

Utjecaj proteina DnaK na naivnu CRISPRCas adaptaciju u bakteriji Escherichia coli

Jurada, Mario

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:117144>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-24**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Mario Jurada

**Utjecaj proteina DnaK na naivnu CRISPR-
Cas adaptaciju u bakteriji *Escherichia coli***

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Mario Jurada

**The effect of DnaK protein on naïve
CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli***

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Molekularne biologije na zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Utjecaj proteina DnaK na naivnu CRISPR-Cas adaptaciju u bakteriji *Escherichia coli*

Mario Jurada

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

*Adaptivni imunosni sustav, CRISPR-Cas, moćno je oružje u obrani protiv invazivnih genetičkih elementa, poput bakteriofaga i plazmida. Efektivnost tog sustava uvelike ovisi o njegovoj mogućnosti raspoznavanja vlastite i strane DNA. Nakon prepoznavanja strane DNA, u procesu naivne adaptacije, kompleks Cas1–Cas2 iz strane DNA stvara razmaknice koje ugrađuje u Lokus CRISPR. Dugo vremena nije bilo poznato na koji način Cas1–Cas2 raspoznaje stranu od vlastite DNA. U nedavnim istraživanjima otkriveno je da protein DnaK, koji inače ima ulogu šaperona i jedan je od najvažnijih proteina toplinskog šoka, igra važnu ulogu u prostornoj i vremenskoj regulaciji naivne adaptacije. U ovom radu ponovljeni su neki od eksperimenata iz nedavnih istraživanja koji su dokazali utjecaj DnaK na aktivnost naivne adaptacije. Praćenjem efikasnosti naivne adaptacije u lizogenim sojevima *E. coli* pokazao sam da DnaK ima negativan utjecaj na naivnu adaptaciju, tj. da smanjuje stopu ugradnje novih razmaknica. Ti rezultati su u skladu s nedavnim istraživanjima koja sugeriraju da protein DnaK sprječava ugradnju vlastite DNA inhibicijom kompleksa Cas1–Cas2 prilikom naivne adaptacije.*

Ključne riječi: *E. coli*, CRISPR-Cas, naivna adaptacija, Cas1–Cas2, DnaK, bakteriofagi
(34 stranica, 5 slika, 12 tablica, 74 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The effect of DnaK protein on naïve CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli*

Mario Jurada

Rooseveltovej trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

*The adaptive immune system, CRISPR-Cas, is a powerful weapon in defense against invasive genetic elements such as bacteriophages and plasmids. The effectiveness of this system greatly depends on its ability to distinguish between self and foreign DNA. Upon recognizing foreign DNA, in the process of naïve adaptation, the Cas1–Cas2 complex generates spacers from foreign DNA, which are then incorporated into the CRISPR locus. For a long time, it was not known how Cas1–Cas2 distinguishes between foreign and self-DNA. Recent research has revealed that the protein DnaK, which normally acts as a chaperone and is one of the key heat shock proteins, plays an important role in spatial and temporal regulation of naïve adaptation. This study replicated some of the experiments from recent research, which demonstrated the impact of DnaK on the activity of naïve adaptation. By monitoring the efficiency of naïve adaptation in lysogenic strains of *E. coli*, I show that DnaK has a negative influence on naïve adaptation, i.e., it reduces the rate of incorporating new spacers. These results are consistent with recent research, where it is suggested that DnaK prevents acquisition of host DNA by inhibiting the Cas1–Cas2 complex during naïve adaptation.*

Keywords: *E. coli*, CRISPR-Cas, naïve adaptation, Cas1–Cas2, DnaK, bacteriophages
(34 pages, 5 figures, 12 tables, 74 references, original in: croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće

1 SADRŽAJ

2 Uvod	1
3 Materijali i metode	6
3.1 Bakterijski sojevi	6
3.2 Plazmidi	6
3.3 Bakterijski transformanti	7
3.4 Početnice za PCR	8
3.5 Hranjivi mediji i puferi	8
3.6 Metode rada s bakterijama.....	9
3.6.1 Uzgoj i pohrana bakterijskih sojeva	9
3.6.2. Test lizogenosti	9
3.6.3. Kemijska transformacija bakterijskih stanica	10
3.6.4. Subkultiviranje bakterijskih kultura	10
3.7 Metode rada s DNA	11
3.7.1. Priprema plazmida	11
3.7.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	11
3.7.3. Agarozna gel elektroforeza i pročišćavanje DNA	12
3.7.4. Restriksijska razgradnja, ligacija molekula DNA i provjera ugradnje	13
3.7.5. Određivanje efikasnosti naivne adaptacije	17
4 Rezultati	19
4.1 Konstrukcija plazmida pIIB46	19
4.2 Utjecaj proteina DnaK na naivnu adaptaciju	20
5 Rasprava	24
6 Zaključak	27
7 Literatura	28
8 Životopis	33

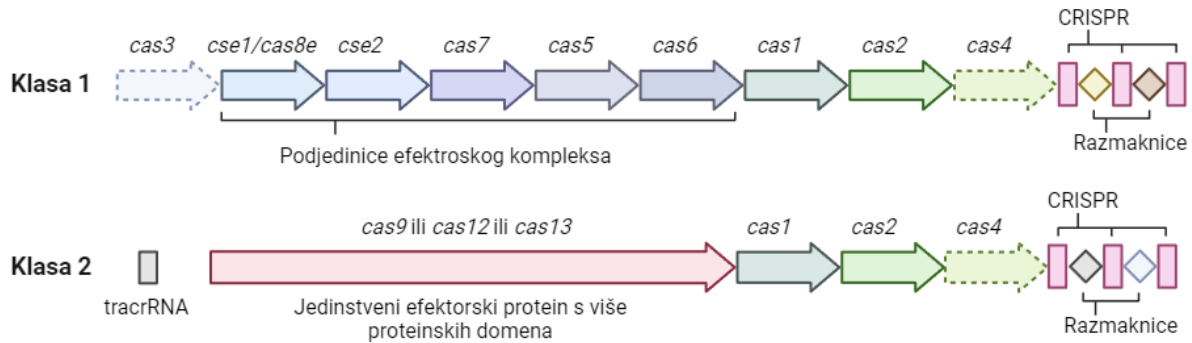
2 UVOD

Bakteriofagi (fagi) su virusi koji inficiraju prokariotske organizme, odnosno bakterije i arheje. Svaki dan ubiju 20 % svih oceanskih mikroorganizama (Suttle 2007), što stvara snažan selektivni pritisak za nastajanje obrambenih mehanizama. Sukladno tomu, u prokariotima su evoluirali raznoliki mehanizmi obrane protiv bakteriofaga (Hampton i sur. 2020; Tesson i sur. 2022). Među najbolje su istraženima površinsko isključivanje, restrikcijsko-modifikacijski sustav, abortivna infekcija i sustav CRISPR-Cas.

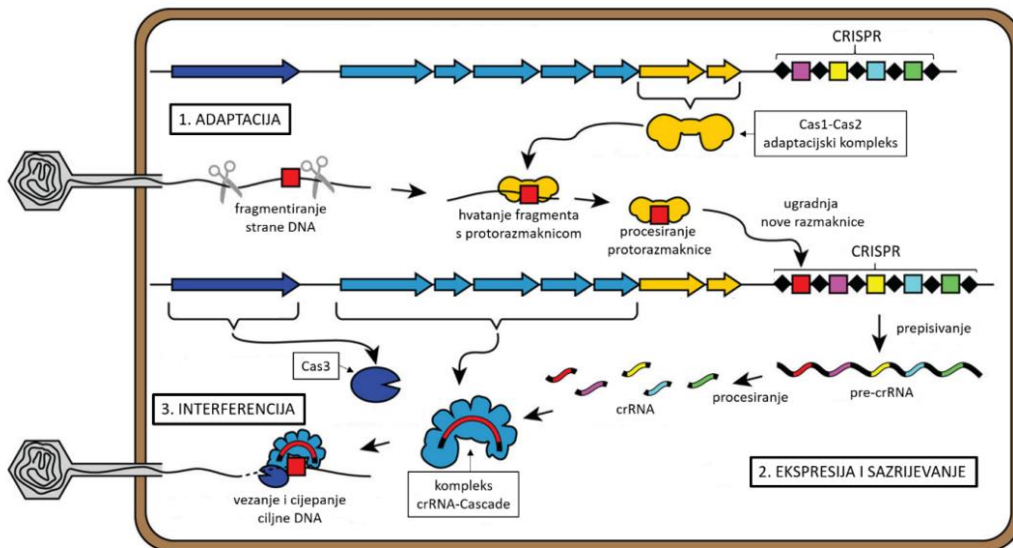
CRISPR-Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats – CRISPR associated*), koji je predmet istraživanja ovog rada, adaptivni je imunosni sustav za obranu domaćina od invazivnih DNA (od bakteriofaga ili plazmida) (Barrangou i sur. 2007a). Sustavi CRISPR-Cas dijele se u dvije klase (klasa 1 i klasa 2), šest tipova (I – VI) i preko 30 podtipova (Makarova i sur. 2020). Svi sustavi sastoje se od gena za proteine Cas (engl. *CRISPR associated*) i od niza kratkih, ponavljajućih, palindromskih, nekodirajućih sekvenci DNA (ponavljanja, engl. *repeats*) između kojih se nalaze jednako kratke, varijabilne sekvence podrijetla iz genoma virusa ili plazmida (razmaknice, engl. *spacers*) (Barrangou i sur. 2007b; Marraffini i Sontheimer 2008). Funkcije proteina Cas su ugradnja razmaknica u lokus CRISPR, stvaranje CRISPR RNA (crRNA) i pronalazak i cijepanje invazivne DNA (Jansen i sur. 2002; Nussenzweig i sur. 2020). Glavna razlika između klase 1 i 2 jest u organizaciji efektorskih enzima (Mitić i sur. 2023). U klasi 1, nastaje multiproteinski efektorski kompleks od više zasebnih proteina, a u klasi 2 nastaje jedinstveni protein s više proteinskih domena (**Slika 2**). Adaptacijski kompleks Cas1–Cas2, jednake je građe skoro u svim sustavima CRISPR-Cas (Makarova i sur. 2020). Najbolje je istražen sustav CRISPR-Cas bakterije *E. coli* soja K-12, koji pripada klasi 1, tipu I-E (Mitić i sur. 2023) i on je predmet istraživanja ovog rada.

Imunosni odgovor podijeljen je u tri faze: adaptacija, prepisivanje regije CRISPR uz sazrijevanje transkripata i cijepanje (interferencija) (**Slika 1**). Adaptacija je proces stvaranja razmaknica iz invazivne DNA bakteriofaga ili plazmida (Lee i Sashital 2022; Nuñez i sur. 2015b; Yosef i sur. 2012). Biraju se sljedovi DNA iz invazivne DNA koji se obrađuju i ugrađuju u lokus CRISPR (Yosef i sur. 2012). Prepisivanje regije CRISPR i sazrijevanje podrazumijeva transkripciju i translaciju gena *cas* i transkripciju lokusa CRISPR u dugačku molekulu pre-CRISPR

RNA (pre-crRNA) koja se obrađuje u zrele i funkcionalne crRNA s jednom razmaknicom (Brouns i sur. 2008; Pougach i sur. 2010). Zatim se crRNA spaja s efektorskim proteinima Cas u ribonukleoproteinski kompleks koji pomoću crRNA prepoznaje invazivne DNA na principu komplementarnosti između crRNA i ciljne DNA. Pri tome nastaje struktura (R-omča) koju prepoznaje nukleaza-helikaza Cas3 koja degradira stranu DNA (Brouns i sur. 2008).



Slika 2. Podjela sustava CRISPR-Cas u dvije klase. U klasi 1, efektorski kompleks sastavljen je od 5 zasebnih proteina Cas dok je u klasi 2 sastavljen od jedinstvenog efekorskog proteina s više proteinskih domena. Slika je napravljena u servisu BioRender po uzoru iz (Mitić 2023)



Slika 1. Tri faze djelovanja sustava CRISPR-Cas tipa I-E u *E. coli* K-12. Obojane strelice označavaju gene *cas*, u lokusu CRISPR crnim rombovima označeni ponavljajući sljedovi, a obojanim kvadratima razmaknice. Slika prikazuje tri faze obrane od invazivne DNA pomoću sustava CRISPR-Cas. Preuzeto i prilagođeno iz (Mitić 2023).

Regija CRISPR započinje s genom *cas3* koji kodira za protein Cas3, nukleazu i DNA i ATP-ovisna helikazu (Brouns i sur. 2008; Sinkunas i sur. 2011). Iza *cas3* slijedi sedam gena organiziranih u jedan operon: *cse1* ili *cas8e*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6e*, *cas1* i *cas2*. Prvih pet gena zajedno tvore multiproteinski kompleks Cascade (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral*

defence), koji s crRNA traži ciljna mjesta za interferenciju i aktivira Cas3 (Brouns i sur. 2008). Cas1 i Cas2 stvaraju kompleks koji pronalazi kratke fragmente iz invazivne DNA, zvane protorazmaknice (engl. *protospacers*), obrađuje i ugrađuje ih u lokus CRISPR (Nuñez i sur. 2014, 2015b; Yosef i sur. 2012). Lokus CRISPR sastoji se od CRISPR ponavljanja, dužine od 29 nt i razmaknica koji su dužine od 32 nt (Haft i sur. 2005; Jansen i sur. 2002; Savitskaya i sur. 2013; Yosef i sur. 2012).

Postoje dvije vrste adaptacije: naivna (engl. *naïve*) i pripremljena (engl. *primed*) (Datsenko i sur. 2012; Swarts i sur. 2012; Yosef i sur. 2012). Naivnom se stječe imunost protiv invazivne DNA s kojom se domaćin susreće prvi put. To je proces ugradnje prve razmaknice podrijetlom iz navedene invazivne DNA i ovisi isključivo o kompleksu Cas1–Cas2 (Yosef i sur. 2012). Kompleks Cas1–Cas2 sastoji se od dvaju asimetričnih dimera metalno ovisne Dnaze Cas1 koji su povezani jednim dimerom Cas2 (Nuñez i sur. 2014; Wang i sur. 2015). Cas1–Cas2 djeluje kao integraza za ugrađivanje razmaknica u lokus CRISPR djelovanjem proteina Cas1, dok dimer Cas2 ima strukturnu ulogu (Nuñez i sur. 2015a; Rollie i sur. 2015; Yosef i sur. 2012).

Za uspješno vezanje kompleksa Cas1–Cas2 na DNA potrebna je prisutnost i prepoznavanje motiva PAM (engl. *protospacer adjacent motif*) (Hayes i sur. 2016; Mojica i sur. 2009). PAM je slijed DNA od dvaju do pet parova baza (Mojica i sur. 2009). U *E. coli* PAM se nalazi uzvodno od protorazmaknice na ciljnoj DNA, a konsenzusna sekvenca glasi 5'-AAG-3' na komplementarnom lancu (Mitić i sur. 2023). Kompleks Cas1–Cas2 selektira za invazivne jDNA s prisutnim motivom PAM, te potom olakšava sparivanje tog jednolančanog fragmenta sa slobodnim komplementarnim jDNA fragmentima, čime nastaje protorazmaknica sa središnjim dupleksom i 3'-stršecim krajevima (Kim i sur. 2020). Podjedinica Cse1 kompleksa Cascade, također prepoznaje PAM (Sashital i sur. 2012). Početna potraga kompleksa Cascade za motivom PAM značajno smanjuje količinu DNA koju je potrebno pretražiti za pronalazak ciljne sekvence komplementarne s crRNA (Redding i sur. 2015).

U pripremljenoj adaptaciji Cas1–Cas2 prepoznaje invazivnu DNA kompleksom crRNA-Cascade, što se zasniva na postojećim razmaknicama koje su stvorene u prošlim infekcijama. No ako nema već postojećih razmaknica, kompleks Cas1–Cas2 stvara imunost prepoznavanjem *de novo* i ciljanjem strane invazivne DNA mehanizmima koji nisu posve poznati (Killelea i sur. 2023). Pravilno raspoznavanje vlastite DNA i strane invazivne DNA od velike je važnosti za domaćina.

Ako se od fragmenata s vlastitog kromosoma naprave nove razmaknice, očekivani je rezultat autoimuni odgovor i programirana stanična smrt (Yosef i sur. 2012). Problem je i činjenica da se u lokusu CRISPR nalaze savršene DNA mete koje su po definiciji komplementarne s crRNA, pa je pitanje zašto sam lokus CRISPR nije nikad napadnut (Nussenzweig i sur. 2020). Pri ugradnji protorazmaknica, PAM se izrezuje a prepoznavanje motiva PAM je preduvjet za nastavak procesa interferencije (Kim i sur. 2020; Ramachandran i sur. 2020). Međutim, to ne objašnjava kako kompleks Cas1–Cas2 može raspoznati stranu invazivnu DNA od ostatka genoma *E. coli*. Motiv je dugačak samo tri nukleotida, te je u genomu *E. coli* prisutno čak 127 081 motiva PAM (Gleditzsch i sur. 2018).

Molekularni procesi koji vode do interakcije između adaptacijskog kompleksa Cas1–Cas2 i DNA slabo su razjašnjeni, ali zahtijevaju enzime sustava za popravak DNA, poglavito enzim RecBCD (Radovčić i sur. 2018). RecBCD pokreće popravak dvolančanih lomova DNA homolognom rekombinacijom i razgrađuje linearnu dvolančanu DNA, time štiteći bakteriju od bakteriofaga (Dillingham i Kowalczykowski 2008). Kromosom domaćina zaštićen je na dva načina. Kromosom bakterije kružna je molekula DNA, dakle nije adekvatan supstrat (Dillingham i Kowalczykowski 2008). U slučaju nastanka dvolančanog loma tijekom replikacije, kromosom je zaštićen od razgradnje zbog prisustva sekvence Chi (engl. *crossover hotspot intigator*) (Bianco i Kowalczykowski 1997; Dixon i Kowalczykowski 1993). Nakon prepoznavanja mjesta Chi, nukleazna aktivnost RecBCD slabi i aktivira se njegova funkcija promicanja rekombinacije (Dillingham i Kowalczykowski 2008). Mjesta Chi u genomu *E. coli* ima njih čak 1008 (Dixon i Kowalczykowski 1993). Ako u molekuli DNA nema mjesta Chi, kao u genomima većine bakteriofaga, RecBCD nastavlja svoju razgradnju (Dillingham i Kowalczykowski 2008). Mjesta Chi, iako stvaraju razliku između DNA *E. coli* i bakteriofaga i plazmida, još uvijek ne sprječavaju uzimanje razmaknica s vlastite DNA jer Cas1–Cas2 može stvoriti razmaknicu iz DNA između dvolančanih lomova i najbližih mjesta Chi. Helikazna-translokazna aktivnost RecBCD potrebna je u procesu CRISPR adaptacije jer istiskuje nukleoproteinske komplekse na molekuli DNA koji fizički ometaju pristup kompleksu Cas1–Cas2 i zato jer stvara jednolančane supstrate koji su prikladni za Cas1–Cas2 (Radovčić i sur. 2018).

Ostaje pitanje kako Cas1–Cas2 prepoznaje stranu DNA, te je izgledno da niti PAM niti Chi sekvenca ne igraju veću ulogu. Bakteriofagi i plazmidi, koji imaju puno veću stopu replikacije od

kromosoma bakterije, imati će veću stopu dvolančanih lomova u replikacijskim rašljama pa će stoga biti učestalije mete kompleksa Cas1–Cas2. Ali smatram da to nije dovoljno da objasni toliko snažnu preferenciju kompleksa Cas1–Cas2 za stranom DNA. Nedavna istraživanja pokazala su da protein DnaK igra važnu ulogu u procesu adaptacije (Killelea i sur. 2023) i tema mog rada bila je ponovno potvrditi taj rezultat. Protein DnaK (Hsp70) jedan je od najvažnijih proteina toplinskog šoka (engl. *heat shock proteins*, HSP), koji štite proteinske strukture od denaturacije prilikom izlaganja stanica povišenim temperaturama (Calloni i sur. 2012; Mayer 2021). DnaK zajedno s proteinima DnaJ (Hsp40) i GrpE spada u visoko konzerviranu familiju Hsp70 šaperona koji osiguravaju pravilno smatanje proteina nakon sinteze (Calloni i sur. 2012; Mayer 2021).

Cilj ovog rada bio je potvrditi rezultat istraživanja koji su proveli Killelea i sur. 2023 ponavljanjem nekih od njihovih eksperimenata. Rezultati tog istraživanja pokazali su da protein DnaK, osim djelovanja kao šaperon, aktivno sudjeluje i u regulaciji aktivnosti procesa naivne adaptacije na način da indirektno pomaže u razlikovanju vlastite i stranih molekula DNA (Killelea i sur. 2023). Hipoteza glasi da protein DnaK ulazi u kompleks s Cas1–Cas2 te time inhibira njegovu mogućnost vezanja na vlastitu molekulu DNA i pravljenje razmaknica dok u stanicu ne uđe strana DNA (Killelea i sur. 2023). Aktivnost kompleksa Cas1–Cas2 može se povratiti delecijom gena za DnaK, mutacijom vezne domene proteina DnaK te ekspresijom proteina bakteriofaga λ (Killelea i sur. 2023). Moj eksperiment postavljen je na sljedeći način. Koristio sam lizogene bakterije *E. coli* s deletiranim genima *cas* kako ne bi došlo do interferencije i moguće autoletalnosti. Koristio sam lizogene bakterije zato jer se indukcijom profaga lagano može dobiti velika količina virusnih proteina i replicirajuće virusne DNA unutar bakterijske stanice. Indukciju temperaturno osjetljivog profaga λ napravio sam uzgajanjem lizogenih bakterija na temperaturi od 37 °C (Bednarz i sur. 2014). Pomoću plazmida pEB628 mogao sam inducirati sintezu proteina Cas1–Cas2 u suvišku kako bih potaknuo naivnu adaptaciju, a pomoću plazmida pIIB46 mogao sam inducirati sintezu proteina DnaK u suvišku kako bih mogao pratiti utjecaj ovog proteina na efikasnost naivne adaptacije. Prazni plazmid pBad-HisA služio je kao negativna kontrola za ova dva plazmida. Efikasnost naivne adaptacije testirao sam pomoću metode PCR (poglavlje 1.7.2) i agarozne gel elektroforeze (poglavlje 1.7.3) na sličan način kako je to opisano u radu Yosef i sur. 2012. Usporedio sam efikasnost naivne adaptacije između bakterija koje imaju ekspresiju proteina Cas1–Cas2 te bakterija koje imaju ekspresiju proteina Cas1–Cas2 i ekspresiju proteina DnaK.

3 MATERIJALI I METODE

3.1 BAKTERIJSKI SOJEVI

Za sve pokuse koristio sam sojeve bakterije *Escherichia coli* K-12 BW25113 (Keio kolekcija sojeva *E. coli*). Sojevi IIB1436 i IIB 1437, koje sam dobio od mentorice, derivati su soja IIB1165 čiji je relevantni genotip $\Delta cas3::apra$ i $\Delta(cas7-cas1)$. Ima delecije gena *cas3*, *cas7*, *cas5*, *cas6* i *cas1*, koji kodiraju za proteine koji provode CRISPR-Cas adaptaciji i interferenciji. Razlika sojeva IIB1436 i IIB1437 u odnosu na IIB1165 je u tome što imaju ugrađene profage $\lambda cI854$ ili λ^+ (Tablica 1) na mjestu *attB*.

Tablica 1. Popis sojeva bakterije *E. coli* korištenih u radu.

Oznaka soja	Relevantni genotip	Izvor
BW25113	F, $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ^- , <i>rph-1</i> , $\Delta(rhaD-rhaB)568$, <i>hsdR514</i>	B. L. Wanner (Keio kolekcija sojeva <i>E. coli</i>)
IIB1165	BW25113 + $\Delta cas3::apra$, $\Delta(cas7-cas1)::FRT$	I. I. Baće
IIB1436	IIB1165 + $\lambda cI854$	
IIB1437	IIB1165 + λ^+	

3.2 PLAZMIDI

U ovom istraživanju bakterije sam transformirao s plazmidima pBad, pEB628 i pIIB46 (Tablica 2).

Tablica 2. Popis plazmida korištenih u radu.

Naziv plazmida	Svrha	Izvor
pBad-HisA	Prazni vektor; negativna kontrola za pEB628 i pIIB46; Amp ^r	Invitrogen
pEB628	Ekspresija proteina Cas1–Cas2 pod kontrolom inducibilnog promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	E. L. Bolt
pMR18	Prazni vektor, hibrid pBad-HisA i pCDF-1b, Str ^r	M. Radovčić
pIIB46	Ekspresija proteina DnaK pod kontrolom inducibilnog promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pMR18; Str ^r	Ovaj rad

3.3 BAKTERIJSKI TRANSFORMANTI

Bakterije sam transformirao metodom kemijske transformacije pomoću kalcijevog klorida (CaCl₂), što je opisano u poglavlju 3.6.3. Napravljeni transformanti navedeni su u **Tablica 3**.

Tablica 3. Popis bakterijskih transformanata napravljenih u ovom radu.

Bakterijski soj	Transformacija s plazmidom	Svrha
IIB1165	pBad-HisA	Negativna kontrola za ugradnju razmaknica
	pEB628	
IIB1437	pEB628	
	pEB628 i pIIB46	
IIB1436	pBad-HisA	Pozitivna kontrola za ugradnju razmaknica
	pEB628	Cilj istraživanja – uloga proteina DnaK na efikasnost adaptacije
	pEB628 i pIIB46	

3.4 POČETNICE ZA PCR

Tablica 4. Popis početnica za PCR korištenih u ovom radu.

Oznaka početnice	Sekvenca	Svrha
dnaK_pBad_F	5'-CTGCAGCTGGTACCATATGGAT ATGGGTAAAATAATTGGTATCG-3'	Kloniranje sekvence gena <i>dnaK</i> u pMR18
dnaK_pBad_R	5'-CGCCAAAACAGCCAAGCTTCT TATTTTTTGTCTTTGACTTCTTC-3'	
pBAD-F	5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC-3'	Provjera rekombinantnih plazmida
pBAD-R	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'	
CRISPR-R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u Lokus CRISPR
CRISPR-Sp4	5'-GCGACCGCTCAGAAAT TCCAGACCCGATCCAAA-3'	

3.5 HRANJIVI MEDIJI I PUFERI

LB medij za uzgoj bakterijskih stanica:

- BD Bacto™ Tryptone (*ThermoFisher Scientific*) → 10 g L⁻¹
- BD Bacto™ Yeast extract (*ThermoFisher Scientific*) → 5 g L⁻¹
- NaCl → 10 g L⁻¹

Smjesu otopiti u dH₂O, podesiti pH na 7,0 i autoklavirati.

Dodaci u LB medij po potrebi:

- BD Bacto™ Agar (*ThermoFisher Scientific*) → 15 g L⁻¹ za čvrsti medij, i 6 g L⁻¹ za meki medij
- L-arabinoza → 0,2 % (v/v)
- Antibiotici za selekciju (konačna koncentracija):
 - Ampicilin → 100 μg mL⁻¹
 - Streptomycin → 50 μg mL⁻¹

50 × TAE pufer za elektroforezu u agaroznom gelu:

- Tris-baza → 242 g L⁻¹
- Octena kiselina → 5,71 %
- Etilendiamintetraoctena kiselina (engl. *ethylenediaminetetraacetic acid*, EDTA) pH 8,0
→ 50 mM

Otopinu EDTA autoklavirati prije ubacivanja u smjesu. Cjelokupnu smjesu autoklavirati i po potrebi razrijediti u dH₂O do 1x.

3.6 METODE RADA S BAKTERIJAMA

3.6.1 Uzgoj i pohrana bakterijskih sojeva

Dugoročno čuvanje bakterijski sojeva odvija se pri temperaturama od – 80 °C ili – 20 °C u smjesi tekućeg LB (*Luria broth*) medija i glicerola u omjeru 1:1 (Miller 1972). Za potrebe ovog eksperimentalnog rada, čuvao sam bakterije na 4 °C na krutim LB podlogama gdje bi nastale pojedinačne kolonije nakon prekonoćnog rasta. Za svaki pokus uzeo sam pojedinačnu koloniju i dodao sam je u 3 mL tekućeg LB medija i ostavio preko noći na 37 °C u inkubatoru tresilici G25 (*New Brunswick Scientific Co. Inc.*) pri 300 rpm, nakon čega su bakterije u stacionarnoj fazi (OD₆₀₀ = 2). Za dobivanje bakterija u logaritamskoj fazi, razrijedio bi 40 μL stacionarne kulture u 3 mL tekućeg LB medija (razrjeđenje 76 ×) i ostavio bi ih u inkubatoru tresilici do OD₆₀₀ = 0,5 – 0,6 što se odredi na spektrofotometrijskom uređaju *Ultrospec 10 Classic* (*Amersham Biosciences*). Prema potrebi u tekući ili kruti LB medij dodaju se antibiotici i induktori u konačnim koncentracijama navedenim u poglavlju 3.5.

3.6.2 Test lizogenosti

Na dva načina provjerio sam lizogenost bakterija sojeva IIB1436 i IIB1437. Testovi se zasnivaju na principu superinfekcije, tj. nastanka otpornosti lizogenih bakterija na ponovnu infekciju s istom vrstom bakteriofaga.

U prvom testu provjerio sam prisutnost profaga u lizogenim sojevima. Napravio sam bakterijsku livadu soja IIB1436 i dvije bakterijske livade soja IIB1437. Pomiješao sam 3 mL mekog LB agara i po 200 μL prekonoćne bakterijske kulture sojeva IIB1436 i IIB1437. Otopinu mekog agara s bakterijama izlio sam na ploče krutog LB medija i pričekao sam dok se ne stvrdnu. Stavio sam po 10 μL lizata bakteriofaga λ_{vir}, λ⁺ i λcI854 iz laboratorijske kolekcije. Bakterijske

livade stavio sam na prekonocnu inkubaciju. Jedna ploča IIB1437 inkubirala se na 37 °C, a ostale dvije na 30 °C. Lizogene bakterije nisu imale plakove osim sa fagom λvir na obje temperature, odnosno $\lambda cI854$ na 37 °C. U drugom testu provjerio sam inducibilnost profaga za ulazak u litički ciklus prilikom izlaganju lizogenih bakterija temperaturi od 37 °C (Bednarz i sur. 2014). Napravio sam bakterijsku livadu soja IIB854 (uzete iz laboratorijske kolekcije, IIB854 je za potrebe ovog pokusa bakterija divljeg tipa, tj. nije lizogena) i stavio sam po 10 μ L bakterijske kulture sojeva IIB1436 i IIB1437 koje su bile u logaritamskoj fazi ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$). Bakterijsku livadu stavio sam na prekonocnu inkubaciju na 37 °C. U lizogenim bakterijama bi se inducirao profag i stvarao čistine/plakove.

3.6.3 Kemijska transformacija bakterijskih stanica

Željene bakterijske stanice uzgojio sam do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600} \approx 0,6$) tako da sam dodao 40 μ L prekonocne kulture u stacionarnoj fazi ($OD_{600} = 2$) u 3 mL tekućeg LB medija i inkubirao uz aeraciju u inkubatoru tresilici G25 (*New Brunswick Scientific Co. Inc.*) na 37 °C. Bakterije sam istaložio centrifugiranjem 1,5 mL bakterijske kulture na 10 000 rcf tijekom 2 minute pri 4 °C u centrifugi 3K30 (*Sigma*). Izlio sam supernatant i talog sam resuspendirao u 200 μ L hladne otopine 50 mM $CaCl_2$. Ponovno sam istaložio stanice centrifugiranjem u istim uvjetima i resuspendirao sam ih u 50 μ L hladne otopine 50 mM $CaCl_2$ i inkubirao u ledenoj kupelji 5 minuta. Zatim sam dodao 1 μ L otopine željenog plazmida i inkubirao sam na ledenoj kupelji još 30 minuta. Potom sam smjesu bakterija i plazmida izložio temperaturnom šoku na 42 °C u trajanju od 1 minute u termobloku *Thermo-shaker TS-100C* (*BioSan*) pa sam smjesu vratio u ledenu kupelj. Nakon 1 minute dodao sam 500 μ L tekućeg LB medija i stavio sam bakterije na inkubaciju od jednog sata na 37 °C uz aeraciju. Po završetku oporavka, bakterije sam nasadio na selektivne krute LB podloge s pripadajućim antibiotikom i stavio sam ih na prekonocnu inkubaciju na 37 °C.

3.6.4 Subkultiviranje bakterijskih kultura (pasažiranje)

Tijekom tri dana uzastopno sam presađivao prekonocne kulture transformiranih sojeva *E. coli* na sljedeći način. Uzeo sam 10 μ L stacionarne kulture ($OD_{600} = 2$) i dodao sam 3 mL tekućeg LB medija s dodanim induktorom i pripadajućem antibiotiku (konačne koncentracije su navedene u poglavlju 1.5) i ostavio sam na novoj prekonocnoj inkubaciji uz aeraciju na 30 °C ili 37 °C. Dobio sam sveukupno tri pasaže svakog transformiranog soja na obje temperature i to je bilo u svrhu

praćenja stope ugradnje razmaknica u transformiranim bakterijama što je mjera efikasnosti naivne adaptacije što je pobliže opisano u poglavlju 3.7.5.

3.7 METODE RADA S DNA

3.7.1 Priprema plazmida

U ovom istraživanju radio sam s plazmidima pBad-HisA, pEB628, pMR18 i pIIB46. Plazmid pIIB46 sam konstruirao, a ostale sam dobio.

3.7.2 Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za konstrukciju vektora pIIB46 prvo sam metodom PCR umnožio insert ciljnog gena *dnaK* s kromosoma bakterije *E. coli* divljeg tipa (tablica 5). Kalup kromosomske (ili plazmidne) DNA dobio sam liziranjem stanica iz stacionarne kulture ($OD_{600} = 2$) u sterilnoj vodi tako da sam pomiješao 10 μ L stanica i 50 μ L sterilne destilirane vode i inkubirao sam na 98 °C tijekom 3 minute na uređaju *T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)*. PCR sam proveo s DNA polimerazom visoke točnosti *Q5 Hot Start High Fidelity (New England BioLabs)* koja ima 3' → 5' lektorirajuću aktivnost. Sastav PCR reakcijske smjese namjestio sam prema uputama proizvođača i naveden je u **Tablica 5**.

Tablica 5. Sastav PCR reakcijske smjese za umnažanje inserta gena *dnaK* iz kromosoma bakterije *E. coli*.

Sastojak	Volumen / μ L
Početnice <i>dnaK_pBad_F</i> (10 μ M)	1,25
Početnice <i>dnaK_pBad_R</i> (10 μ M)	1,25
Kalup (lizirane stanice)	1,00
Q5 Hot Start High Fidelity 2X Master Mix (<i>NEB</i>)	12,50
Sterilna deH ₂ O	9,00
Σ	25,00

Uvjete za PCR umnažanje namjestio sam prema uputama proizvođača i oni su navedeni u **Tablica 6**.

Tablica 6. Uvjeti za PCR reakcije umnažanja inserta gena *dnaK* iz kromosoma bakterije *E. coli*.

Korak	Temperatura / °C	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30 s	1
Denaturacija	98	10 s	35
Sparivanje početnica	57	30 s	
Produljivanje lanaca DNA	72	1 min	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	2 min	1
Pohrana	12	∞	1

3.7.3 Agarozna gel elektroforeza i pročišćavanje DNA

Nakon PCR reakcije, veličinu PCR produkta provjerio sam gel elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Prokuhao sam 150 mg agaroze i 17 mL 1 × TAE pufera (sastav pufera naveden je u poglavlju 3.5) te sam dodao 1,2 μL interkalirajuće boje *SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen)*. U jažice agaroznog gela nanio sam 2 μL markera molekulskih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, slika43)* i 2 μL PCR produkta pomiješanog s 1 μL boje *DNA Gel Loading Dye (6×) (Thermo Fisher Scientific)*. Elektroforezu sam provodio 50 minuta pri naponu 50 V. Nakon završetka elektroforeze, DNA fragmente vizualizirao sam pod UV svjetlom na transiluminatoru *Uvitec* i slikao sam kamerom *EDAS 290 (Kodak)*.

Umnoženi PCR produkt inserta gena *dnaK* pročistio sam pomoću komercijalnog paketa *GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific)*. U otopinu s PCR produktom dodao sam jednak volumen otopine *Binding Buffer*. Čitavu smjesu odlio sam u *GeneJET* purifikacijsku kolonicu i stavio sam na centrifugiranje na 16 000 rcf tijekom 60 sekundi. Odbacio sam eluat i dodao sam 700 μL otopine *Wash Buffer* i ponovno sam centrifugirao u istim uvjetima. Odbacio sam eluat i proveo sam suho centrifugiranje. Prebacio sam kolonicu u čistu mikroeprevetu volumena 1,5 mL, dodao sam 50 μL otopine *Elution Buffer* i proveo sam centrifugiranje u istim uvjetima.

Nakon pročišćavanja, spektrofotometrijski ($\lambda = 260 \text{ nm}$) sam izmjerio koncentraciju DNA na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare)*. Za slijepu probu koristio sam 2 μL otopine *Elution Buffer*, a pri mjerenju sam koristio 2 μL uzorka.

3.7.4 Restriksijska razgradnja, ligacija molekula DNA i provjera ugradnje

Za kloniranje inserta gena *dnaK* u plazmid pMR18 koristio sam komercijalni paket *NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Cloning Kit (New England BioLabs)*. Za razliku od drugih paketa, ovaj ne zahtijeva cijepanje inserta s restriksijskim endonukleazama već samo plazmida. Cjelokupan proces može se podijeliti u nekoliko važnih koraka. Prvi korak je umnažanje željenog inserta (opisano u poglavlju 3.7.2) s početnicama koje na svojim krajevima imaju nukleotidne sljedove (označene malim slovima na donjem prikazu) koji su komplementarni sljedovima na plazmidu na mjestu ugradnje. Velikim slovima označeni su dijelovi početnice koji su komplementarni genu *dnaK*.

Početnica dnaK_pBad_F:

5' – ctgcagctggtaccatatggatATGGGTAAAATAATTGGTATCG – 3',

početnica dnaK_pBad_R:

5' – cgccaaaacagccaagcttcTTATTTTTTGTCTTTGACTTCTTC – 3'

Drugi korak je restriksijska digestija plazmida pMR18 endonukleazom *FastDigest EcoRI (Tablica 7)*. Uspjeh ovog koraka provjerio sam elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. U jažice agaroznog gela nanio sam 2 μL markera molekulskih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, slika 43)* i 4 μL smjese restriksijske reakcije pomiješane s 1 μL boje *DNA Gel Loading Dye (6 \times) (Thermo Fisher Scientific)*. Elektroforezu i analizu gela sam proveo kako je navedeno u poglavlju 3.7.3. Restriksijska digestija vektora bila je uspješna ukoliko je prisutna samo jedna vrpca na veličini koja odgovara molekularnoj masi vektora pMR18 od 3730 nt.

Tablica 7. Reakcijska smjesa za digestiju plazmida pMR18 restrikcijom endonukleazom EcoRI.

Sastojak	Volumen / μL
pMR18 45,1 ng μL^{-1}	10,0
10 \times <i>FastDigest Buffer</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	2,0
<i>FastDigest EcoRI</i> (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	1,0
Sterilna deH ₂ O	7,0
Σ	20,0

Sve uzorke sam ponovno pročistio pomoću komercijalnog paketa *GeneJET PCR Purification Kit* (*Thermo Fisher Scientific*) i spektrofotometrijski sam izmjerio koncentraciju DNA na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer* (*GE Healthcare*) kako je opisano u poglavlju 3.7.3.

Zatim slijedi ligacija inserta i plazmida korištenjem enzimatske smjese *Assembly Master Mix* prema uputama proizvođača (**Tablica 8**) koja započinje s razgradnjom 5' krajeva plazmida i inserta pomoću 5'-egzonukleaza. 3' stršeći krajevi plazmida i inserta koji su komplementarni se sparuju i DNA polimeraza popunjava jednolančane praznine. Reakcija ligacije završava s DNA ligazom koja spaja ureze na lancima DNA.

Tablica 8. Reakcijska smjesa za ligaciju inserta gena *dnaK* i plazmida pMR18.

Sastojak	Volumen / μL
pMR18, 7,3 ng μL^{-1}	3,50
insert gena <i>dnaK</i> , 40,5 ng μL^{-1}	1,50
2 \times <i>NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Master Mix</i> (<i>NEB</i>)	5,00
Sterilna deH ₂ O	0
Σ	10,00

Nakon inkubacije, transformirao sam kemijski kompetentne komercijalne bakterijske stanice iz istog kit-a za kloniranje što je detaljno opisano u poglavlju 3.6.3. Transformirane bakterije nasadio sam na selektivne krute LB podloge s dodatkom ampicilina i/ili streptomcina, ovisno o tipu transformanata (**Tablica 3**). Podloge sam stavio na prekonoćnu inkubaciju na 37 °C.

Sljedeći dan sam metodom PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*) provjerio prisutnost plazmida s uspješno ugrađenim insertom. Tijekom reakcije ligacije uvijek postoji mogućnost da se plazmid poveže nazad sa samim sobom bez ugradnje inserta. Plazmidnu DNA dobio sam liziranjem stanica tako da sam uzeo sa sterilnom čačalicom malo uzorka pojedinačne kolonije i resuspendirao u 50 μL sterilne destilirane vode. Deset pojedinačnih kolonija sam inkubirao na 98 $^{\circ}\text{C}$ tijekom 3 minute na uređaju *T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)*. PCR sam proveo pomoću komercijalnim paketom *Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)*. Sastav PCR reakcijske smjese (**Tablica 9**) i uvjete PCR reakcije (

Tablica 10) namjestio sam prema uputama proizvođača.

Tablica 9. Sastav PCR reakcijske smjese za provjeru prisutnosti plazmida s uspješno ugrađenim insertom gena *dnaK* metodom PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*).

Sastojak	Volumen / μL
Početnice pBAD-F (10 μM)	0,50
Početnice pBAD-R (10 μM)	0,50
Kalup (lizirane stanice)	1,00
2× Phire Green HS II Master Mix (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	5,00
Sterilna deH ₂ O	3,00
Σ	10,00

Tablica 10. Uvjeti za PCR reakciju za provjeru prisutnosti plazmida s uspješno ugrađenim insertom *dnaK* metodom PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*).

Korak	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30 s	1
Denaturacija	98	5 s	30
Sparivanje početnica	57	5 s	
Produljivanje lanaca DNA	72	30 s	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	1 min	1
Pohrana	12	∞	1

Koristio sam početnice pBAD-F i pBAD-R jer se vežu na ishodišni vektor pMR18 blizu mjesta ugradnje za insert (otprilike 120 nt uzvodno od početka te 60 nt nizvodno od kraja ukloniranog inserta) te ovisno o duljini nastalog fragmenta (insert *dnaK* dugačak je 1917 nt) na agaroznom gelu može se lako odrediti uspješnost kloniranja inserta u vektor. Nakon PCR reakcije, elektroforezu PCR produkta na 1%-tnom agaroznom gelu i analizu gela proveo sam kako je opisano u poglavlju 3.7.3.

Kolonije u kojima je bio prisutan plazmid s ugrađenim insertom, prebacio sam u 3 mL tekućeg LB medija na prekonoćnu inkubaciju na 37 °C uz aeraciju. Iz njih sam izolirao plazmidnu DNA pomoću komercijalnog paketa *Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Prema uputama proizvođača uzeo sam 1,5 mL stacionarne, prekonoćne kulture ($OD_{600} = 2$) i istaložio sam stanice centrifugiranjem pri 10 000 rcf tijekom 5 min u centrifugi 5415D (Eppendorf) pri sobnoj temperaturi. Odbacio sam supernatant, a talog stanica sam temeljito resuspendirao u 250 μ L otopine *Cell Resuspension Solution*. Zatim sam dodao 250 μ L otopine *Cell Lysis Solution* i promiješao sam okretanjem mikroeprevete četiri puta. Nakon što je otopina postala prozirna nakon jedne do tri minute dodao sam 10 μ L otopine *Alkaline Protease Solution*. Ponovno sam promiješao okretanjem mikroeprevete četiri puta i nakon par minuta dodao sam 350 μ L otopine *Neutralisation Solution*. Promiješao sam okretanjem mikroeprevete četiri puta i stavio sam na centrifugiranje na 14 000 rcf tijekom 10 minuta pri sobnoj temperaturi. Supernatant sam prebacio u kolonicu i stavio sam na centrifugiranje na 14 000 rcf tijekom 1 minute. Odbacio sam eluat i dodao sam 750 μ L otopine *Column Wash Solution* i stavio sam na centrifugiranje na istim uvjetima. Ponovno sam odbacio eluat i dodao sam 250 μ L otopine *Column Wash Solution* i stavio sam na centrifugiranje na istim uvjetima tijekom 2 minute. Premjestio sam kolonicu u čistu mikroeprevetu volumena 1,5 mL i dodao sam 100 μ L otopine *Nuclease-free Water* i stavio sam na centrifugiranje na 14 000 rcf tijekom 1 minute. Eluat, s plazmidnom DNA, pohranio sam na –20 °C. Spektrofotometrijski sam izmjerio koncentraciju DNA na uređaju *NanoVue Plus Spectrophotometer* (GE Healthcare) kako je opisano u poglavlju 3.7.3.

Izoliran plazmid pIIB46 poslao sam na sekvenciranje u servis *Macrogen* (Nizozemska) kako bi potvrdio njegov točan slijed.

3.7.5 Određivanje efikasnosti naivne adaptacije

Ugradnju novih razmaknica u Lokus CRISPR istraživao sam pomoću metode PCR (poglavlje 3.7.2) i agarozne gel elektroforeze (poglavlje 3.7.3) na sličan način kako je to opisano u radu Yosef i sur. 2012. Kalup sam dobio liziranjem stanica, koje su bile transformirane plazmidima pBad-HisA, pEB628 i/ili pIIB46 (**Tablica 3**), pomoću prokuhavanja na način koji je opisan u poglavlju 3.7.2. Za reakciju PCR umnažanja koristio sam početnice CRISPR-R i CRISPR-Sp4 koje se vežu kod četvrte razmaknice lokusa CRISPR i na 3' kraj gena *casI*, što znači da se njima umnaža dio lokusa CRISPR u kojem se ugrađuju nove razmaknice. Koristio sam enzim *Phire Green Hot Start II Master Mix* (*Thermo Fisher Scientific*), a sastav PCR reakcijske smjese i uvjete za PCR reakciju sam prilagodio prema uputama proizvođača (**Tablica 11** i **Tablica 12**).

Tablica 11. Sastav PCR reakcijske smjese za određivanje efikasnosti naivne adaptacije umnažanjem lokusa CRISPR.

Sastojak	Volumen / μL
Početnice CRISPR-R (10 μM)	1,00
Početnice CRISPR-Sp4 (10 μM)	1,00
Kalup (lizirane stanice)	2,00
2 \times Phire Green HS II Master Mix (<i>Thermo Fisher Scientific</i>)	10,00
Sterilna deH ₂ O	6,00
Σ	20

Tablica 12. Uvjeti za PCR reakciju za određivanje efikasnosti naivne adaptacije umnažanjem lokusa CRISPR.

Korak	Temperatura / $^{\circ}\text{C}$	Vrijeme	Broj ciklusa
Početna denaturacija	98	30 s	1
Denaturacija	98	5 s	30
Sparivanje početnica	54	5 s	
Produljivanje lanaca DNA	72	10 s	
Završno produljivanje lanaca DNA	72	1 min	1
Pohrana	12	∞	1

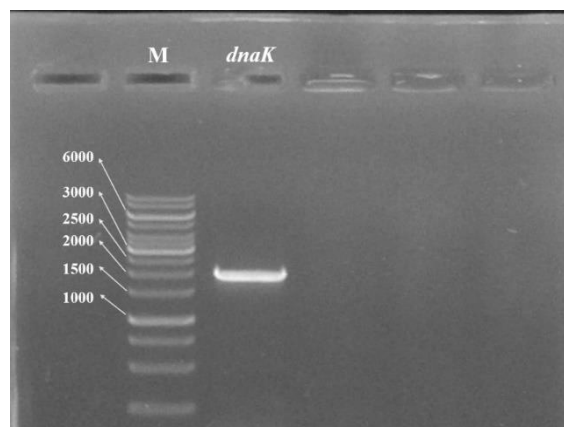
Po završetku PCR reakcije, napravio sam 2%-tni agarozni gel na način opisan u poglavlju 3.7.3. U jažice sam nanio po 8 μ L svakog uzorka i 2 μ L markera molekulskih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*, slika 43) ili 2 μ L markera *Quick-Load[®] Purple 100 bp DNA Ladder* (*New England BioLabs*). Elektroforeza se provodila 50 minuta pri 50 V. Nakon završetka elektroforeze, DNA fragmente vizualizirao sam pod UV svjetlom na transiluminatoru *Uvitec* i slikao sam kamerom *EDAS 290* (*Kodak*). Sojevi u kojima je došlo do ugradnje razmaknica imaju jednu dodatnu vrpcu iznad početne vrpce, koja je dulja za otprilike 60 nt.

4 REZULTATI

Za uspješnu ugradnju novih razmaknica u lokus CRISPR tijekom naivne adaptacije potreban je samo aktivni kompleks proteina Cas1–Cas2. Ostali proteini Cas, koji djeluju u ekspresiji i interferenciji sustava CRISPR-Cas, nisu potrebni (Yosef i sur. 2012). Stoga sam koristio mutante soja *E. coli* K-12 BW25113 s delecijom gena *cas3*, *cas7*, *cas5*, *cas6e* i *cas1* kako ne bi došlo do interferencije i moguće autoletalnosti (**Tablica 1**). Sojeve sam transformirao s tri vrste plazmida (**Tablica 2**). Pomoću plazmida pEB628 mogao sam inducirati sintezu proteina Cas1–Cas2 u suvišku kako bih potaknuo naivnu adaptaciju, a pomoću plazmida pIIB46 mogao sam inducirati sintezu proteina DnaK u suvišku kako bih mogao pratiti utjecaj ovog proteina na efikasnost naivne adaptacije. Prazni plazmid pBad-HisA služio je kao negativna kontrola za ova dva plazmida. Sojeve i plazmide pBad-HisA te pEB628 sam dobio, a plazmid pIIB46 sam konstruirao u ovom radu.

4.1 KONSTRUKCIJA PLAZMIDA pIIB46

Za konstrukciju vektora pIIB46 prvo sam metodom PCR umnožio insert ciljnog gena *dnaK* s kromosoma bakterije *E. coli* divljeg tipa. Kalup kromosomske DNA dobio sam liziranjem stanica divljeg tipa iz prekonoćne kulture. Nakon PCR reakcije, veličinu PCR produkta gena *dnaK* provjerio sam gel elektroforezom u 1%-tnom agaroznom gelu. Umnoženi insert nalazi se malo ispod pozicije vrpce od 2000 nt, što odgovara veličini gena *dnaK* koji iznosi 1917 nt (**Slika 3**).



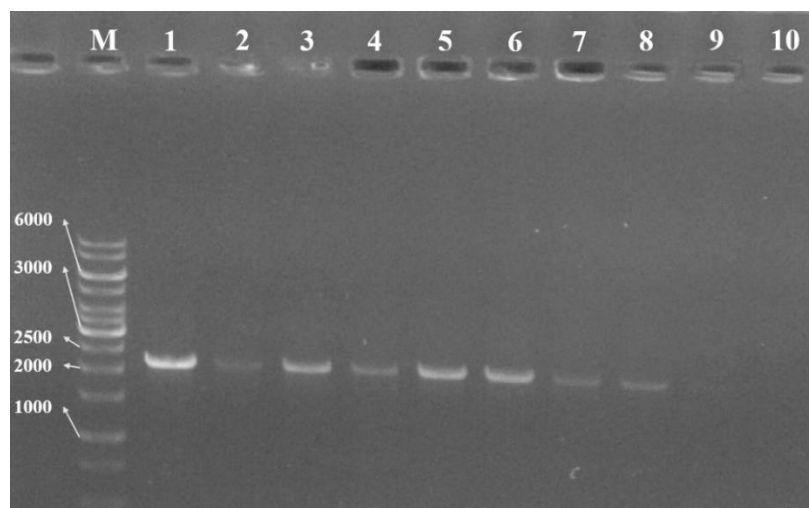
Slika 3. Gel elektroforeza provjera veličine umnoženog gena *dnaK* metodom PCR iz kalupa kromosomske DNA (očekivana duljina inserta *dnaK* je 1917 nt). M = marker molekularskih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*), *dnaK* = PCR umnoženi gen *dnaK*

Zatim sam uklonirao umnoženi gen *dnaK* (insert) u plazmid pMR18 pomoću komercijalnog paketa *NEBuilder[®] HiFi DNA Assembly Cloning Kit* (*New England BioLabs*). Nakon transformacije bakterija, uspješnost kloniranja, uspjeh ligacije inserta *dnaK* i plazmida pMR18 provjerio sam prvo pomoću metode PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*). Od deset odabranih kolonija, osam njih (označene 1 – 8 na **Slika 4**) imale su prisutan plazmid pMR18 s uspješno ukloniranim insertom gena *dnaK*.

Iz kolonije označene brojem 1 sam izolirao plazmid i poslao ga na sekvenciranje u servis *Macrogen* (Nizozemska) čime sam utvrdio njegov točan slijed i potvrdio da nema nikakvih mutacija u slijedu gena *dnaK*. Plazmidu sam dao ime IIB46.

4.2 UTJECAJ PROTEINA DnaK NA NAIVNU ADAPTACIJU

Početni soj IIB1165 sam lizogenizirao dodavanjem malog alikvota štok faga λ cI854 ili λ^+ na bakterijsku livadu. Iz mutnog plaka sam sterilnom ezom bakterije razmazao na krutu LB podlogu da bih dobio pojedinačne lizogene kolonije. Lizogenost dobivenih sojeva IIB1436 (λ cI854) i IIB1437 (λ^+) potvrdio sam s dva različita testa lizogenosti kako je opisano u materijalima i metodama (3.6.2).

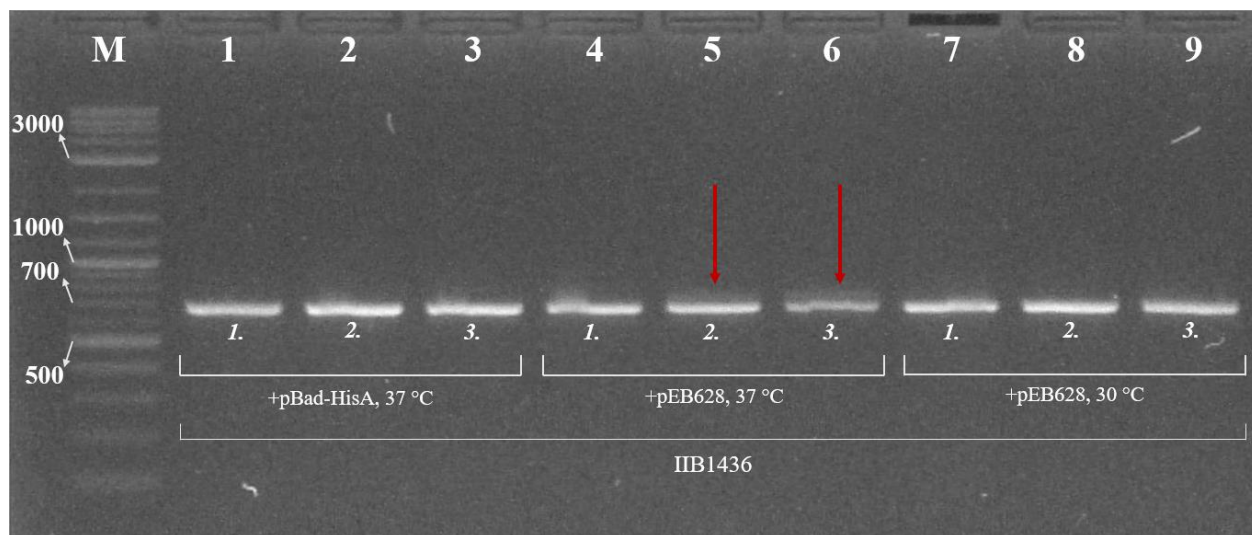


Slika 4. Provjera prisutnosti inserta gena *dnaK* u transformantima sojeva *E. coli*. Očekivani fragment je veličine oko 2100 nt (insert je duljine 1917 nt a početnice se vežu oko 120 nt uzvodno i oko 60 nt nizvodno od mjesta ligacije). M = marker molekularne mase *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (*Thermo Fisher Scientific*).

Proces naivne adaptacije pratio sam tijekom tri uzastopna presađivanja (pasaža) prekonoćnih kultura bakterija transformiranih s pBad-HisA (negativna kontrola), pEB628 (pozitivna kontrola, pCas1-Cas2) ili s pEB628 i pIIB46 (pDnaK). Kalup DNA za umnažanje lokusa CRISPR pomoću

početnica koje okružuju mjesto ugradnje novih razmaknica, dobio sam liziranjem prekonocnih bakterijskih kultura.

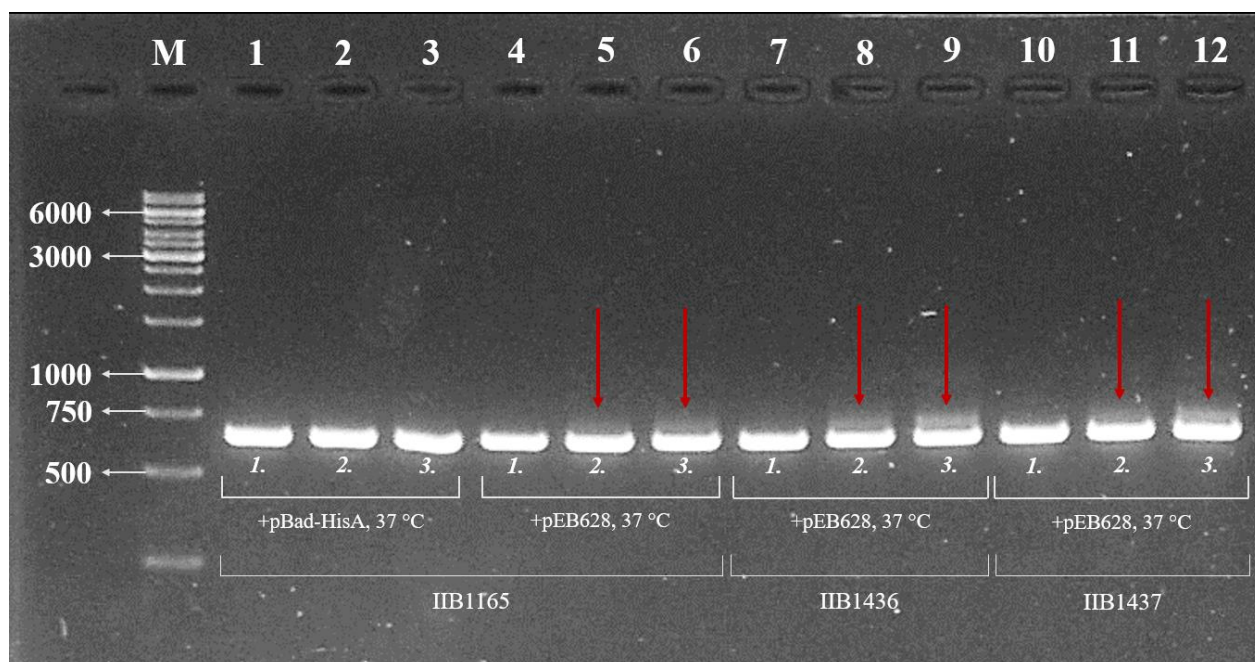
Prvo sam provjerio hoće li doći do ugradnje novih razmaknica u dva različita uvjeta inkubiranja. Uzeo sam kalupe bakterija soja IIB1436 (lizogen s λ cI854) koji su bile transformirane s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) i koje su rasle na dvije temperature (30 °C ili 37 °C). Kao negativnu kontrolu koristio sam isti soj transformiran s praznim vektorom pBad-HisA koje su rasle na 37 °C. Na **Slika 5** vidljivi su fragmenti umnožene DNA, veliki otprilike 650 nt što odgovara veličini lokusa CRISPR u kojem nije bilo ugradnje novih razmaknica. Na pozicijama 5 i 6 (označeno crvenom strelicom na **Slika 5**) vidljiva je dodatna vrpca, koja je duža za otprilike 60 nt što odgovara duljini ugrađene nove razmaknice (Haft i sur. 2005; Jansen i sur. 2002; Savitskaya i sur. 2013; Yosef i sur. 2012). Do ugradnje novih razmaknica došlo je samo u bakterijama transformiranim s pEB628 (pCas1-Cas2) koje su rasle na 37 °C i to već u drugoj pasaži. U bakterijama s plazmidom pEB628, koje su rasle na 30 °C, nije došlo do ugradnje razmaknica.



Slika 5. Provjera produkata reakcije PCR naivne adaptacije u 2%-tnom agaroznom gelu. U najdonjem redu označen je soj bakterije (IIB1436), iznad njega plazmidi s kojima su bakterije bile transformirane (pBad-HisA ili pEB628/pCas1-Cas2) te temperatura inkubacije (30 °C ili 37 °C). Broj pasaže označen je rednim brojem u kurzivu direktno ispod vrpce. Ugradnja novih razmaknica vidljiva je po postojanju dodatne vrpce iznad početne vrpce (duga oko 650 nt) koja je duža za otprilike 60 nt. Uzorci u kojima je došlo do ugradnje novih razmaknica označeni su crvenom strelicom M = marker molekularnih masa *Quick-Load Purple 1 kb Plus DNA Ladder* (New England BioLabs);

Sljedeće sam provjerio hoće li biti razlike u ugradnji novih razmaknica između sojeva IIB1436 i IIB1437, čija je jedina razlika u vrsti profaga ugrađenih u njihov genom (λ cI854 i λ^+). Uzeo sam kalupe bakterija sojeva IIB1436 i IIB1437 koje su bile transformirane s plazmidom pEB628 (pCas1-Cas2) i koje su rasle na 37 °C. Kao kontrolu koristio sam bakterije soja IIB1165 koji nije lizogen transformirane s oba tipa plazmida i koje su rasle na 37 °C. Nema razlike između stope ugradnje novih razmaknica između sojeva IIB1436 i IIB1437, ali je intenzitet ugradnje razmaknica veći u odnosu na kontrolni soj IIB1165 transformiranim s pEB628 (Slika 6). To ukazuje da prisustvo profaga pozitivno utječe na naivnu adaptaciju.

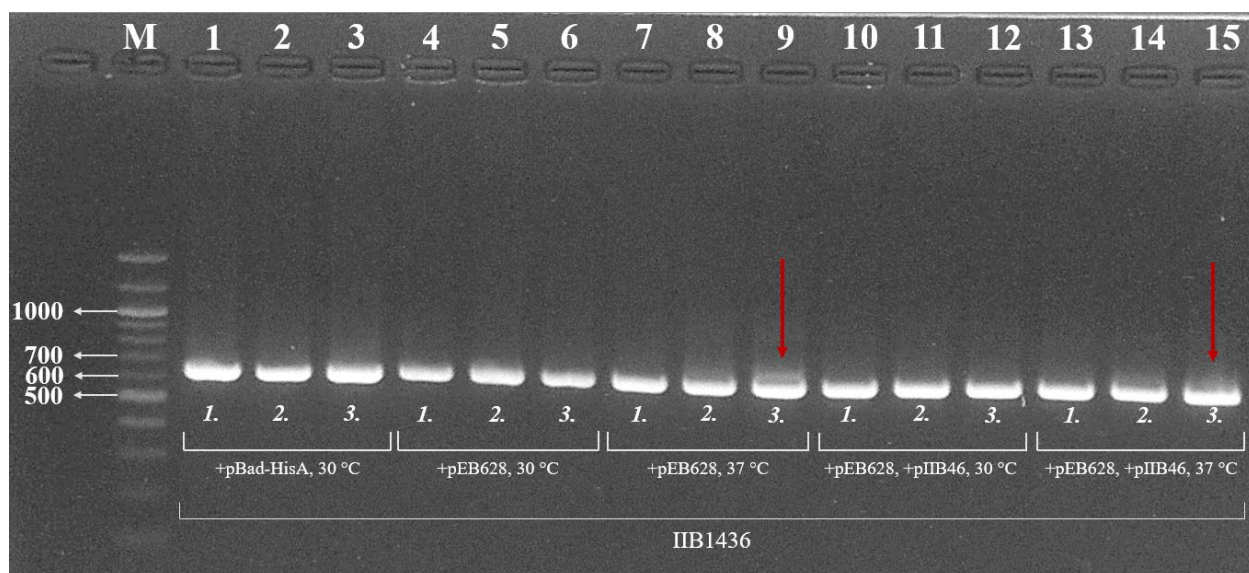
Jedan od mogućih razloga efikasnije naivne adaptacije lizogenih bakterija je replikacija



Slika 6. Provjera produkata reakcije PCR naivne adaptacije u 2%-tnom agaroznom gelu. U najdonjem redu označen je soj bakterije (IIB1165, IIB1436 ili IIB1437), iznad njega plazmidi s kojima su bakterije bile transformirane (pBad-HisA ili pEB628) te temperatura inkubacije (37 °C). Broj pasaže označen je rednim brojem u kurzivu direktno ispod vrpce. Sojevi u kojima je došlo do ugradnje novih razmaknica označeni su crvenom strelicom. M = marker molekularnih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

induciranog faga λ za koji je potreban neki od produkata gena domaćina, a koji bi mogli utjecati na efikasnost naivne adaptacije. Nedavna istraživanja su pokazala da protein DnaK inhibira naivnu adaptaciju, a inače je potreban za replikaciju faga λ (Killelea i sur. 2023). Stoga sam provjerio utjecaj proteina DnaK na proces naivne adaptacije kad se temperaturno osjetljiv bakteriofag λ može inducirati i replicirati (37 °C) i kad je stabilno ugrađen i nema indukcije (30 °C). Uzeo sam kalupe

bakterija soja IIB1436 lizogenog s λ cI854 koji su bili transformirani istovremeno s plazmidima pEB628 (pCas1-Cas2) i pIIB46 (pDnaK) koje su rasle na dvije temperature (30 °C ili 37 °C). Kao negativnu kontrolu koristio sam bakterije soja IIB1436 transformiranih s pBad-HisA koje su rasle na 37 °C, a kao kontrolu bez proteina DnaK stanice transformirane s plazmidom pCas1-Cas2 koje su rasle na dvije temperature (30 °C ili 37 °C). Vidljivo je dolazi do smanjene stope ugradnje novih razmaknica u trećoj pasaži u bakterijama s dva plazmida u kojima je prisutna ekspresija i proteina DnaK i kompleksa Cas1-Cas2, naspram bakterija u kojima nema ekspresije proteina DnaK s plazmida već samo kompleksa Cas1-Cas2 (Slika 7, oboje označene crvenom strelicom). Razlika je uočljiva samo na 37 °C.



Slika 7. Provjera produkata reakcije PCR naive adaptacije u 2%-tnom agaroznom gelu. Prikazani su rezultati za lizogeni soj IIB1436. U najdonjem redu označen je soj bakterije (IIB1436), iznad njega plazmidi s kojima su bakterije bile transformirane (pBad-HisA ili pEB628) te temperatura inkubacije (37 °C). Broj pasaže označen je rednim brojem u kurzivu direktno ispod vrpca. Sojevi u kojima je došlo do ugradnje novih razmaknica označeni su crvenom strelicom. M = marker molekularnih masa *GeneRuler 1 kb DNA Ladder* (Thermo Fisher Scientific).

5 RASPRAVA

Adaptivni imunski sustav, CRISPR-Cas, moćno je oružje u borbi protiv invazivnih genetičkih elementa, poput bakteriofaga i plazmida (Barrangou i sur. 2007a). Efektivnost tog sustava uvelike ovisi o njegovoj mogućnosti raspoznavanja vlastite i strane DNA. Ako se greškom fragmenti s vlastita kromosoma uzmu kao nove razmaknice, očekivani je rezultat autoimunski odgovor i programirana stanična smrt (Yosef i sur. 2012). Prošla saznanja o sustavu CRISPR-Cas pokazala su da iako slijed PAM, Chi mjesto i RecBCD helikaza igraju bitnu ulogu u procesu adaptacije, vrlo vjerojatno ne sudjeluju u prepoznavanju invazivne DNA (Koonin i Wolf 2016; Lau i sur. 2019; Subramaniam i Smith 2022). Istraživanje Killelea i sur. 2023 pokazalo je da protein DnaK (Hsp70), koji inače služi stanici kao šaperon (Mayer 2021), kroz interakcije s kompleksom Cas1–Cas2 regulira CRISPR adaptaciju na način da štiti kromosom domaćina od autoimune reakcije i u pravo vrijeme otpušta kompleks Cas1–Cas2 za napad na invazivne genetičke elemente.

Utjecaj prisustva bakteriofaga λ cI854, koji je iz lizogene ušao u litičku fazu, na proces naivne adaptacije provjerio sam na dva načina. Prvo sam provjerio utjecaj temperature na učinkovitost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR. Ugradnja novih razmaknica dogodila se samo prilikom uzgoja na 37 °C što ukazuje da indukcija profaga λ cI854 pozitivno utječe na učinkovitost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR.

Zatim sam provjerio utjecaj prisustva drugog tipa profaga, stabilnog profaga λ^+ koji se ne može temperaturom inducirati u litički ciklus. Učinkovitost ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR bila je jednaka između oba lizogena soja iako bi profag λ^+ trebao biti stabilan na temperaturi od 37 °C. Ugradnja razmaknica je u oba lizogena soja bila nešto jačeg intenziteta nego u kontrolnom nelizogenom soju IIB1165 (slika 4). Iz ovih rezultata može se pretpostaviti da je profag λ^+ ipak ušao u litički ciklus i time dodatno potaknuo naivnu adaptaciju ili da neki produkt gena profaga stimulira adaptaciju neovisno o replikaciji faga. U slučaju da je došlo do replikacije faga, mogući razlog veće učinkovitosti ugradnje je najvjerojatnije zbog razlike u broju replikacijskih rašlji. U kontrolnom soju IIB1165 repliciraju se samo bakterijski kromosom i plazmid pEB628 pa je broj zaustavljenih replikacijskih rašlji s dvolančanim lomovima manji nego u lizogenim bakterijama, u kojima pretpostavljamo da se repliciraju i bakteriofagi u iznimno velikom broju, pa je posljedično i broj zaustavljenih replikacijskih rašlji s dvolančanim lomovima veći. Broj replikacijskih rašlji

ima direktan utjecaj na naivnu adaptaciju jer kompleks Cas1–Cas2 cilja DNA tijekom aktivne replikacije DNA (Killelea i sur. 2023).

Utjecaj proteina DnaK na proces naivne adaptacije pratio sam određivanjem učinkovitosti ugradnje novih razmaknica u lokus CRISPR uz suvišak proteina DnaK. U bakterije lizogene s λ cI854 koje su bile transformirane s pCas1–Cas2, dodao sam i plazmid koji eksprimira protein DnaK (pIIB46). Učinkovitost ugradnje novih razmaknica u trećoj pasaži bila je veća kod bakterija koje su bile transformirane samo s pCas1–Cas2 u odnosu na bakterije koje su bile transformirane s oba plazmida (slika 5). Iako je protein DnaK svejedno prisutan u nativnim količinama i u bakterijama koje nisu bile transformirane s plazmidom pDnaK, njegov utjecaj na naivnu adaptaciju u tim bakterijama nije se mogao uočiti jer je količina kompleksa Cas1–Cas2 daleko veća od proteina DnaK. Tek uz suvišak proteina DnaK uočava se njegov inhibitoran učinak na adaptaciju.

Rezultati dobiveni u ovom eksperimentu u skladu su s eksperimentima Killelea i sur. 2023 kao i s mehanizmom koji oni predlažu. Sumarno, autori predlažu da je u normalnim uvjetima, dok bakterija nije pod napadom bakteriofaga ili plazmida, kompleks Cas1–Cas2 neaktivan. Na njega je vezan šaperon DnaK koji inhibira njegovu mogućnost vezanja na DNA i tako štiti bakterijski kromosom od adaptacije te time i od autoimune reakcije. U trenutku aktivne infekcije proteini bakteriofaga λ „otimaju“ DnaK iz njegovog kompleksa s Cas1–Cas2 za vlastitu replikaciju DNA i za kontroliranje pravilnog smatanja strukturalnih proteina bakteriofaga. Kompleks Cas1–Cas2 se time oslobađa i vraća mu se puna aktivnost. Vrijeme u kojem kompleks Cas1–Cas2 uspostavlja svoju punu aktivnost je od najveće važnosti za uspješno ciljanje invazivne DNA. Trenutak kada proteini bakteriofaga otimaju DnaK je također trenutak kada u inficiranoj stanici postoji jako puno replicirajuće virusne DNA dok je replikacija bakterijskog kromosoma zaustavljena. Glavni supstrat kompleksa Cas1–Cas2 su dvolančani fragmenti DNA nastali na zaustavljenim replikacijskim rašljama (Killelea i sur. 2023) i iz toga autori predlažu zašto ova vremenska regulacija aktivnosti može toliko uspješno pridonijeti u raspoznavanju vlastite i strane DNA. Oni predlažu da zapravo ne postoji direktan proces raspoznavanja vlastite i strane DNA, već da se vlastita i strana DNA se raspoznaju pomoću regulacije aktivnosti Cas1–Cas2 pomoću proteina DnaK koji utišava aktivnost u trenutku kada je replikacija kromosoma domaćina moguća, a oslobađa Cas1–Cas2 u trenutku kada se replicira samo virusna DNA. Naravno, ta regulacija nije idealna jer je pokazano da se prilikom ugradnje novih razmaknica osim iz strane uzima i iz vlastite DNA (Radovčić i sur. 2018).

Za daljnju potvrdu hipoteze o ulozi proteina DnaK u zaštiti bakterijskog kromosoma potrebno je izolirati dodatne vrpce koje pokazuju ugradnju razmaknica u lokus CRISPR s gela i sekvenciranjem utvrditi porijeklo razmaknica kad je protein DnaK prisutan u suvišku i kad ga nema.

Za protein DnaK predloženo je da može imati utjecaj i u ostalim bakterijama (Killelea i sur. 2023) zbog visoke konzerviranosti kompleksa Cas1–Cas2 (Makarova i sur. 2020) i proteina DnaK (Hsp70) (Calloni i sur. 2012; Mayer 2021). Potrebna su dodatna istraživanja kako bi se odredilo postoje li i u ostalim organizmima sa sustavom CRISPR-Cas interakcije DnaK s Cas1–Cas2 kao u bakteriji *E. coli*. Također, bilo bi zanimljivo istražiti je li moguća ugradnja razmaknica u soju s inducibilnim genima za kompleks Cas1–Cas2 s kromosoma, u kojem nema strane DNA u citoplazmi. U takvom soju nema strane replicirajuće DNA u obliku plazmida i jedini izvor protorazmaknica je kromosom (ili virusna DNA ukoliko se koriste lizogeni sojevi). Delecija gena *dnaK* trebala bi omogućiti ugradnju novih razmaknica neovisno o stranoj DNA.

6 ZAKLJUČAK

Iz ovih rezultata istraživanja utjecaja proteina DnaK na naivnu CRISPR-Cas adaptaciju u bakteriji *Escherichia coli* K-12 može se zaključiti sljedeće:

- Prisustvo profaga λ cI854 i λ^+ u bakterijama pozitivno utječe na naivnu CRISPR-Cas adaptaciju u bakteriji *E. coli* u uvjetima rasta koji pogoduju njihovoj indukciji, na 37°C.
- Protein DnaK eksprimiran u suvišku negativno utječe na naivnu CRISPR-Cas adaptaciju u lizogenoj bakteriji *E. coli* na 37°C. Dobiveni rezultati u skladu su s pretpostavkom da protein DnaK inhibira aktivnost kompleksa Cas1-Cas2.

7 LITERATURA

- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007a): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* (1979) **315**: 1709–1712.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007b): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**: 1709–1712.
- Bednarz M., Halliday J.A., Herman C., Golding I. (2014): Revisiting Bistability in the Lysis/Lysogeny Circuit of Bacteriophage Lambda. *PLoS One* **9**: e100876.
- Bianco P.R., Kowalczykowski S.C. (1997): The recombination hotspot Chi is recognized by the translocating RecBCD enzyme as the single strand of DNA containing the sequence 5'-GCTGGTGG-3'. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 6706–6711.
- Brouns S.J.J., Jore M.M., Lundgren M., Westra E.R., Slijkhuis R.J.H., Snijders A.P.L., Dickman M.J., Makarova K.S., Koonin E. V., Oost J. Van Der (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* (1979) **321**: 960–964.
- Calloni G., Chen T., Schermann S.M., Chang H.C., Genevax P., Agostini F., Tartaglia G.G., Hayer-Hartl M., Hartl F.U. (2012): DnaK functions as a central hub in the E. coli chaperone network. *Cell Rep* **1**: 251–264.
- Datsenko K.A., Pougach K., Tikhonov A., Wanner B.L., Severinov K., Semenova E. (2012): Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nature Communications* 2012 3:1 **3**: 1–7.
- Dillingham M.S., Kowalczykowski S.C. (2008): RecBCD Enzyme and the Repair of Double-Stranded DNA Breaks. *Microbiol Mol Biol Rev* **72**: 642.
- Dixon D.A., Kowalczykowski S.C. (1993): The recombination hotspot χ is a regulatory sequence that acts by attenuating the nuclease activity of the E. coli RecBCD enzyme. *Cell* **73**: 87–96.

- Gleditsch D., Pausch P., Müller-Esparza H., Özcan A., Guo X., Bange G., Randau L. (2018): PAM identification by CRISPR-Cas effector complexes: diversified mechanisms and structures. <https://doi.org/10.1080/15476286.2018.1504546> **16**: 504–517.
- Haft D.H., Selengut J., Mongodin E.F., Nelson K.E. (2005): A Guild of 45 CRISPR-Associated (Cas) Protein Families and Multiple CRISPR/Cas Subtypes Exist in Prokaryotic Genomes. *PLoS Comput Biol* **1**: e60.
- Hampton H.G., Watson B.N.J., Fineran P.C. (2020): The arms race between bacteria and their phage foes. *Nature* **577**: 327–336.
- Hayes R.P., Xiao Y., Ding F., Erp P.B.G. van, Rajashankar K., Bailey S., Wiedenheft B., Ke A. (2016): Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I–E Cascade from *E. coli*. *Nature* **530**: 499–503.
- 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.
- Killelea T., Dimude J.U., He L., Stewart A.L., Kemm F.E., Radovčić M., Ivančić-Baće I., Rudolph C.J., Bolt E.L. (2023): Cas1–Cas2 physically and functionally interacts with DnaK to modulate CRISPR Adaptation. *Nucleic Acids Res* doi:10.1093/nar/gkad473.
- Kim S., Loeff L., Colombo S., Jergic S., Brouns S.J.J., Joo C. (2020): Selective loading and processing of prespacers for precise CRISPR adaptation. *Nature* **579**: 141–145.
- Koonin E. V., Wolf Y.I. (2016): Just how Lamarckian is CRISPR-Cas immunity: the continuum of evolvability mechanisms. *Biol Direct* **11**: 9.
- Lau C.H., Reeves R., Bolt E.L. (2019): Adaptation processes that build CRISPR immunity: creative destruction, updated. *Essays Biochem* **63**: 227–235.
- Lee H., Sashital D.G. (2022): Creating memories: molecular mechanisms of CRISPR adaptation. *Trends Biochem Sci* **47**: 464–476.
- 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., Oost J. van der, 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. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA. *Science* **322**: 1843–1845.
- Mayer M.P. (2021): The Hsp70-Chaperone Machines in Bacteria. *Front Mol Biosci* **8**: 694012.
- Miller J.H. (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbour, 1972). *Experiments in molecular genetics*. .
- Mitić D. (2023): Mehanizmi regulacije sustava CRISPR–Cas u bakteriji *Escherichia coli*. at <<https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:217:557423>>.
- Mitić D., Bolt E.L., Ivančić-Baće I. (2023): CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli*. *Biosci Rep* **43**: BSR20221198.
- Mojica F.J.M., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology (N Y)* **155**: 733–740.
- Nuñez J.K., Harrington L.B., Kranzusch P.J., Engelman A.N., Doudna J.A. (2015a): Foreign DNA capture during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature* 2015 527:7579 **527**: 535–538.
- Nuñez J.K., Kranzusch P.J., Noeske J., Wright A. V., Davies C.W., Doudna J.A. (2014): Cas1-Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 528–534.
- Nuñez J.K., Lee A.S.Y., Engelman A., Doudna J.A. (2015b): Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity. *Nature* 2015 519:7542 **519**: 193–198.
- Nussenzweig P.M., Marraffini L.A., Cornell W., Rockefeller /, Sloan /, Tri K. (2020): Molecular Mechanisms of CRISPR-Cas Immunity in Bacteria INTRODUCTION: THE ANATOMY OF CRISPR LOCI AND THE PHASES OF THE CRISPR IMMUNE RESPONSE. doi:10.1146/annurev-genet-022120.

- 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.
- Radovčić M., Killelea T., Savitskaya E., Wettstein L., Bolt E.L., Ivančić-Baće I. (2018): CRISPR-Cas adaptation in *Escherichia coli* requires RecBCD helicase but not nuclease activity, is independent of homologous recombination, and is antagonized by 5' ssDNA exonucleases. *Nucleic Acids Res* **46**: 10173–10183.
- Ramachandran A., Summerville L., Learn B.A., DeBell L., Bailey S. (2020): Processing and integration of functionally oriented pre-spacers in the *Escherichia coli* CRISPR system depends on bacterial host exonucleases. *Journal of Biological Chemistry* **295**: 3403–3414.
- Redding S., Sternberg S.H., Marshall M., B G., P B., CK G., B W., JA D., EC G. (2015): Surveillance and Processing of Foreign DNA by the *Escherichia coli* CRISPR-Cas System. *Cell* **163**: 854–65.
- Rollie C., Schneider S., Brinkmann A.S., Bolt E.L., White M.F. (2015): Intrinsic sequence specificity of the Cas1 integrase directs new spacer acquisition. *Elife* **4**: e08716.
- Sashital D.G., Wiedenheft B., Doudna J.A. (2012): Mechanism of foreign DNA selection in a bacterial adaptive immune system. *Mol Cell* **46**: 606–615.
- Savitskaya E., Semenova E., Dedkov V., Metlitskaya A., Severinov K. (2013): High-throughput analysis of type I-E CRISPR/Cas spacer acquisition in *E. coli*. *RNA Biol* **10**: 716–725.
- Sinkunas T., Gasiunas G., Fremaux C., Rodolphe B., Horvath P., Siksnys V. (2011): Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system. *EMBO J* **30**: 1335–42.
- Subramaniam S., Smith G.R. (2022): RecBCD enzyme and Chi recombination hotspots as determinants of self vs. non-self: Myths and mechanisms. *Adv Genet* **109**: 1–37.
- Suttle C.A. (2007): Marine viruses — major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol* **5**: 801–812.

Swarts D.C., Mosterd C., Passel M.W.J. van, Brouns S.J.J. (2012): CRISPR Interference Directs Strand Specific Spacer Acquisition. *PLoS One* **7**: e35888.

Tesson F., Hervé A., Mordret E., Touchon M., d'Humières C., Cury J., Bernheim A. (2022): Systematic and quantitative view of the antiviral arsenal of prokaryotes. *Nat Commun* **13**: 2561.

Wang J., Li J., Zhao H., Sheng G., Wang M., Yin M., Wang Y. (2015): Structural and Mechanistic Basis of PAM-Dependent Spacer Acquisition in CRISPR-Cas Systems. *Cell* **163**: 840–853.

Yosef I., Goren M.G., Qimron U. (2012): Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **40**: 5569–5576.

8 ŽIVOTOPIS

Mario Jurada rođen je 16. ožujka 2002. godine u Rijeci gdje je završio osnovnu i srednju školu (prirodoslovno-matematičku gimnaziju). Godine 2020. je upisao preddiplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Godine 2022. obavljao je laboratorijsku stručnu praksu na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a pod mentorstvom prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.