakterijskih sojeva

Za uzgoj bakterijskih sojeva korištene su krute LB podloge (*Luria broth*) ili tekući LB medij. Na krutim podlogama bakterije formiraju pojedinačne kolonije nakon rasta preko noći, dok se u tekućem mediju uzgajaju bakterijske kulture do stacionarne ili do logaritamske faze rasta. U tekući ili kruti LB medij se po potrebi dodaju antibiotici i induktori u finalnim koncentracijama navedenim u **tablici 4.**

### 2.2.2. Priprema kemijski kompetentnih bakterija i transformacija bakterijskih sojeva plazmidima

Kako bismo bakterijske stanice transformirali plazmidnom DNA, odnosno učinili ih kompetentnima, tretirane su otopinom kalcijeva klorida kako bi bile propusne za ulazak željenog plazmida. Uzgojene su noćne bakterijske kulture u tekućem LB mediju, a zatim je 40 µL navedenih bakterijskih kultura inokulirano u 3 mL novog tekućeg LB medija i inkubirano na 37 °C u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) do logaritamske faze rasta (do vrijednosti optičke gustoće $OD_{600}$ = 0,5 – 0,6 koja je izmjerena pomoću spektrofotometrijskog uređaja Ultrospec 10 Classic). Narasle bakterijske kulture (1,5 mL) istaložene su 2,5 minute na brzini od 8000 rpm u centrifugi 5415D (*Eppendorf*). Potom je resuspendiran zaostali talog bakterijskih stanica u 200 µL prethodno ohlađene 50 mM otopine kalcijeva klorida. Bakterijske stanice ponovno su istaložene, a zatim je talog resuspendiran u 50 µL hladne 50 mM otopine kalcijeva klorida i inkubirane su na ledu 10 minuta. Potom je pripremljenim kompetentnim stanicama dodano 2 µL željenog plazmida nakon čega je slijedila inkubacija na ledu 15 minuta. Bakterijske stanice su zatim izložene toplinskom šoku inkubacijom 2 minute na 42 °C u termobloku *Thermomixer comfort* (Eppendorf) i 2 minute na ledu. Transformiranim stanicama je dodano 250 µL tekućeg LB medija, a zatim su sat vremena inkubirane na 37 °C u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.). Nasađeno je 100 µL transformirane bakterijske kulture na kruti LB medij s odgovarajućim antibiotikom te su inkubirane 15-16 sati na 37 °C u inkubatoru.

### 2.2.3. Izolacija proteina

Za izolaciju proteina korištene su bakterijske stanice prethodno transformirane odgovarajućim plazmidima. S krute LB podloge odabrana je prethodno narasla pojedinačna bakterijska kolonija i prenijeta u 3 mL tekućeg LB medija u koji je dodano 30 µL 0,1 M otopine IPTG, 30 µL 20 %-tne otopine L-arabinoze (finalne koncentracije 0.2 %) te 3 µL antibiotika streptomicina (zbog plazmida u koji je kloniran *htpG*). IPTG je dodan kako bi se potaknula ekspresija šaperona HtpG s plazmida, a arabinoza za indukciju sinteze proteina Cas3 koji se nalazi pod inducibilnim promotorom $P_{BAD}$ na bakterijskom kromosomu (tablica 1 i 2). Zatim su stanice inkubirane 16 h na 37 °C u tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) ili na 30 °C u tresilici MaxQ 420 HP (Thermo Fisher Scientific). Bakterijske stanice su istaložene u centrifugi SIGMA 3K30 (5 minuta, 14 000 g, 4 °C), a talog je resuspendiran u 600 µL pufera za lizu. Potom su uzorci stavljeni na led i lizirani pomoću sonikatora High Intensity Ultrasonic Processor (Bioblock Scientific) 8 puta po 2 sekunde s 4 sekunde pauze između svake sonikacije. Lizat bakterijskih stanica potom je centrifugiran u centrifugi SIGMA 3K30 (10 minuta, 14 000 g, 4 °C). Supernatant svakog uzorka u kojem se nalaze otopljeni proteini, među ostalim i Cas3, prenesen je u novu tubicu, a zaostali talog resuspendiran u 300 µL pufera za lizu. Po 200 µL svakog uzorka (supernatanta i taloga) preneseno je u nove tubice, a u svaki uzorak je dodano pufera za denaturaciju (*sample buffer*) u omjeru 4:1 (50 µL). Uzorci su zatim denaturirani toplinskim šokom u termobloku *Thermomixer Comfort* (Eppendorf) pri 95 °C u trajanju od 5 minuta. Denaturirani proteini su pohranjeni na 4 °C.

### 2.2.4. Određivanje koncentracije proteina

Ukupna koncentracija izoliranih proteina određena je spektrofotometrijski po metodi prema Bradfordu. Pripremljene su Bradford matična otopina, Bradford radna otopina te otopine albumina goveđeg seruma (BSA) za pripremu baždarnog pravca. Za izradu baždarnog pravca raspon konačnih koncentracija otopina BSA prilagođen je očekivanoj koncentraciji proteina i iznosi 0,2 – 2,0 mg/mL. Prvo se otapanjem 20 mg albumina goveđeg seruma u 10 mL pufera za lizu priredi otopina BSA koncentracije 2 mg/mL, a potom se iz te otopine priprema 10 razrjeđenja u rasponu konačne koncentracije 0,2 – 2,0 mg/mL. Intenzitet plavog obojenja nastalog pri reakciji proteina u uzorku s Bradfordovim reagensom proporcionalan je koncentraciji proteina. Mjerenje se provodi pri valnoj duljini od 595 nm. Prije samog mjerenja pripremaju se dvije slijepe probe koje sadrže 20 µL pufera za lizu i 1 mL Bradford radne otopine

te po dvije replike svakog standarda (20 µL standarda i 1 mL Bradford radne otopine). Baždarni pravac je pripremljen prije mjerenja koncentracije proteina u uzorku, a pritom se koristi ista Bradford radna otopina. Po 20 µL uzorka izoliranih proteina prije denaturacije stavljeno je u 1 mL Bradford radne otopine, a potom vorteksirano na mješalici Vortex 4 basic (*IKA*) i inkubirano u mraku 5 minuta. Pomoću spektrofotometra SPECORD 50 PLUS (*Analytik jena*) određena je koncentracija izoliranih proteina.

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

Kako bi se provjerila uspješnost izolacije ukupnih proteina korištena je elektroforeza u poliakrilamidnom gelu, a pritom je korišten sustav Mini-PROTEAN 3 Cell (*Bio-Rad*). Prvo je pripremljen 10 %-tni gel za razdvajanje (tablica 8.), a otopina je zatim izlivena između prethodno složenog okvira („*sendviča"*) od dvaju stakla između kojih se nalaze razmaknice. Na izlivenu otopinu gela za razdvajanje stavlja se sloj otopine boje bromfenol plave u etanolu jer kontakt sa zrakom sprječava polimerizaciju. Gel je ostavljen da polimerizira otprilike 45 minuta. Nakon polimerizacije uklonjena je zaostala otopina bromfenol plave, a gel za razdvajanje nadsvođen je prethodno pripremljenom 4 %-tnom otopinom gela za koncentriranje (tablica 8.). Odmah nakon dodavanja gela za koncentriranje umetnuti su češljići za formiranje jažica. Nakon što je i gel za koncentriranje polimerizirao, lagano su uklonjeni češljići.

**Tablica 10.** Sastav 10 %-tnog gela za razdvajanje i 4 %-tnog gela za koncentriranje (navedeni su volumeni za pripremu dvaju gelova).

| **Gel za razdvajanje (10 %)** | | **Gel za koncentriranje (4 %)** | |
|---|---|---|---|
| reH$_2$O | 4.05 mL | reH$_2$O | 3.05 mL |
| 1,5 M Tris-HCl, pH=8.8 | 2.5 mL | 0,5 M Tris-HCl, pH=6.8 | 1.25 mL |
| AA/Bis (30 %) | 3.3 mL | AA/Bis (30 %) | 665 µL |
| 10 % SDS | 100 µL | 10 % SDS | 50 µL |
| 10 % APS | 50 µL | 10 % APS | 35 µL |
| TEMED | 5 µL | TEMED | 8 µL |
| ukupni volumen | 10 mL | ukupni volumen | 5 mL |

Okviri sa stakalcima u kojima se nalazi pripremljeni gel učvršćeni su na elektrodni nosač, a u otvor nosača između dvaju gelova uliven je prethodno pripremljeni elektrodni pufer. U jažice su naneseni uzorci koji sadrže 9 µg izoliranih i denaturiranih proteina iz svakog transformiranog bakterijskog soja iglom *Hamilton*, a u prvu jažicu je naneseno 3 µL markera *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (*Thermo Fisher Scientific*). Gelovi s nanesenim uzorcima stavljeni su u kadicu u koju je prethodno dodan elektrodni pufer i stavljen je poklopac, a elektrode su spojene s izvorom struje (*power supply*). Pokrenuta je elektroforeza koja je prvih 15 minuta tekla na 100 V kako bi naneseni proteini putovali kroz gel za koncentriranje, a potom još 50 minuta na 190 V. Zatim je aparatura rastavljena, a gelovi su odvojeni od stakalca te je uklonjen gel za koncentriranje, odnosno jažice. Za vizualizaciju proteina u gelu korištena je tehnika obojenja Coomassie bojom. Gelovi su obojeni bojom Coomassie brilliant blue (CBB) R-250 na tresilici 60 minuta pri sobnoj temperaturi, a potom odbojeni otopinom za odbojavanje 45 minuta pri sobnoj temperaturi. Gelovi su skenirani i pohranjeni su u otopini za odbojavanje pri 4 °C.

### 2.2.6. Metoda mokrog prijenosa proteina na nitroceluloznu membranu (*Western blot*)

Mokri prijenos odvija se u vertikalnom sustavu za elektroprijenos Mini trans-blot electrophoretic transfer cell (*BioRad).* Uzorci izoliranih i denaturiranih proteina su prethodno razdvojeni elektroforezom u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecilsulfata navedenim postupkom. Za elektroforezu korišteni su Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Precast gelovi (*Bio-Rad*), a nanesen je marker Precision Plus Protein All Blue Standards (*Bio-Rad*). Elektroforeza je tekla na 200 V u trajanju od 35 minuta. Prije završetka elektroforeze u veliku petrijevu posudu s prethodno pripremljenim puferom za prijenos namoče se dvije spužvice s *Whatman* filter papirom. Izrezane su dvije nitrocelulozne membrane Whatman Protran BA 83 (GE Healthcare) prema veličini *Whatman* filter papira te im je odrezan donji desni dio kako bi raspoznali gornji dio membrane. Na plastični okvir uređaja (tamnom stranom prema dolje) stavljaju se spužvice s Whatman filter papirom, nitrocelulozna membrana (tako da je odrezani dio dolje desno), gel (tako da je prvi uzorak na lijevoj strani), drugi filter papir i opet spužvica kojom se sve dobro pritisne kako ne bi zaostali mjehurići zraka. Ovako pripremljeni sendvič postavlja se u uređaj tako da membrana bude okrenuta prema anodi jer su proteini zbog SDS-a negativno nabijeni. Prijenos traje 60 minuta na 60 V. Nakon prijenosa svaka membrana se stavlja u zasebnu petrijevku i dodaje se po 30 mL pufera za blokiranje (kako bi se zaostala slobodna vezna mjesta na membrani zasitila proteinima iz mlijeka) te se inkubira sat vremena na sobnoj temperaturi na tresilici. Za to vrijeme gel se oboja tehnikom obojenja Coomassie

bojom te odboji puferom za odbojavanje kako bi provjerili je li zaostalo proteina na gelu. Nakon blokiranja, membrana se ispire tri puta u trajanju od 5 minuta s po 15 mL pufera za ispiranje te se pritom inkubira na tresilici na sobnoj temperaturi. Potom se membrana prereže na dva dijela između 4. i 5. benda markera (između 75 kDa i 50 kDa jer je Cas3 otprilike 100 kDa, dok je GAPDH 36 kDa). Gornji dio membrane se inkubira dva sata pri sobnoj temperaturi u anti-His antitijelu na tresilici. Nakon inkubacije, anti-His antitijela su vraćena u epruvetu za ponovno korištenje, a membrane su isprane tri puta u trajanju od 5 minuta s po 15 mL pufera za ispiranje. Donji dio membrane se inkubira u primarnom anti-GAPDH antitijelu dva sata pri sobnoj temperaturi na tresilici, a potom preko noći na 4 °C. Nakon prekonoćne inkubacije, primarno anti-GAPDH antitijelo vraćeno je u epruvetu za ponovno korištenje, a potom je membrana isprana tri puta u trajanju od 5 minuta s po 15 mL pufera za ispiranje. Nakon ispiranja dodano je 15 mL sekundarnog anti-rabbit antitijela te je membrana inkubirana dva sata pri sobnoj temperaturi na tresilici. Potom su vraćena sekundarna anti-rabbit antitijela u epruvetu, a membrana je isprana tri puta u trajanju od 5 minuta s po 15 mL pufera za ispiranje. Proteini na membrani na koje su se vezala antitijela anti-His (koja su fuzionirana s peroksidazom iz hrena) ili sekundarna anti-rabbit antitijela detektirana su kemiluminiscentno reagensom za detekciju ECL Western Blotting Substrate (Promega). Pomiješano je 1 mL otopine vodikova peroksida s 1 mL otopine luminol pojačivača, a smjesa je nekoliko puta nanesena na membranu, a zatim je ostavljena na inkubaciji u mraku 5 minuta. Signal je detektiran u programu *Image Studio Lite* pomoću uređaja *C-DiGit Blot Scanner* (LI-COR, Biosciences). *Western blot* metoda korištena je za procjenu količine proteina Cas3 u pojedinom uzorku prilikom čega se uspoređivao intenzitet signala pojedine proteinske vrpce na blot membrani.

### 2.2.7. Određivanje broja plakova faga lambda pri različitim temperaturama inkubacije

Za istraživanje utjecaja šaperona HtpG na konformacije proteina Cas3 korištena su dva pristupa: bakterijski sojevi su imali točkaste mutacije u genu *cas3* na kromosomu ili su točkasti mutanti gena *cas3* bili na plazmidu. Bakterijske kulture sa ili bez plazmida uzgojene su na 37 °C preko noći u 3 mL tekućeg LB medija s dodatkom odgovarajućeg antibiotika, 0,2 % maltoze koja stimulira ekspresiju receptora za fag λ i odgovarajuće induktore (L-arabinoza i/ili IPTG). Na krute LB podloge koje su napravljene s istim odgovarajućim antibiotikom i induktorima nanesen je sloj 3 mL 6 %-tnog mekog agara u koji je prethodno dodano 200 µL prekonoćne kulture bakterijskih stanica i induktora. Napravljena su decimalna razrjeđenja faga λ (od $10^{-3}$ do $10^{-6}$) razrijeđena u 10 mM otopini magnezijeva sulfata ($MgSO_4$). Nakon što se meki agar

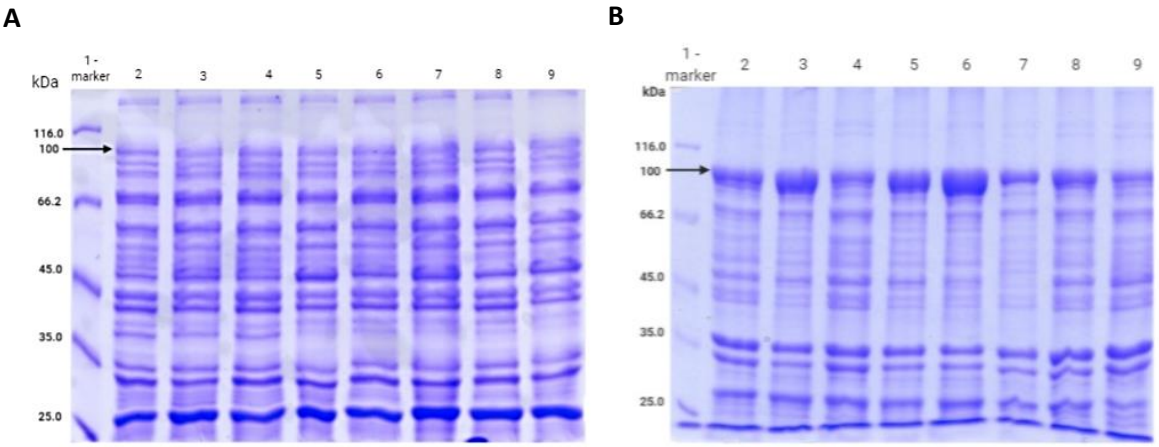
skrutnuo na ploče je naneseno po dva alikvota (10 μl) faga λ svakog decimalnog razrjeđenja. Nakon što su se alikvoti virusa upili u podlogu mekog agara, ploče su inkubirane pri različitim temperaturama – na 30 °C ili 35 °C u inkubatoru Napco 5415 ili 37 °C u inkubatoru Infors HT CH-4103 (*Bottmingen*) preko noći. Nakon prekonoćne inkubacije prebrojani su formirani plakovi na mjestu inficiranih liziranih bakterija. Prebrojani plakovi pokazuju osjetljivost bakterija na infekciju fagom λ, a izražava se jedinicom formiranja plakova (eng. *plaque forming unit,* PFU) koja predstavlja broj formiranih plakova po mililitru. PFU se izračunava kao umnožak broja formiranih plakova, volumena alikvota i stupnja decimalnog razrjeđenja faga λ lambda.

# 3. REZULTATI

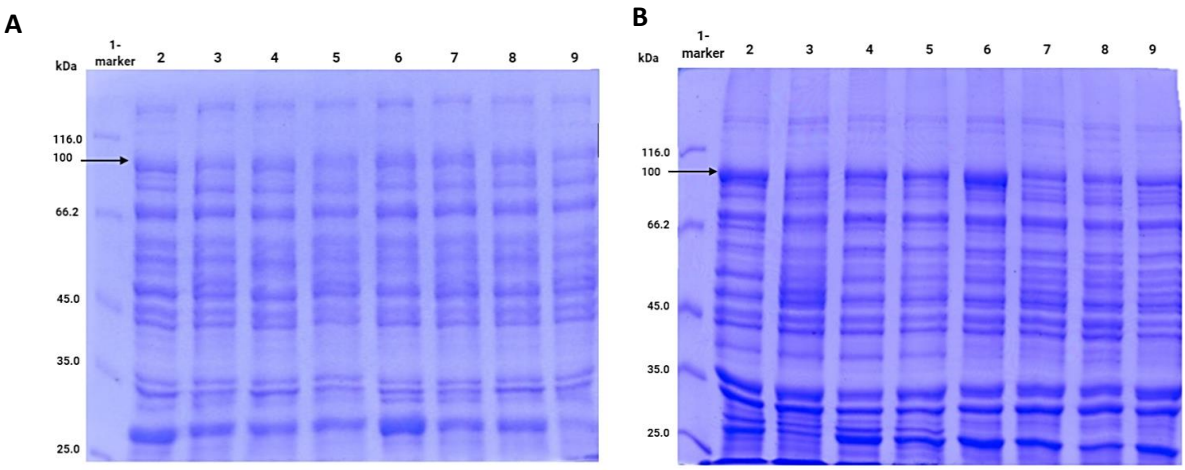
## 3.1. Utjecaj šaperona HtpG na količinu proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi inkubiranja

Kako bismo protein Cas3 detektirali i pritom razlikovali od ostalih staničnih proteina, ispred gena *cas3* na 5' kraj dodan je biljeg od šest aminokiselina histidina ($His_6$), a kromosomski konstruiran gen *cas3* je stavljen pod inducibilni promotor $P_{BAD}$ kako bi se dodatkom L-arabinoze potaknula ekspresija. Uz obilježeni gen *cas3,* korišteni sojevi imali su inaktiviran gen *hns* i/ili *htpG* kako bi se odredio utjecaj nedostatka ovih gena. Utjecaj većih količina šaperona HtpG određen je na način da je gen *htpG* kloniran, ali na 5' kraj **nije** dodan biljeg $His_6$ kako njegova ekspresija ne bi ometala detekciju proteina Cas3 jer ne možemo selektivno odrediti količinu proteina Cas3, budući da nemamo anti-Cas3 antitijelo.

Izolati ukupnih proteina, koji sadrže među ostalim i protein Cas3 i HtpG, analizirani su prvo metodom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijeva dodecilsulfata (SDS-Page). Rezultati prikazani na **Slici 6.** pokazuju vrpce ukupnih proteina iz supernatanta stacionarnih stanica (**A**) i taloga (**B**) iz sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δ*hns*), IIB1104 (Δ*htpG*) i IIB1105 (Δ*hns* Δ*htpG)* transformiranih praznim vektorom pCDF-1b te pHtpG (**Tablica 1.** i **2.**) koji su bili inkubirani preko noći pri 37 °C, odnosno pri 30 °C što je prikazano na **Slici 7A i 7B**. U prvoj jažici nalazi se marker *Unstained Protein Molecular Weight Marker*, dok se u jažicama 2 – 5 nalaze izolati bakterijskih proteina IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δ*hns*), IIB1104 (Δ*htpG*) i IIB1105 (Δ*hns* Δ*htpG)* koji su transformirani praznim vektorom (pCDF-1b), a u jažicama 6 – 9 nalaze se izolati navedenih sojeva koji su transformirani s pHtpG. Eksperimenti uzgoja bakterijskih sojeva i izolacije proteina ponovljeni su tri puta (biološke replike) te su prikazani reprezentativni rezultati. Vizualizacijom vrpci ne uočavaju se razlike u količinama proteina u supernatantima različitih sojeva na obje temperature (**Slika 6A. i 7A.**). Uočava se proteinska vrpca na veličini od oko 100 kDa u talogu stacionarnih stanica na 37 °C (**Slika 6B**) kod svih izolata koja odgovara veličini proteina Cas3, koja je manje uočljiva u talogu stanica uzgojenih na 30 °C (**Slika 7B**) te je uočljivija u talogu nego u supernatantima različitih sojeva na obje temperature. Kako bi se sa sigurnošću utvrdilo da je prisutan protein Cas3 u različitim količinama u navedenim sojevima provedena je metoda *Western blot.*



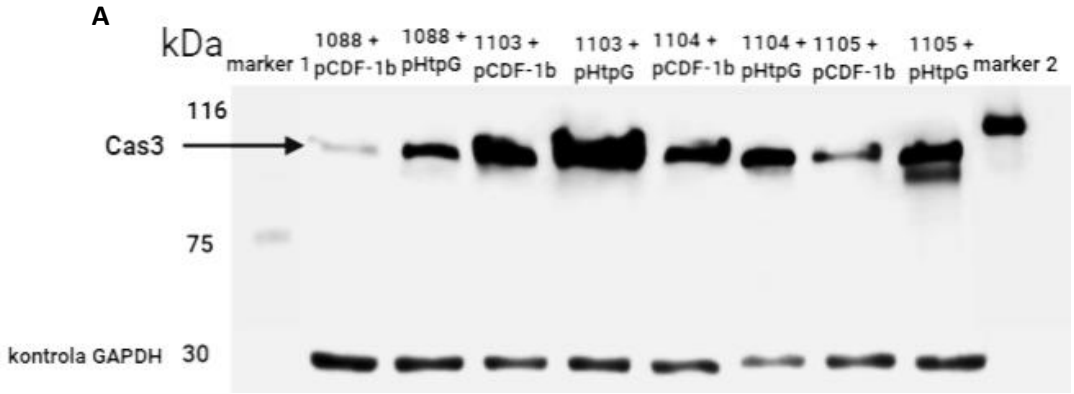

**Slika 6**. Analiza izolata ukupnih proteina primjenom SDS-Page metode. A) supernatant ukupnih proteina stacionarnih stanica bakterijskih sojeva inkubiranih preko noći pri 37 ◦C. B) talog izolata ukupnih proteina prethodno navedenih bakterijskih sojeva inkubiranih preko noći pri 37 ◦C.



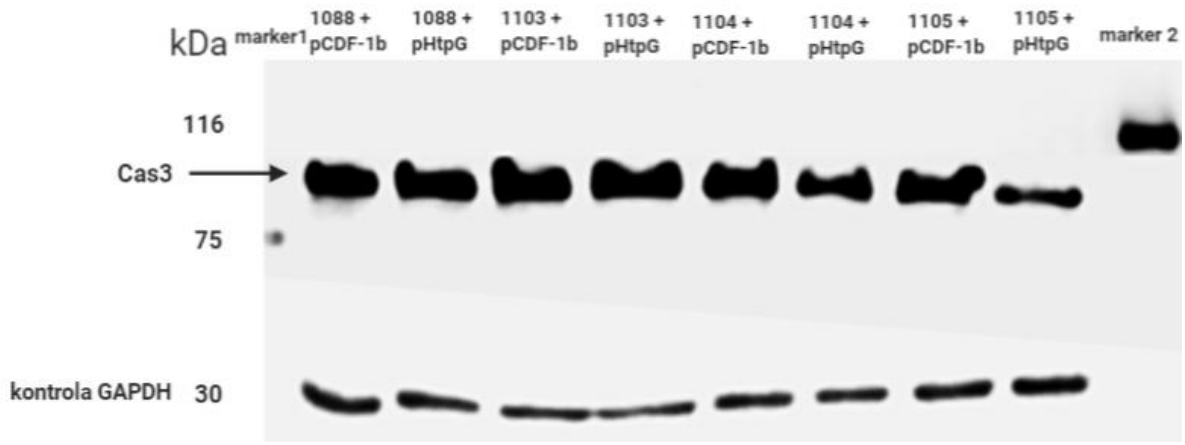

**Slika 7.** Analiza izolata ukupnih proteina primjenom SDS-Page metode. A) supernatant ukupnih proteina stacionarnih stanica bakterijskih sojeva inkubiranih preko noći pri 30 ◦C. B) talog izolata ukupnih proteina prethodno navedenih bakterijskih sojeva inkubiranih preko noći pri 30 ◦C.

Metoda *Western blot* korištena je za dokazivanje prisutnosti proteina Cas3 indirektno u svim izolatima pomoću anti-His antitijela koje se veže na biljeg $His_6$. Kako bi potvrdili da su različite količine proteina Cas3 u različitim sojevima pouzdane, korištena je referentna kontrola (eng. *loading control*) proteina čija se količina ne mijenja te kojim se ujedno pokazuje i preciznost u nanošenju uzoraka. Kao kontrola korišten je referentni protein GAPDH (gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza) koji je detektiran pomoću anti-GAPDH primarnih i sekundarnih antitijela. Prvi korak u normalizaciji dobivenih rezultata bio je kvantifikacija intenziteta signala eksperimentalnog (Cas3) i referentnog proteina (GAPDH). Relativna količina eksprimiranog proteina Cas3 potom je normalizirana prema GAPDH. Vrijednosti normalizacijskih signala svake eksperimentalne proteinske vrpce Cas3 dobiveni su tako što su izmjereni intenziteti signala svake proteinske vrpce Cas3 podijeljeni s najučestalijom izmjerenom vrijednosti intenziteta signala referentnog proteina GAPDH.

Oba proteina uspješno su detektirana u izolatima svih bakterijskih sojeva, a rezultati su prikazani na **Slici 8.** Iz dobivenih rezultata može se uočiti su intenziteti signala vrpci proteina Cas3 iz sojeva uzgojenih pri temperaturi od 37 °C s i bez plazmida pHtpG podjednaki (**Slika 8B**), dok se intenziteti signala vrpci proteina Cas3 iz sojeva uzgojenih pri temperaturi od 30 °C razlikuju (**Slika 8A**). Intenziteti proteinskih vrpca proteina Cas3 u sojevima koji su uzgojeni pri 30 °C i transformirani s plazmidom pHtpG jači su oko 2-3 puta u odnosu na sojeve transformirane s praznim plazmidom pCDF-1b, osim u soju Δ*htpG* (soj IIB1104). Sumarni rezultati intenziteta signala proteinskih vrpci proteina Cas3 iz sojeva uzgojenih pri 30 °C i 37 °C normalizirani su dijeljenjem s izmjerenim najučestalijim intenzitetom signala vrpci referentnog proteina GAPDH, a rezultati su prikazani na **Slici 9A** i **9B**.

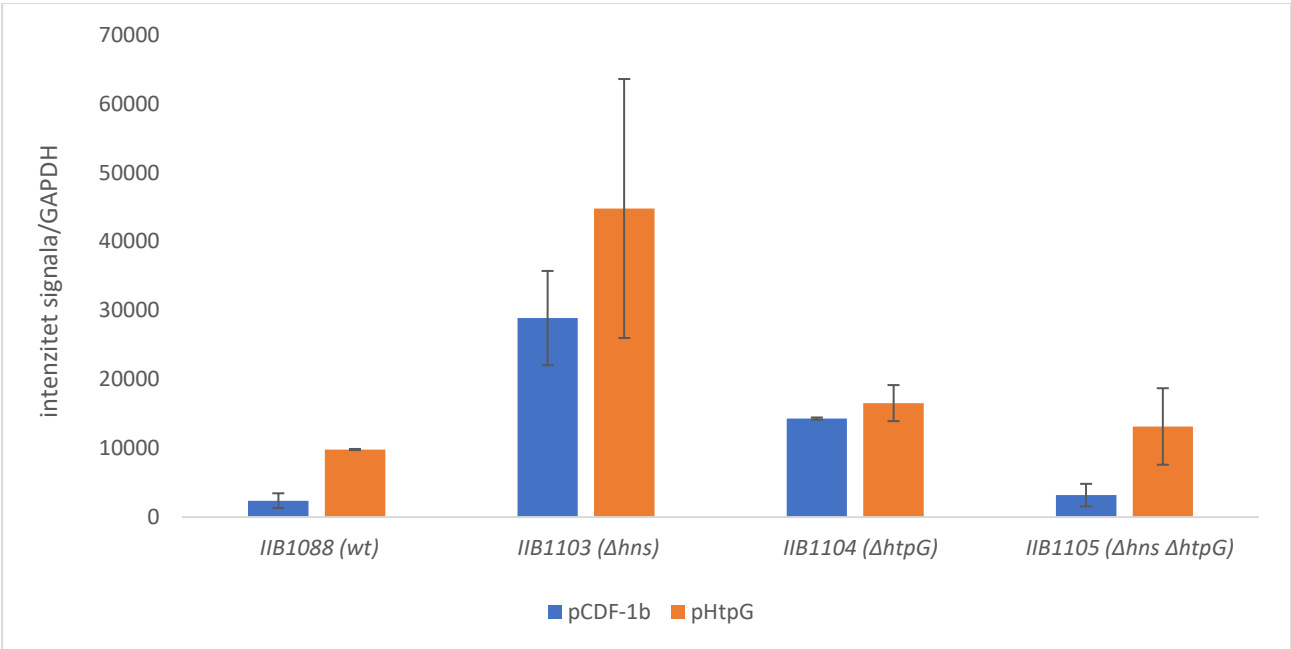


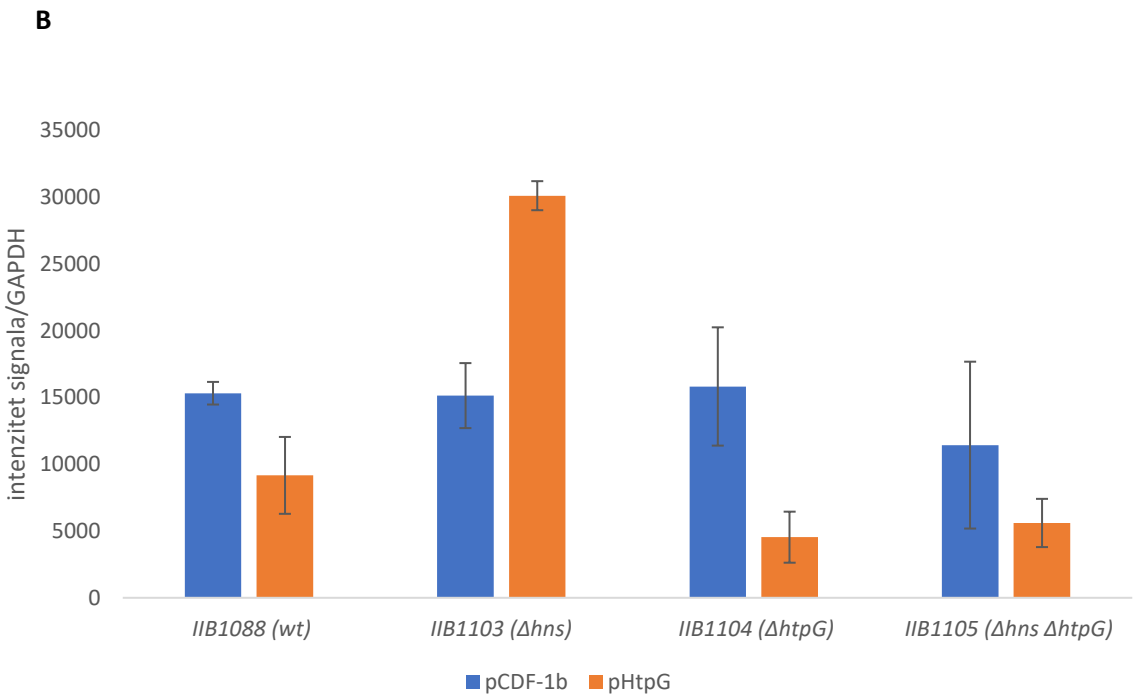
B




**Slika 8.** Analiza izolata ukupnih proteina primjenom metode *Western blot*. Navedeni izolati proteina sadrže detektirani protein Cas3 i kontrolni protein GAPDH iz bakterijskih sojeva IIB1088 (*wt*), IIB1103 (Δ*hns*), IIB1104 (Δ*htpG*) i IIB1105 (Δ*hns* Δ*htpG*) koji su transformirani s praznim vektorom pCDF-1b i pHtpG te uzgojeni preko noći pri: A) 30 ˚C B) 37 ˚C. Marker 1 označen je *Unstained Protein Molecular Weight Marker* kod kojega je vidljiva vrpca na veličini od 75 kDa, a marker 2 označen je *Precision Plus Protein All Blue Standards* kod kojeg se vidljiva vrpca nalazi na veličini koja odgovara 116 kDa. Proteini na membrani na koje su se vezala antitijela anti-His te primarna i sekundarna anti-rabbit GAPDH antitijela detektirana su kemiluminiscentno.

A






**Slika 9.** Srednja vrijednost normaliziranog intenziteta signala proteinskih vrpci eksprimiranog Cas3 koja je normalizirana prema najučestalijoj vrijednosti signala proteinskih vrpci GAPDH. Intenzitet signala proteinskih vrpci proteina Cas3 izoliranog iz stanica uzgojenih pri: A) 30 ˚C B) 37 ˚C.

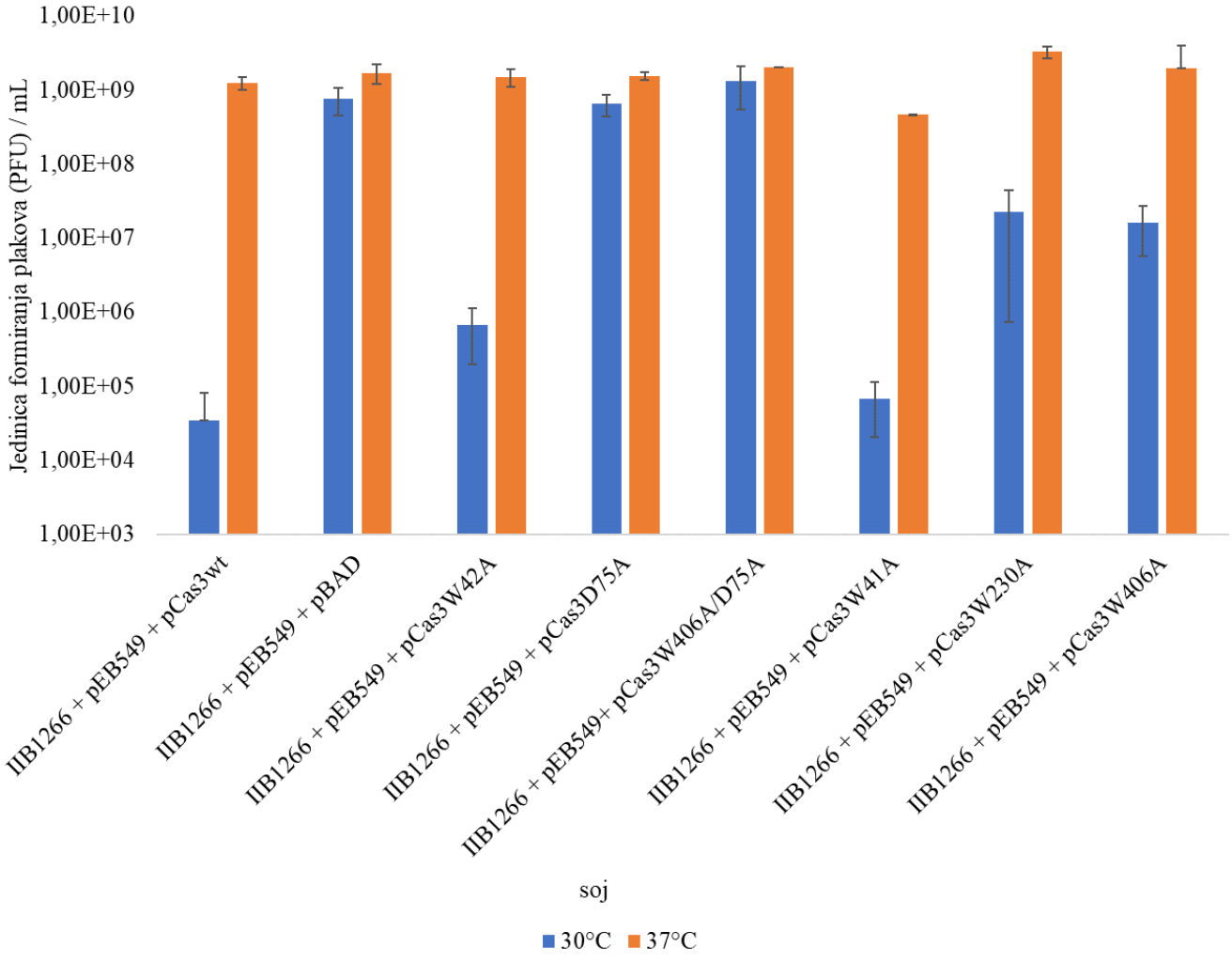
Intenziteti signala vrpci proteina Cas3 iz sojeva uzgojenih s i bez plazmida pHtpG pri temperaturi od 30 °C su jako varirali između pokusa, pa razlika vjerojatno nije statistički značajna. Za razliku od intenziteta signala vrpci proteina Cas3 pri 30 °C, ekspresija HtpG s plazmida na 37 °C smanjila je intenzitet signala vrpci proteina Cas3 za oko dva puta u svim sojevima osim u soju IIB1103 s mutacijom Δ*hns*. Općenito su intenziteti signala za protein Cas3 bez pHtpG bili nešto niži na 30°C u odnosu na 37°C, naročito za sojeve divljeg tipa IIB1088 i Δ*hns* Δ*htpG* (IIB1105). Možemo zaključiti da su najveće razlike u količini proteina Cas3 pri temperaturi od 30 °C povezane s genotipom sojeva, iako su svi sojevi imali gen *cas3* pod inducibilnim promotorom.

### 3.2. Utjecaj šaperona HtpG na aktivnost proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi *in vivo*

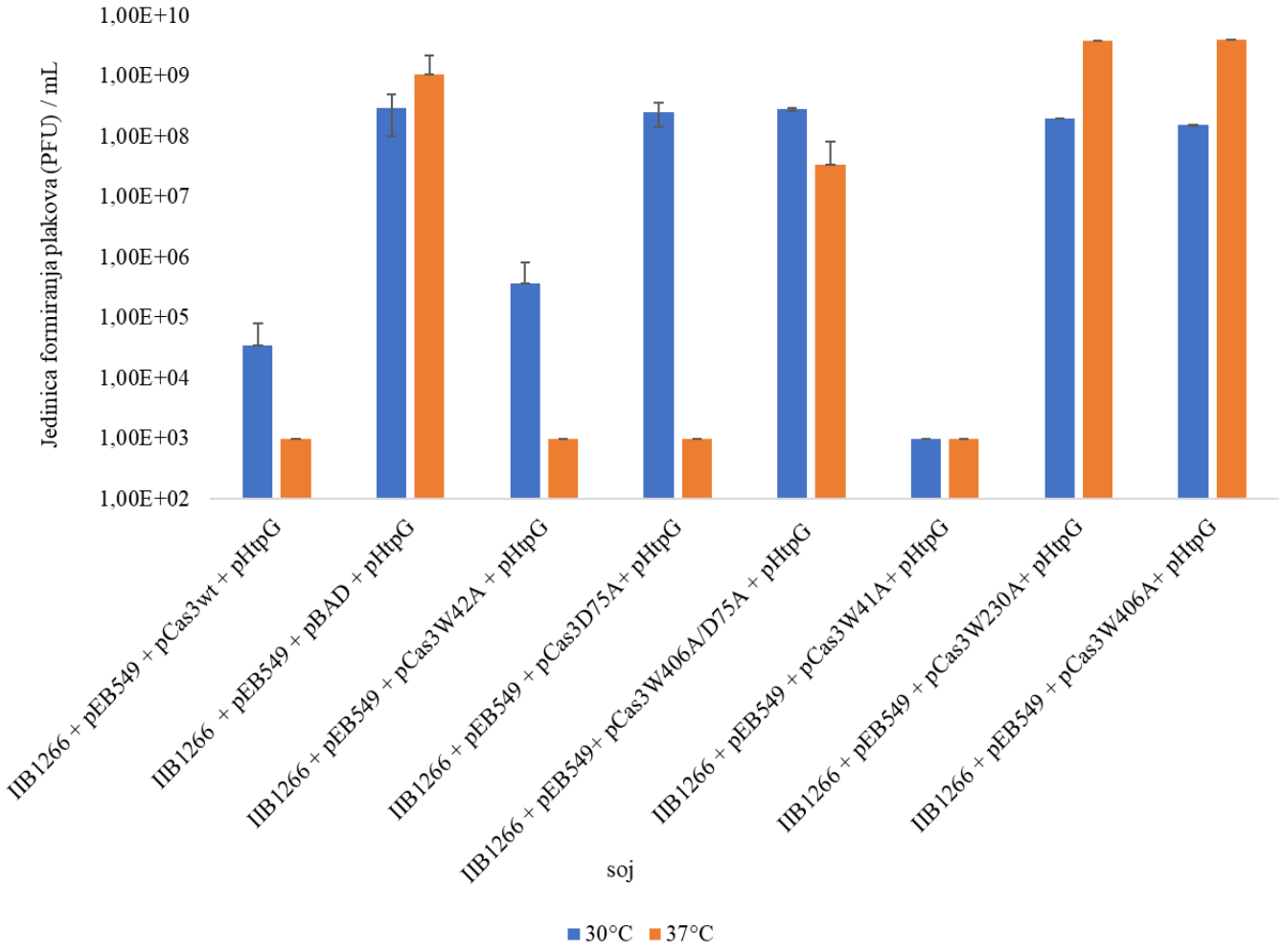
Metodom zasađivanja faga λ istraživalo se ima li šaperon HtpG utjecaj i na konformacijske promjene i temperaturno ovisnu aktivnost proteina Cas3. U tu svrhu napravljeni su točkasti mutanti u kojima su triptofani i aspartati gena *cas3* u četiri različite α-zavojnice zamijenjeni u alanine (W u A i D u A). Odabrane su one zavojnice (triptofani u njima) za koje se procijenilo da bi mogli utjecati na različito smatanje proteina Cas3 pri različitim temperaturama inkubacije. Iz literature su poznati točkasti mutanti proteina Cas3 u nukleaznom centru (Cas3D75A ili Cas3K78L) ili mutanti u ATP-aznoj/helikaznoj aktivnosti (Cas3K320L) koji kodiraju za protein Cas3 bez zahvaćenih enzimatskih aktivnosti (Ivančić-Baće i sur. 2013). Za ovo istraživanje su napravljeni sljedeći mutanti: Cas3W41A, Cas3W42A, Cas3D75A, Cas3W406A/D75A, Cas3W230A i Cas3W406A.

Prvo je korišten je soj IIB1266 (Tablica 1.) koji sadrži dvije anti-lambda razmaknice λc i λT3 u lokusu CRISPR te je transformiran s dva, odnosno tri plazmida (Tablica 2.): plazmidom pEB549 koji sadrži gene za proteinski kompleks Cascade, plazmidima s i bez gena *cas3* (pBad - prazan vektor, pAH4 (pCas3 - divlji tip), pCas3W41A (pW41A), pCas3W42A (pDM6), pCas3D75A (pDM7), pCas3W406A/D75A (pDM8), pCas3W230A (pIIB37), pCas3W406A (pIIB39) te plazmidom s genom za šaperon HtpG (pHtpG). Sve prethodno navedene mutacije nalaze se u HD nukleaznoj domeni proteina Cas3, osim mutacije Cas3W406A koja se nalazi u SF2 helikaznoj domeni. Sojevi koji nisu transformirani plazmidom pHtpG smatrani su „normalno“ početno stanje. Decimalna razrjeđenja faga λ nanesena su na bakterijske livade transformiranih bakterijskih sojeva, a zatim su stavljene na prekonoćnu inkubaciju pri 30 °C i 37 °C. Rezultati su prikazani na **Slici 10** i **Slici 11**. Očekivano, mutni plakovi kod kojih se nisu vidjeli pojedinačni plakovi pojavili su se samo pri najmanjem decimalnom razrjeđenju faga na bakterijskim livadama soja IIB1266 s pCascade (pEB549) i s pCas3 (pAH4) na 30 °C (procjena na ~$10^3$), dok je velik broj pojedinačnih plakova uočen (~$10^9$) na 37 °C. Dodatkom plazmida pHtpG broj plakova na 37 °C smanjio se što ukazuje da su bakterije sa suviškom šaperona HtpG postale otporne na infekciju fagom λ na 37 °C. Velik broj plakova je uočen na obje temperature kad je umjesto pCas3 dodan prazan plazmid pBad (negativna kontrola) i dodatak pHtpG nije smanjio broj plakova što je očekivano jer je protein Cas3 ključan u zaštiti bakterija od infekcije fagima. Slično negativnoj kontroli, velik broj plakova je uočen na obje temperature u točkastim mutantima *cas3* u kojima je inaktiviran nukleazni centar, Cas3D75A i Cas3W406A/D75A. Dodatak pHtpG smanjio je broj plakova u mutantu Cas3D75A na 37 °C, a nije na 30 °C, što je neobičan i neočekivan rezultat (**Slika 11**). Mutanti Cas3W41A i Cas3W42A bili su po broju

plakova slični bakterijama s divljim tipom pCas3 te je dodatak pHtpG i njima smanjio broj plakova na 37 °C (**Slika 10 i 11**). Broj plakova u mutantima Cas3W230A i Cas3W406A na 30 °C bio je ~ $10^3$ puta veći u odnosu na divlji tip Cas3, i sličan onom na 37 °C što ukazuje na smanjenu aktivnost mutiranih proteina Cas3. Neobično, dodatkom plazmida pHtpG broj plakova se povećao za ~ 10 puta na 30 °C umjesto da se smanjio, a broj plakova se povećao i na 37 °C. Kako su rezultati broja plakova, odnosno otpornosti na infekciju fagima s dva, a potom i tri plazmida znali biti nepouzdani i nekonzistentni napravljeni su bakterijski sojevi gdje su točkaste mutacije unesene u gen *cas3* u bakterijskom kromosomu (**Tablica 1**).



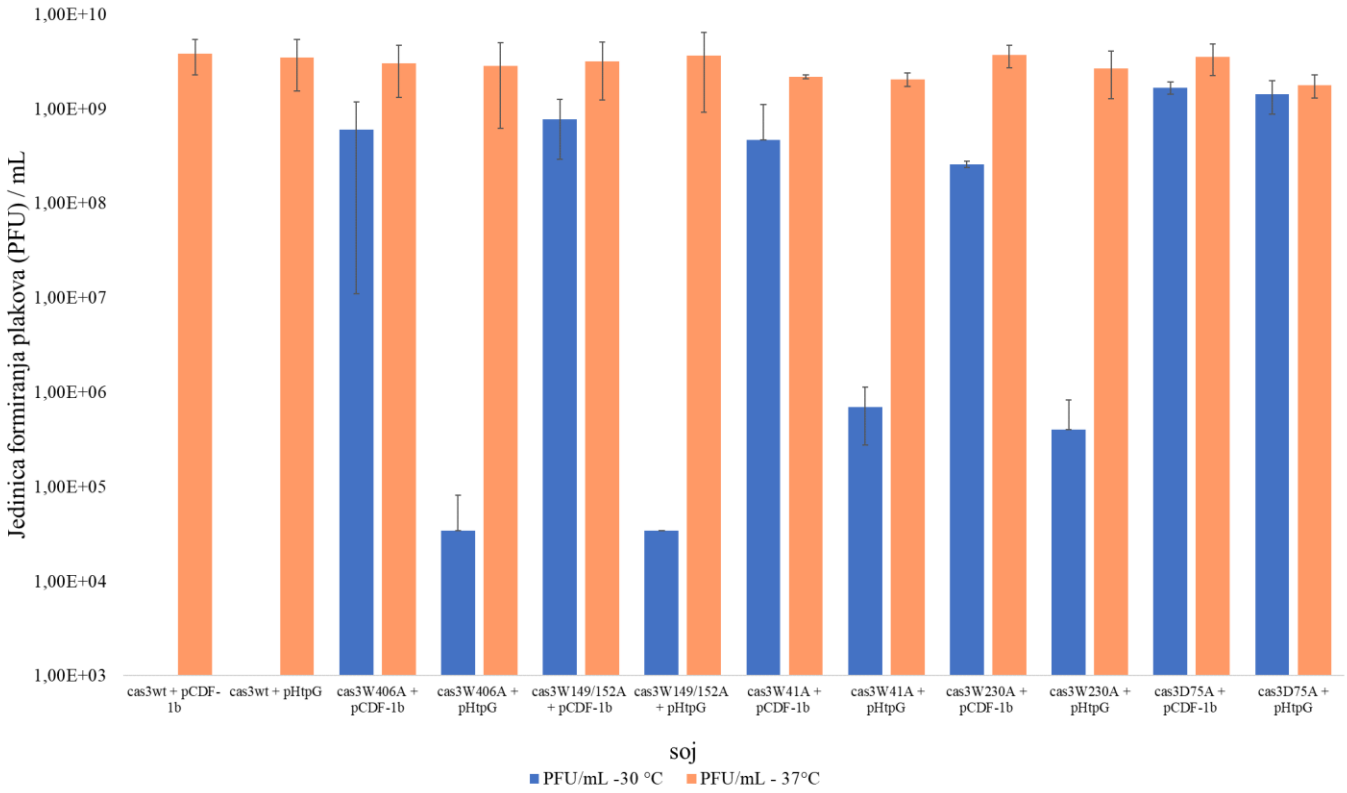

**Slika 10.** Jedinica formiranja plakova (PFU/mL) soja IIB1266 transformiranog plazmidima pEB549 (pCascade), pBad - prazan vektor, pAH4 (pCas3 - divlji tip), pCas3W41A (pW41A), pCas3W42A (pDM6), pCas3D75A (pDM7), pCas3W406A/D75A (pDM8), pCas3W230A (pIIB37) i pCas3W406A (pIIB39) inficiranog decimalnim razrjeđenjima faga λ ($10^{-3}$ do $10^{-7}$) te inkubiranog pri 30 °C i 37 °C. Dobivene vrijednosti temelje se na tri provedena nezavisna eksperimenta.




**Slika 11.** Jedinica formiranja plakova (PFU/mL) soja IIB1266 transformiranog plazmidima pEB549 (pCascade), pBad - prazan vektor, pAH4 (pCas3 - divlji tip), pCas3W41A (pW41A), pCas3W42A (pDM6), pCas3D75A (pDM7), pCas3W406A/D75A (pDM8), pCas3W230A (pIIB37), pCas3W406A (pIIB39) te pHtpG, inficiranog decimalnim razrjeđenjima faga λ ($10^{-3}$ do $10^{-7}$) te inkubiranog pri 30 °C i 37 °C. Dobivene vrijednosti temelje se na tri provedena nezavisna eksperimenta.

Početni soj IIB1309 (od kojeg su napravljeni svi točkasti mutanti) ima iste anti-lambda razmaknice u lokusu CRISPR kao soj IIB1266, ali za aktivaciju sustava CRISPR-Cas ima mutaciju u genu *hns* koja omogućava ekspresiju svih gena sustava CRISPR-Cas u fiziološkim količinama (za razliku od ekspresije s plazmida kad su proteini u suvišku). Bakterijski sojevi IIB1342, IIB1343, IIB1344, IIB1345 i IIB1346 (**Tablica 1**) su derivati ovog soja i napravljeni su metodom zamjene gena (izrada ovih mutanata nije dio ovog diplomskog rada).

Soj IIB1309 ima sve gene sustava CRISPR-Cas aktivne i, u skladu s prethodnim istraživanjima, s praznim plazmidom pCDF-1b broj plakova na 30 °C bio je ~ $10^6$ puta manji u odnosu na 37 °C (**Slika 12**). Dodatak plazmida pHtpG međutim nije smanjio broj plakova na 37 °C kao u pokusu s 3 plazmida (**Slika 10, 11 i 12**). Nasuprot, svi istraživani točkasti kromosomski mutanti IIB1342 (Cas3W406A), IIB1343 (Cas3W149/152A), IIB1344 (Cas3W41A), IIB1345 (Cas3W230A) i IIB1346 (Cas3D75A) s plazmidom pCDF-1b imali su ~5 x $10^5$ veći broj plakova u odnosu na soj IIB1309 na 30 °C i oko 10 puta manji u odnosu na 37 °C. Nešto manji broj plakova na 30 °C mogući je efekt temperature na efikasnost stvaranja virusnih čestica. Ekspresija šaperona HtpG s plazmida pHtpG u svim mutantima osim Cas3D75A, dovela je do smanjenja broja plakova na 30 °C, ali nije na 37 °C (**Slika 12**).




**Slika 12.** Jedinica formiranja plakova (PFU/mL) soja IIB1309 (*wt*), IIB1342 (*cas3W406A*), IIB1343 (*cas3W149/152A*), IIB1344 (*cas3W41A*), IIB1345 (*cas3W230A*) i IIB1346 (*cas3D75A*) transformiranog plazmidima pCDF-1b i pHtpG, inficiranog decimalnim razrjeđenjima faga λ ($10^{-3}$ do $10^{-7}$) te inkubiranog pri 30 °C i 37 °C. Dobivene vrijednosti temelje se na tri provedena nezavisna eksperimenta.

Kako bih provjerila može li šaperon HtpG smanjiti broj plakova u točkastim mutantima pri temperaturi od 35°C, na kojoj su prethodna istraživanja pokazala da se gubi otpornost na infekciju fagom λ zbog gubitka aktivnosti proteina Cas3 (diplomski rad, Čulo 2017.), broj

plakova je određen na livadama sojeva IIB1309, IIB1342, IIB1343, IIB1344, IIB1345 i IIB1346 s plazmidima pCDF-1b i pHtpG koje su zatim inkubirane preko noći pri temperaturi od 35 °C. Dobiveni rezultati prikazani su u **Tablici 13**. Prema rezultatima prikazanim u **Tablici 13**, možemo uočiti da je ostao visok broj plakova, odnosno da šaperon HtpG nije mogao vratiti otpornost na infekciju fagom λ u niti jednom istraživanom bakterijskom soju pri temperaturi inkubiranja od 35 °C.

**Tablica 13.** Broj nastalih plakova (PFU/mL) na bakterijskoj livadi sojeva IIB1309, IIB1342, IIB1343, IIB1344, IIB1345 i IIB1346 s praznim vektorom pCDF-1b i plazmidom pHtpG koji su inkubirani preko noći pri 35°C Dobivene vrijednosti temelje se na jednom provedenom eksperimentu.

| **Bakterijski soj** | **PFU/mL** |
|---|---|
| IIB1309 + pCDF-1b | $1{,}64 \cdot 10^9$ |
| IIB1309 + pHtpG | $1{,}64 \cdot 10^9$ |
| IIB1342 + pCDF-1b | $2{,}54 \cdot 10^9$ |
| IIB1342 + pHtpG | $1{,}00 \cdot 10^8$ |
| IIB1343 + pCDF-1b | $3{,}92 \cdot 10^9$ |
| IIB1343 + pHtpG | $2{,}34 \cdot 10^9$ |
| IIB1344 + pCDF-1b | $4{,}16 \cdot 10^9$ |
| IIB1344 + pHtpG | $5{,}13 \cdot 10^9$ |
| IIB1345 + pCDF-1b | $1{,}42 \cdot 10^9$ |
| IIB1345 + pHtpG | $3{,}15 \cdot 10^9$ |
| IIB1346 + pCDF-1b | $4{,}83 \cdot 10^9$ |
| IIB1346 + pHtpG | $2{,}45 \cdot 10^9$ |

## 4. RASPRAVA

Dosadašnja istraživanja pokazala su da je obrana bakterija sustavom CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E. coli* protiv infekcije fagom λ ovisna o temperaturi. Naime, stanice bez gena *hns* (represora sustava CRISPR-Cas) i s anti-lambda razmaknicama bile su rezistentne na infekciju fagom λ na 30 °C, ali osjetljive na 37 °C. Iste stanice postale su rezistentne na infekciju fagom λ pri 37 °C samo uz suvišak proteina Cas3 eksprimiranog s plazmida. To je ukazalo da su stanice osjetljive na infekciju uslijed ili smanjene količine ili nestabilnosti proteina Cas3, a za protein Cas3 je zaključeno da je limitirajući faktor (Majsec i sur. 2016).

U ovom radu je prvo istraživana mogućnost da šaperon HtpG može utjecati na količine proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi inkubiranja. Prethodna istraživanja u grupi izv. prof. dr. sc. Ivančić Baće su pokazala da razlike u količinama proteina Cas3 ne ovise o temperaturi inkubiranja, već genotipu istraživanih sojeva. Naime, količine proteina Cas3 u mutantu Δ*hns* u odnosu na divlji tip bile su oko 10 puta veće na 30 °C, i oko 3 puta na 37 °C (diplomski rad, Macuka 2019). Korišteni su isti bakterijski sojevi kao u ovom radu, gdje se gen *cas3* inducirao dodavanjem L-arabinoze. Kako ekspresija gena *cas3* nije ovisila o mutaciji Δ*hns* očekivala se ista količina proteina Cas3 u svim sojevima. U mojem istraživanju potvrdila sam da su količine proteina Cas3 veće u mutantu Δ*hns* u odnosu na divlji tip na 30 °C temperature inkubiranja bez dodatka šaperona HtpG (Slika 9A), ali ne i na 37 °C. Moji rezultati su pokazali da su količine proteina Cas3 na 37 °C bile slične u svim istraživanim sojevima (Slika 9B). Mogući razlog različitih rezultata su tehnički detalji u samoj izvedbi pokusa – broj sati rasta stanica i različiti inkubatori koji su korišteni za uzgoj stanica. Iako je moje istraživanje rađeno na isti način, uz dodanu kontrolu kako bih bila sigurna u nanesene količine proteina, rezultati su često jako varirali što je vidljivo iz greške. Povećanom ekspresijom šaperonom HtpG s plazmida, količina proteina Cas3 se povećala 2-3 puta u svim sojevima osim Δ*htpG* na 30 °C, dok se količina proteina Cas3 smanjila na 37 °C osim u soju Δ*hns* (Slika 9A i 9B). To je u suprotnosti s prethodnim istraživanjima Yosef i sur. (2011) koja su pokazala da se količina eksprimiranog proteina Cas3 trostruko povećala u Δ*htpG* stanicama u kojima je eksprimiran HtpG s plazmida na 37 °C. U tom pokusu protein Cas3 je također bio eksprimiran s plazmida, a ne s kromosoma, koristili su logaritamske, a ja stacionarne stanice, pa je teško usporediti moje i rezultate od Yosef i sur. 2011. Yosef i sur. 2011 nisu istraživali utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 na 30 °C pa te rezultate ne mogu usporediti. Ukratko, moji rezultati ukazuju da šaperon HtpG može povećati količine proteina Cas3 samo na 30 °C što je u skladu s prethodnim

istraživanjima rezistencije na infekciju fagom λ, gdje prekomjerna ekspresija HtpG s plazmida nije mogla nadomjestiti limitirajuće količine funkcionalno aktivnog Cas3 na 37 ˚C (Majsec i sur. 2016).

Druga mogućnost, da dolazi do gubitka aktivnosti proteina Cas3 na 37 °C uslijed promjene konformacije u nepoznatoj α-zavojnici, pokazano je biofizičkom analizom pročišćenog proteina Cas3 (cirkularnim dikroizmom) i potvrđeno *in vivo* infekcijom stanica fagom λ (Čulo 2017). Zaključeno je da dolazi do promjene konformacije proteina Cas3 pri temperaturi od 35 °C. Kao moguće α-zavojnice, odabrane su one koje se nalaze na granici između nukleazne i helikazne domene proteina Cas3 te su u njima uvedene točkaste mutacije mjesno-specifičnom mutagenezom iz triptofana (W) u alanin (A). U ovom radu je za negativnu kontrolu korišten i mutant Cas3D75A. Iz literature je poznato da Cas3 gubi ulogu u degradaciji ciljne DNA kada je mutirano mjesto D75A u nukleaznoj domeni proteina (Mulepati i sur. 2013), dok svi ostali analizirani točkasti mutanti nisu istraživani. U prvom pristupu istraživanja utjecaja točkastih mutanata Cas3 na rezistenciju na infekciju fagom λ, točkasti mutanti su bili na plazmidu. Stoga su i geni za kompleks Cascade morali biti eksprimirani u suvišku, dakle s plazmida (Slika 10. i 11.).

Korišten je soj IIB1266 koji sadrži anti-lambda razmaknice u lokusu CRISPR i u prisustvu oba plazmida uočen je mali broj plakova na 30 °C što označava da je protein Cas3 divljeg tipa aktivan. U skladu s prethodnim istraživanjima, bez šaperona HtpG plakovi su se u većem broju pojavili na 37 °C što ukazuje na gubitak aktivnosti proteina Cas3 (Majsec i sur. 2016). Nasuprot, svi točkasti mutanti osim Cas3W41A bez šaperona HtpG (Cas3W230A, Cas3W406A, Cas3D75A, Cas3W42A, i Cas3W406A/D75A) imali su veći broj plakova na obje temperature što ukazuje da su točkasti mutanti izgubili aktivnost na 30 °C. Veći broj plakova uočen je kod mutanata Cas3D75A i Cas3W41A/D75A u kojima je inaktiviran nukleazni centar. Neobično, veći broj plakova pojavio se i kod mutanata Cas3W230A i Cas3W406A pri 30 °C, što upućuje na gubitak aktivnosti proteina Cas3 i nije u skladu se prethodnim istraživanjima (Pandžić 2019., diplomski rad). Neočekivano, uz prisutnost šaperona HtpG eksprimiranog s plazmida broj plakova se smanjio u divljem tipu i kod pojedinih mutanata (Cas3D75A, Cas3W42A i Cas3W41A) pri temperaturi od 37 °C na razinu jednaku onoj pri 30 °C (slika 11.), ali nije u nekim drugim mutantima - Cas3W230A i Cas3W406A (slika 11.). To upućuje da je šaperon HtpG vratio aktivnost, osim divljem tipu, čak i proteinu Cas3 mutiranom u nukleaznom centru (Mulepati i sur. 2013) pri 37 °C što je neobičan rezultat i nije u skladu s prethodno dobivenim rezultatom (Majsec i sur. 2016). Neobični i nekonzistentni rezultati zasađivanja

plakova na soju IIB1266 s tri plazmida pri 37 °C, vjerojatno su rezultat nefizioloških količina pojedinih proteina što čini rezultate pokusa nepouzdanim.

Iz tog razloga su napravljeni pokusi s kromosomskim točkastim mutantima *cas3*. Korišten je soj IIB1309 koji sadrži dvije razmaknice λT3 i λc s deletiranim genima *hns* i *cas1* što omogućuje ekspresiju svih *cas* gena s njihovih promotora u fiziološkim količinama. To bi omogućilo precizniji i pouzdaniji uvid u utjecaj točkastih mutacija, budući da su uvedene mutacije u kromosomu, za razliku od sustava s plazmidima. Kako je očekivano, u soju IIB1309 (divlji tip) broj plakova je manji na 30 °C, u odnosu na 37 °C, što pokazuje neaktivnost proteina Cas3 na 37 °C (slika 12.). Ovaj put svi istraživani točkasti mutanti Cas3W406A, Cas3W230A, Cas3W149/152A, Cas3W41A i Cas3D75A imali su veći broj plakova pri 30 °C i samo oko 10 puta manji u odnosu na 37 °C (slika 12.) što upućuje da su mutirani proteini Cas3 izgubili aktivnost na 30 °C. Zanimljivo, uz dodatak pHtpG broj plakova se smanjio pri 30 °C za ~$10^4$ – $10^5$ puta, gotovo na razinu sličnu onoj u soju IIB1309, osim kod mutanta Cas3D75A što je očekivano i u skladu s literaturom (Mulepati i sur. 2013). Drugim riječima, suvišak šaperona HtpG vratio je aktivnost točkastim mutantima Cas3 vjerojatno pomažući u smatanju i zauzimanju pravilne konformacije samo onim mutantima koji imaju aktivan nukleazni centar. Pozitivni efekt šaperona HtpG na pojavu plakova nisam uočila na 37 °C vjerojatno jer se promjena u konformaciji Cas3 mijenja na 35 °C, nakon čega suvišak HtpG nije u mogućnosti utjecati (Čulo 2017; Majsec i sur. 2016). To sam potvrdila velikim brojem plakova na svim bakterijskim sojevima s točkastim kromosomskim mutacijama u genu *cas3* kad su inkubirani pri 35 °C (Tablica 13).

Sumarno, dobiveni rezultati ukazuju da se u proteinu Cas3 vjerojatno doista događa suptilna konformacijska promjena u ovisnosti o temperaturi koja uzrokuje gubitak aktivnosti proteina Cas3 (diplomski rad, Čulo 2017). Tu suptilnu promjenu u konformaciji proteina Cas3 šaperon HtpG ne može suprimirati pri višim temperaturama, i njom su vjerojatno zahvaćene četiri α zavojnice u kojima se nalaze točkasti mutanti (Cas3W41A, Cas3W406A, Cas3W149/152A i Cas3W230A). To su α3-, α9-, α14- i α21- i nalaze se u kontaktu s jednolančanom DNA i vjerojatno imaju ulogu u vezanju ili cijepanju DNA što se tek treba eksperimentalno dokazati da bi se sa sigurnošću znao molekularni mehanizam temperaturne promjene (Huo i sur. 2014; Gong i sur. 2014). Buduća istraživanja potvrdit će molekularni mehanizam promjene aktivnosti proteina Cas3 u ovisnosti o temperaturi te uloge ovih zavojnica.

## 5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata u ovom radu može se zaključiti sljedeće:

1) Protein Cas3 obilježen histidinskim privjeskom na N-kraju uspješno je detektiran i kvantificiran u odnosu na kontrolni protein GAPDH primjenom metode *Western blot* u svim sojevima.

2) Uz prisutnost šaperona HtpG eksprimiranog s plazmida intenzitet signala proteinskih vrpci proteina Cas3 je oko 2-3 puta veći u sojevima *wt,* Δ*hns*, Δ*hns* Δ*htpG* osim u soju Δ*htpG* pri 30 °C. Količine proteina Cas3 uz suvišak šaperona HtpG smanjile su se pri 37 °C u svim sojevima osim Δ*hns* što upućuje da prekomjerna ekspresija šaperona HtpG može povećati količine proteina Cas3 samo na 30 °C.

3) Istraživanje aktivnosti točkastih mutanata Cas3 u zaštiti bakterija od infekcije fagom λ koristeći sustav ekspresije s više plazmida nije pouzdano i dobivaju se nelogični rezultati.

4) Točkasti mutanti Cas3W41A, Cas3W406A, Cas3W149/152A i Cas3W230A imali su u odnosu na divlji tip veći broj plakova na 30 °C, sličan onom na 37 °C i mutantu Cas3D75A, što upućuje da su izgubili aktivnost na 30 °C.

5) Šaperon HtpG eksprimiran s plazmida smanjio je broj plakova na 30 °C kromosomskim točkastim mutantima Cas3W41A, Cas3W406A, Cas3W149/152A i Cas3W230A, a nije Cas3D75A. To upućuje da suvišak šaperona HtpG može povratiti aktivnost onim mutantima Cas3 kojima nije zahvaćen nukleazni centar.

5) Šaperon HtpG eksprimiran s plazmida nije mogao smanjiti broj plakova, odnosno povratiti aktivnosti točkastim mutantima Cas3W41A, Cas3W406A, Cas3W149/152A i Cas3W230A (ali ni divljem tipu) na 35 °C ili 37 °C. To upućuje da pri 35 °C dolazi do konformacijske promjene u proteinu Cas3 na koju šaperon HtpG ne može utjecati.

## 6. LITERATURA


Abudayyeh, O. O. i sur. (2016): C2c2 is a single-component programmable RNAguided RNA-targeting CRISPR effector. Science **353:** 557.

Anantharaman, V., Makarova, K.S., Burroughs, A.M., Burroughs, M.A., Koonin. E.V. i Aravind, L (2013): Comprehensive analysis of the HEPN superfamily: identification of novel roles in intra-genomic conflicts, defense, pathogenesis and RNA processing. Biol Direct **8:** 15.

Bardwell JC, Craig EA (1987). Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci USA **84**:5177–518.

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.

Beloglazova, N., Petit, P., Flick, R., Brown, G., Savchenko, A., Yakunin, A. F. (2011): Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference. EMBO J. **30**: 4616–4627.

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.

Čulo A. (2017): Mehanizam temperaturne osjetljivosti proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.

Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C.M., Gonzales K., Chao Y., Pirzada Z.A., Eckert M.R., Vogel J., Charpentier E. (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. Nature **471**: 602–607.

Garneau, J., Dupuis, M., Villion, M., Romero, D.A., Barrangou, R., Boyaval, P., Fremaux, C., Horvath, P., Magadán, A.H., Moineau, S. (2010): The CRISPR/Cas bacterial immune system cleaves bacteriophage and plasmid DNA. Nature **468**, 67–71.

Gesner EM, Schellenberg MJ, Garside EL, George MM, Macmillan AM. (2011): Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway. Nature structural & molecular biology. **18**: 688–692.

Gong B., Shin M., Sun J., Jung C.-H., Bolt E.L., Oost J. van der, Kim J.-S. (2014): Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. Proc. Natl. Acad. Sci. **111**: 16359–16364.

Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Qimron, U. (2012): Experimental definition of a clustered regularly interspaced short palindromic duplicon in Escherichia coli. J. Mol. Biol. **423**: 14–16.

He, Liu; St. John James, Michael; Radovcic, Marin; Ivancic-Bace, Ivana; Bolt, Edward L. (2020): Cas3 Protein—A Review of a Multi-Tasking Machine. Genes **11**: 208.

Heler, R., Samai, P., Modell, J. W., Weiner, C., Goldberg, G. W., Bikard, D., & Marraffini, L. A. (2015). Cas9 specifies functional viral targets during CRISPR-Cas adaptation. Nature, **519**: 199–202.

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 U S A **111**: 6618-6623.

Hooton, S. P., Connerton, I. F. (2015): Campylobacter jejuni acquire new host-derived CRISPR spacers when in association with bacteriophages harboring a CRISPR-like Cas4 protein. Frontiers in microbiology, **5**: 744.

Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. Science **315**:1709-1712.

Horvath P., Romero D.A., Coûté-Monvoisin A.C., Richards M., Deveau H., Moineau S., Boyaval P., Fremaux C., Barrangou R. (2008): Diversity, activity, and evolution of CRISPR loci in *Streptococcus thermophilus*. J. Bacteriol. **190**: 1401–1412.

Hsu P.D., Lander E.S., Zhang F. (2014): Development and applications of CRISPR-Cas9 for genome engineering. Cell **157**: 1262-1278.

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**: 771–777.

Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakatura A. (1987): Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. J. Bacteriol. **169**: 5429–5433.

Jackson R.N., Golden S.M., van Erp P.B., Carter J., Westra E.R., Brouns S.J., van der Oost J., Terwilliger T.C., Read R.J., Wiedenheft B. (2014): Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from Escherichia coli. Science. **345**:1473–1479.

Jansen R., Embden J.D.A. Van, Gaastra W., Schouls L.M. (2002): Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol. Microbiol. **43**: 1565–1575.

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.

Jore M.M., Lundgren M., van Duijn E., Bultema J.B., Westra E.R., Waghmares S.P., Wiedenheft B., Pul Ü., Wurm R., Wagner R., Beijer M.R., Barendregt A., Zhou K., Snijders .P.L., Dickman M.J., Doudna J.A., Boekema E.J., Heck A.J.R., van der Oost J., Brouns S.J.J. (2011): Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade. Nat Struct Mol Biol **18**: 529-537.

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

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.

Macuka, M. (2019): Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δ*hns* i Δ*htpG* bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta (Diplomski rad)

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

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: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. Biol Direct **1**:7.

Makarova K.S., Haft D.H., Barrangou R., Brouns S.J.J., Charpentier E., Horvath P., Moineau S., Mojica F.J.M., Wolf Y.I., Yakunin A.F., Oost J. van der, Koonin E. V. (2011): Evolution and classification of the CRISPR–Cas systems. Nat. Rev. Microbiol. **9**: 467–477.

Makarova K.S., Koonin E. V. (2015): Annotation and classification of CRISPR-Cas systems. Methods Mol. Biol. **1311**: 47–75.

Makarova, K.S., Wolf, Y.I., Iranzo, J., Shmakov, S.A., Alkhnbashi, O.S., Brouns, S.J.J., Charpentier, E., Cheng, D., Haft, D.H., Horvath, P., Moineau, S., Mojica, F.J.M., Scott, D., Shah, S.A., Siksnys, V., Terns, M.P., Venclovas, Č., White, M.F., Yakunin, A.F., Yan, W., Zhang, F., Garrett, R.A., Backofen, R., van der Oost, J., Barrangou R., Koonin, E.V. (2020): Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants. Nat Rev Microbiol **18**: 67–83 .

Marraffini L.A., Sontheimer E.J. (2010): CRISPR interference: RNA-directed adaptive immunity in bacteria and archaea. Nat Rev Genet **11**: 181–190.

Meeske, A. J., Nakandakari-Higa, S. i Marraffini, L. A. (2019): Cas13-induced cellular dormancy prevents the rise of CRISPR-resistant bacteriophage. Nature, **570**: 241–245.

Mojica F.J.M., Díez-Villaseńor C., García-Martínez J., Soria E. (2005): Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. J Mol Evol **60**: 174-182.

Mojica F.J.M., Díez-Villaseńor C., García-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. Microbiology **155**: 733-740.

Mulepati, S., and 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.

Mulepati, S., Orr, A., and Bailey, S. (2012): Crystal structure of the largest subunit of a bacterial RNA-guided immune complex and its role in DNA target binding. J. Biol. Chem. **287**: 22445–22449.

Mulepati S, Bailey S. (2013): In vitro reconstitution of an Escherichia coli RNA-guided immune system reveals unidirectional, ATP-dependent degradation of DNA target. The Journal of biological chemistry.; **288**: 22184–22192.

Pandžić M. (2019): Utjecaj točkastih mutacija na aktivnost i sekundarnu strukturu proteina Cas3 iz bakterije *Escherichia coli*. Diplomski rad. Zagreb: Prirodoslovno-matematički fakultet.

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.

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.

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**: 1495–1512.

Samai P., Pyenson N., Jiang W., Goldberg G.W., Hatoum-Aslan A., Marraffini L.A. (2015): Co-transcriptional DNA and RNA cleavage during type III CRISPR-Cas immunity. Cell **161**: 1164–1174.

Sashital, D. G., Jinek, M., & Doudna, J. A. (2011): An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3. Nature structural & molecular biology, **18**: 680–687.

Sashital, D. G., Wiedenheft, B., and Doudna, J. A. (2012): Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. Mol. Cell **46**: 606–615.

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.

Shmakov S., Abudayyeh O.O., Makarova K.S. i sur. (2015): Discovery and Functional Characterization of Diverse Class 2 CRISPR-Cas Systems. Mol Cell. **60:** 85-397.

Sinkunas, T., Gasiunas, G., Fremaux, C., Barrangou, R., Horvath, P., and 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.

Sinkunas, T., Gasiunas, G., Waghmare, S. P., Dickman, M. J., Barrangou, R., Horvath, P., Siksnys, V. (2013): In vitro reconstitution of Cascade-mediated CRISPR immunity in Streptococcus thermophilus. The EMBO journal, **32**: 385–394.

Strich, J. R., & Chertow, D. S. (2019): CRISPR-Cas Biology and Its Application to Infectious Diseases. Journal of clinical microbiology, **57**: e01307-18.

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

Wiedenheft B., Lander G.C., Zhou K., Jore M.M., Brouns S.J., van der Oost J., Doudna J.A., Nogales E. (2011): Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system. Nature. **477**: 486–489.

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**: 6397

Yan W.X., Hunnewell P., Alfonse L.E., Carte J.M., Keston-Smith E., Sothiselvam S., Garrity A.J., Chong S., Makarova K.S., Koonin E. V, Cheng D.R., Scott D.A. (2019): Functionally diverse type V CRISPR-Cas systems. Science **363**: 88–91.

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.

Zetsche B., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Slaymaker I.M., Makarova K.S., Essletzbichler P., Volz S.E., Joung J., Oost J. van der, Regev A., Koonin E. V, Zhang F. (2015): Cpf1 is a single RNA-guided endonuclease of a class 2 CRISPR-Cas system. Cell **163**: 759–771.

# ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Mihaela Pravica

OBRAZOVANJE

**2015 – 2020 Integrirani preddiplomski i diplomski studij biologije i kemije**
Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu (Hrvatska)

ISKUSTVO

**2019 – 2020 Izrada diplomskog rada**
Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Zavod za molekularnu biologiju, Prirodoslovno-matematički fakultet, Sveučilište u Zagrebu

**2019 – 2020 Studentski posao**
Translatus jezične usluge d.o.o, Zagreb (Hrvatska)

**2019 Laboratorijska stručna praksa**
Laboratorij za molekularnu genetiku, Institut Ruđer Bošković, Zagreb
Mentor: dr.sc. Helena Ćetković

PROJEKTI

**2019 - 2020 Projekt društveno korisnog učenja "U društvu mikroba"**
Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb (Hrvatska)
Mentor: doc. dr. sc. Silvija Černi

VOLONTIRANJE

**2020 Autorica materijala za nastavu na daljinu Škole za život**
Ministarstvo znanosti i obrazovanja

**2018 – 2019 Noć biologije**

**2017 – 2019 Autorica članaka u studentskom časopisu „In Vivo“**
Udruga studenata biologije na PMF-u

**2017 Smotra Sveučilišta u Zagrebuta**