

Utjecaj različitih gena na zaštitnu ulogu sustava CRISPR-Cas u bakteriji Escherichia coli

Peter, Klara

Master's thesis / Diplomski rad

2021

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:217:494799>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-04-18**



Repository / Repozitorij:

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



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Klara Peter

**Utjecaj različitih gena na zaštitnu
ulogu sustava CRISPR-Cas u bakteriji
*Escherichia coli***

Diplomski rad

Zagreb, 2021.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Klara Peter

**The impact of different genes on the
CRISPR-Cas mediated defence in
*Escherichia coli***

Master thesis

Zagreb, 2021.

Ovaj rad je izrađen na Zavodu za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod voditeljstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće, te neposrednim voditeljstvom dr. sc. Marina Radovčića. Rad je predan na ocjenu Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu radi stjecanja zvanja magistra edukacije biologije i kemije.

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

Iskreno zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Ivani Ivančić Baće na pruženoj prilici i ukazanom povjerenju. Hvala na uloženom trudu, darovanom vremenu, velikodušnosti, pomoći, strpljenju, savjetima i konstruktivnim kritikama tijekom izrade ovog diplomskog rada. Hvala na podršci i vedrom duhu. Osmijeh i pozitivan duh neka uvijek ostanu Vaša *differentia specifica*.

Zahvaljujem dr. sc. Marinu Radovčiću za upoznavanje sa znanstvenom problematikom. Od srca hvala na suradnji, uputama i odgovorima na pitanja tijekom provođenja eksperimentalnog dijela.

Hvala Klari, kolegici i prijateljici, na podršci i vjeri u mene. Hvala ti što si bila uz mene i što si mi pomogla nositi se s povremenim olujama, ali i svjesno uživati u bonacama.

Hvala kolegicama i prijateljicama Petri i Sari, koje su uvijek bile uz mene i koje su vjerovala da mi to možemo. Hvala što ste mi pružile sigurnost i radost u trenucima koji su budili želju da pobjegnem od svega, ali i nudili čvrste razloge da ostanem. Uz vas je sve bilo lakše. Hvala vam što ste uvijek znale cijeniti moj sjaj. Drage moje, hvala za sve trenutke koje smo podijelile i koji nas tek čekaju. Bila mi je privilegija studirati uz vas.

Hvala mojoj obitelji na razumijevanju i bezuvjetnoj podršci. Hvala vam što ste uvijek bili tu za mene, što ste vjerovali u mene bez sumnje i strepnje i što ste bili ponosni na svako moje postignuće.

Najveće hvala mami i tati na beskonačnoj ljubavi, iskrenoj podršci, pravom razumijevanju, snazi i utjehi. Hvala na toplini doma, široko otvorenim rukama zagrljaja kojima me svaki put iznova dočekate i koje su moje vječno utočište. Hvala Vam što ste mi bili najbolji prijatelji i putokaz, što ste mi poklonili svoje povjerenje i omogućili da s jasnim ciljem uđem u svoj svemir. Hvala Vam što ste mi dali padobrane da ublaže let i gromobrane da stišaju oluje, što ste me brižno pratili, podupirali i poticali kako bih bila ovo što jesam. Znajte da ste mi dali pravo gorivo za život. Vaše vrijednosti žive u meni. Hvala što ste moje snove učinili mogućim.

Neka moj život bude hvala.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Diplomski rad

Utjecaj različitih gena na zaštitnu ulogu sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Klara Peter
Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Sustav CRISPR-Cas je važan obrambeni mehanizam mnogih prokariota od infekcije stranom DNA, poput plazmida i faga. Sastoji se od lokusa CRISPR i 8 gena *cas* u neposrednoj blizini. Lokus CRISPR sastoji se od niza ponavljajućih palindromskih sekvenci između kojih se nalaze razmaknice, podrijetlom iz faga ili plazmida. Proteini Cas sudjeluju u svim fazama zaštite bakterija od napada stranom DNA koji se odvija u 3 faze. Sekvenciranjem transkriptoma bakterije *Escherichia coli* uzgojenih u različitim uvjetima rasta, pronađeni su zanimljivi geni kandidati koji bi mogli utjecati na aktivnost sustava CRISPR-Cas. U ovom radu je istraživano utječu li geni *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU* i *yjfN* na aktivnost sustava CRISPR-Cas u zaštiti bakterije *E. coli*. Istraživani geni su uspješno klonirani u ekspresijski vektor pBad-HisA što je potvrđeno metodom PCR, restrikcijom plazmida i sekvenciranjem. Tri gena su uspješno deletirana. Analiza dobivenih rezultata ukazuje da niti jedan od istraživanih gena nije aktivator niti represor sustava CRISPR-Cas. Geni *symE* i *yjfN* povratili su aktivnost sustava CRISPR-Cas na 30 °C u soju bez gena *hns* i *htpG* što ukazuje na njihovu indirektnu ulogu. Samo gen *cspE* pokazao je utjecaj na naivnu adaptaciju.

(55 stranica, 15 slika, 22 tablica, 57 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici.

Ključne riječi: CRISPR-Cas, *E. coli*, regulacija, H-NS, HtpG

Voditelj: Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Neposredni voditelj: Dr. sc. Marin Radovčić

Ocjenitelji:

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće
Prof. dr. sc. Ines Radanović
Izv. prof. dr. sc. Vesna Petrović Peroković

Rad prihvaćen: 7. srpnja 2021.

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Master Thesis

The impact of different genes on the CRISPR-Cas mediated defence in *Escherichia coli*

Klara Peter
Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

The CRISPR-Cas system is an important defense mechanism of many prokaryotes by DNA infection, such as plasmids and phages. It consists of the CRISPR locus and 8 *cas* genes in the immediate vicinity. The CRISPR locus consists of a series of repetitive palindromic sequences separated by spacers which are derived from phages or plasmids. Cas proteins participate in all phases of protection of bacteria from attack by foreign DNA, which takes place in 3 phases. By sequencing *Escherichia coli* transcripts grown under different growth conditions, interesting candidate genes were found. We hypothesized that these genes could affect the activity of the CRISPR-Cas system. In this work, the role of *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU* and *yjfN* genes were tested in the CRISPR-mediated protection of *E. coli*. The investigated genes were successfully cloned into the pBad-HisA expression vector and confirmed by PCR, restriction of plasmids and sequencing. Three genes were successfully deleted. Analysis of the obtained results showed that none of the candidate genes is an activator or repressor of the CRISPR-Cas system. The *symE* and *yjfN* genes restored activity of the CRISPR-Cas system at 30 °C in a strain lacking the *hns* and *htpG* genes, indicating their indirect role. Only the *cspE* gene showed an effect on naive adaptation.

(55 pages, 15 figures, 22 tables, 57 references, original in: Croatian)

Thesis is deposited in Central Biological Library.

Keywords: CRISPR-Cas, *E. coli*, regulation, H-NS, HtpG

Supervisor: Assoc. Prof. Ivana Ivančić Baće
Assistant Supervisor: dr. sc. Marin Radovčić

Reviewers:

Dr. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor
Dr. Ines Radanović, Professor
Dr. Vesna Petrović Peroković, Associate Professor

Thesis accepted: 7th July 2021

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Sustav CRISPR-Cas kod prokariota.....	1
1.1.1. Adaptacija – prva faza	3
1.1.1.1. Naivna adaptacija	4
1.1.2. Ekspresija i sazrijevanje crRNA – druga faza.....	7
1.1.3. Interferencija – treća faza.....	8
1.2. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E	8
1.3. Proteini različitih funkcija CspE, IbpB, OppA, SymE, YgcU i YjfN.....	10
2. CILJ ISTRAŽIVANJA	13
3. MATERIJALI I METODE	14
3.1. MATERIJALI	14
3.1.1. Bakterijski sojevi i plazmidi.....	14
3.1.2. Početnice za PCR.....	15
3.1.3. Hranidbeni mediji	18
3.1.4. Puferi.....	19
3.2. METODE.....	20
3.2.1. Konstrukcija plazmida	20
3.2.1.1. Kloniranje gena cspE, ibpB, oppA, symE, ygcU i yjfN.....	20
3.2.1.2. Elektroforeza u agaroznom gelu	21
3.2.1.3. Pročišćavanje DNA iz PCR reakcija i mjerenje koncentracije fragmenata DNA ..	21
3.2.1.4. Rezanje DNA (produkata PCR i vektora pBad-HisA) restrikcijskim enzimima...	22
3.2.1.5. Ligacija fragmenata DNA u vektor pBad-HisA	23
3.2.1.6. Transformacija bakterija plazmidnom DNA	24
3.2.1.7. Provjera uspješnosti kloniranja	24
3.2.1.8. Izolacija plazmidne DNA	25
3.2.1.9. Sekvenciranje	25
3.2.2. Priprema kemijski kompetentnih stanica i transformacija konstruiranim plazmidima	25
3.2.3. Konstrukcija delecijskog mutanta	26
3.2.3.1. Priprema linearne DNA	26
3.2.3.2. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija linearnom DNA	27
3.2.4. Određivanje formiranja čistina faga λ vir pri različitim temperaturama inkubacije	28

3.2.5. Konstrukcija bakterijskih sojeva metodom transdukcije fagom P1 <i>vir</i>	28
3.2.6. Određivanje efikasnosti naivne adaptacije (ugradnje novih razmaknica)	29
4. REZULTATI	31
4.1. Kloniranje gena <i>cspE</i> , <i>ibpB</i> , <i>oppA</i> , <i>symE</i> , <i>ygcU</i> i <i>yjfN</i>	31
4.2. Konstrukcija mutanata s kromosomskom delecijom gena	35
4.3. Utjecaj prekomjerne ekspresije istraživanih gena na efikasnost formiranja čistina faga λ <i>vir</i>	38
4.4. Utjecaj delecije pojedinog gena na aktivnost sustava CRISPR-Cas	41
4.5. Utjecaj istraživanih gena na naivnu adaptaciju.....	42
5. RASPRAVA.....	44
6. ZAKLJUČAK.....	48
7. LITERATURA	49
8. ŽIVOTOPIS.....	55

POPIS KRATICA

Cas	od engl. <i>CRISPR-associated genes</i>
Cascade	od engl. <i>CRISPR-associated complex for antiviral defence</i>
CRISPR	od engl. <i>clustered regularly interspaced short palindromic repeats</i>
crRNA	CRISPR RNA
dH ₂ O	deionizirana voda
dsDNA	dvolančana DNA
FAD	flavin adenin dinukleotid
H-NS	od engl. <i>heat-stable nucleoid-structuring protein</i>
HtpG	od engl. <i>high-temperature protein G</i>
Hsp83	od engl. <i>heat shock protein 83</i>
IHF	od engl. <i>integration host faktor</i>
IPTG	izopropil- β -D-1-tiogalaktopiranozid
kb	kilobaza
LB	od engl. <i>Luria broth</i>
LeuO	od engl. <i>transcriptional activator of leuABCD operon</i>
nt	nukleotid
PAM	od engl. <i>protospacer adjacent motif</i>
pb	par baza
PFU	od engl. <i>plaque-forming units</i>
PCR	od engl. <i>polymrase chain reaction</i>
rpm	od engl. <i>round per minute</i>
RT-PCR	od engl. <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i>
StpA	od engl. <i>suppressor of td phenotype A</i>
TAE	tris-acetat-EDTA
wt	od engl. <i>wild type</i>

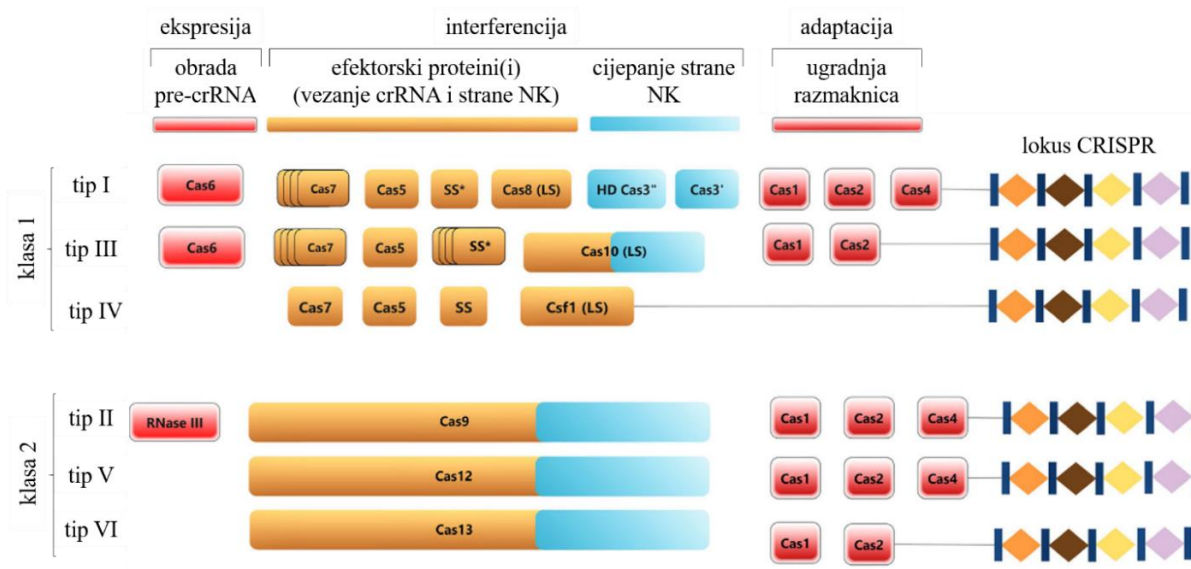
1. UVOD

1.1. Sustav CRISPR-Cas kod prokariota

Prokariotski organizmi pod stalnim su napadom virusa, bakteriofaga, i plazmida, i stoga su razvili brojne mehanizme obrane. Sustav CRISPR-Cas (od engl. *clustered regularly interspaced short palindromic repeats - CRISPR-associated genes*) je važan mehanizam obrane kojim se prokarioti brane od virusa, odnosno napada stranom DNA koja se prenosi horizontalnim prijenosom (Marraffini i Sontheimer 2008). Sastoji se od lokusa CRISPR kojeg čine ponavljajuće palindromske sekvence DNA između kojih se nalaze razmaknice (od engl. *spacer*) koje potječu od DNA faga ili plazmida (Mojica i sur. 2005).

Osim proteina Cas i lokusa CRISPR, za pravilno funkcioniranje sustava CRISPR-Cas važna je vodeća regija (od engl. *leader*), smještena uzvodno od prvog ponavljajućeg slijeda, i motiv PAM (od engl. *protospacer adjacent motif*), kratki slijed nukleotida prisutan samo u ciljnoj DNA. Vodeća regija pomaže pri pravilnom orijentiranju nove razmaknice prilikom ugradnje u lokus CRISPR te potiče njegovo prepisivanje (Pougach i sur. 2010). Kako bi se ugradila nova razmaknica i prepoznala strana DNA, u stranoj se DNA, odmah uz protorazmaknicu, mora nalaziti kratka sekvenca PAM koja se ne ugrađuje u lokus CRISPR. Prisutnost sekvence PAM omogućuje bakteriji razlikovanje vlastite od strane DNA (Mojica i sur. 2009), odnosno razlikovanje ciljne DNA od razmaknice ugrađene u lokus CRISPR koja uza sebe nema motiv PAM.

Na temelju proteina Cas uključenih u treću fazu, interferenciju, brojni sustavi CRISPR-Cas klasificirani su u dvije klase (Koonin i Makarova 2017; Marraffini i Sontheimer 2008). Klasi 1 pripadaju sustavi koji imaju više različitih proteina Cas koji sudjeluju u obradi i prepoznavanju strane DNA (Slika 1). U klasu 2 spadaju sustavi u kojima jedan protein Cas obavlja sve funkcije potrebne za interferenciju. Klase se dalje dijele na tipove (klasa 1 dijeli se na tip I, III i IV, a klasa 2 na tip II, V i VI) (Slika 1) i podtipove, primjerice tip I-A, I-E, prema svojim prepoznatljivim proteinima Cas.

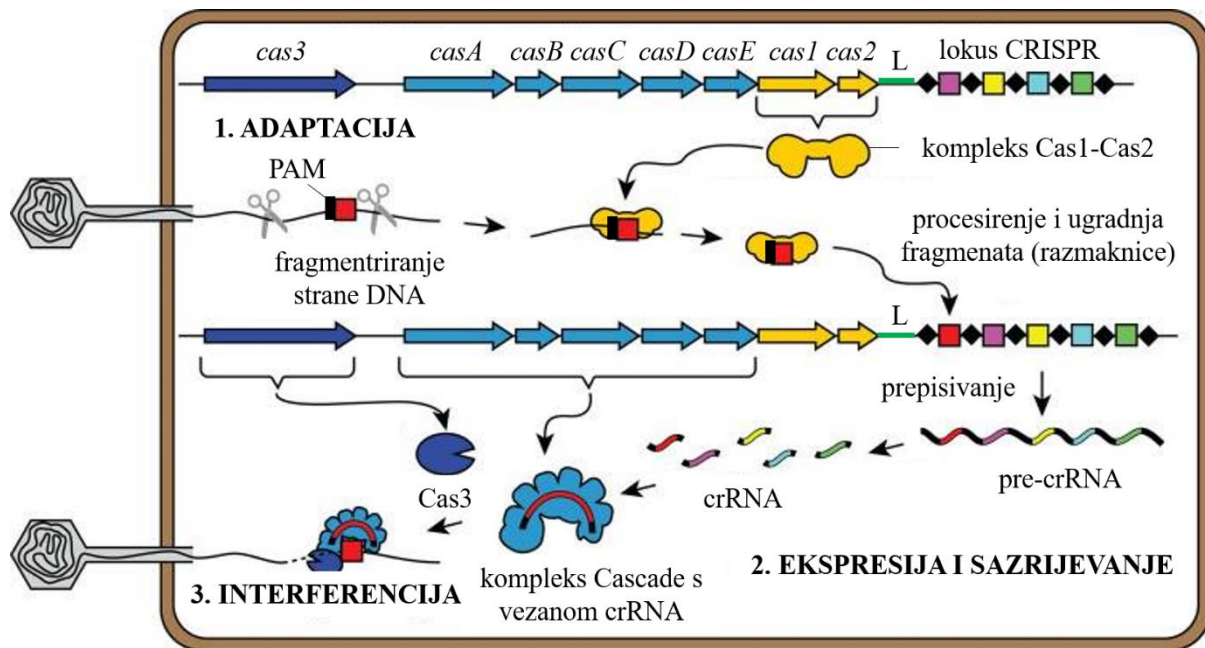


Slika 1. Klasifikacija sustava CRISPR-Cas obzirom na proteine Cas koji su uključeni u treću fazu, interferenciju. Proteini označeni sa više boja imaju ulogu u različitim fazama zaštite sustavom CRISPR-Cas. NK = nukleinska kiselina, SS/LS = mala/velika podjedinica (od engl. *small/large subunit*). Zvezdica označava da je SS spojena s LS. Preuzeto i prilagođeno iz Zang i sur. 2020.

Bakterija *Escherichia coli* K-12 ima sustav CRISPR-Cas tip I-E koji se sastoji od osam gena *cas*; *cas1*, *cas2*, *cas3*, *casA*, *casB*, *casC*, *casD* i *casE*. Njihovom ekspresijom nastaju proteini Cas odgovorni za obrambeni mehanizam bakterija. Između gena *cas* i lokusa CRISPR nalazi se vodeća regija (od engl. *leader*), unutar koje se nalazi promotor s kojeg započinje prepisivanje lokusa CRISPR (Pougach i sur. 2010).

Zaštita bakterije sustavom CRISPR-Cas odvija se kroz tri faze: adaptacija, ekspresija i sazrijevanje te interferencija (Slika 2). Prva faza se naziva adaptacija i u njoj dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR s kojom se stanica domaćina prethodno nije susrela. Za taj proces su potrebni samo proteini Cas1 i Cas2 (Yosef i sur. 2012). Produkti gena *casABCDE* formiraju proteinski kompleks Cascade (od engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) koji je bitan za sazrijevanje molekula crRNA (Gong i sur. 2014; Xue i Sashital 2019). U fazi ekspresije prepisivanjem lokusa CRISPR nastaje dugačka nezrela pre-crRNA, koju podjedinica CasE iz proteinskog kompleksa Cascade cijepa na kratke zrele molekule crRNA (CRISPR RNA) (Brouns i sur. 2008). U trećoj fazi, interferenciji, molekule crRNA vezane na kompleks Cascade pronalaze ciljnu DNA po principu komplementarnosti. Sparivanjem baza nastaje stabilna R-omča, hibrid

DNA i RNA te istisnuti lanac DNA (Jore i sur. 2011), na koji se veže protein Cas3 i svojom nukleaznom aktivnošću cijepa i degradira stranu molekulu DNA (Gong i sur. 2014).



Slika 2. Tri faze obrambenog mehanizma sustava CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E.coli* K-12. Vodeća regija (od engl. *leader*) označena je zelenom crtom i slovom L. Crni rombovi u lokusu CRISPR predstavljaju ponavljajuće sljedove, a različito obojani kvadrati jedinstvene sljedove, odnosno razmaknice. Crveni kvadrat predstavlja protorazmaknicu u stranoj DNA koju nukleaze (prikazane u obliku škara) cijepaju na fragmente koje veže adaptacijski kompleks Cas1-Cas2 i ugrađuje u lokus CRISPR. Crni pravokutnik uz protorazmaknicu predstavlja motiv PAM. Tijekom ekspresije i sazrijevanja lokus CRISPR se najprije prepisuje u dugačku nezrelu pre-crRNA koje se cijepa do kratkih zrelih crRNA. Kompleks Cascade veže molekule crRNA i pretražuje DNA sadržaj u stanici. Pronalaskom protorazmaknice s motivom PAM, iz koje je nastala razmaknica, kompleksu Cascade s vezanom crRNA, pridružuje se nukleaza Cas3 koja cijepa stranu DNA. Preuzeto i dorađeno iz Xue i Sashital 2019.

1.1.1. Adaptacija – prva faza

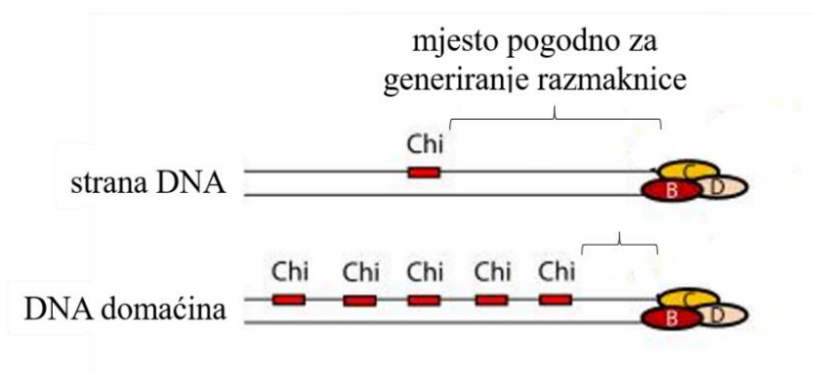
Za bakteriju *E. coli* i organizme koji imaju sustav CRISPR-Cas tip I karakteristična su dva oblika ugradnje: naivna (od engl. *naive*) i pripremljena (od engl. *primed*) (Yosef i sur. 2012). Tijekom naivne adaptacije dolazi do ugradnje razmaknice u lokus CRISPR s kojom se stanica domaćina prethodno nije susrela. Za taj proces su potrebni samo proteini Cas1 i Cas2 (Yosef i sur. 2012). Osim toga, smatra se da enzim RecBCD ima važnu ulogu u razlikovanju vlastite DNA od strane, kao i u nastajanju fragmenata molekule DNA za naivnu ugradnju (Levy i sur. 2015). Do

pripremljene adaptacije dolazi kada u stanici u lokusu CRISPR već postoji razmaknica protiv strane molekule DNA koja potiče ugradnju dodatnih razmaknica iz iste strane molekule DNA. Za pripremljenu ugradnju u bakteriji *E. coli* osim proteina Cas1 i Cas2 potrebni su i proteinski produkti preostalih gena *cas* koji su uključeni u treću fazu, interferenciju (Datsenko i sur. 2012).

1.1.1.1. Naivna adaptacija

Tijekom adaptacije dolazi do prepoznavanja stranih nukleinskih kiselina koje se obrađuju te se u obliku nove razmaknice ugrađuju unutar lokusa CRISPR uz duplikaciju nove ponavljajuće sekvence (Amitai i Sorek 2016). Provedena istraživanja pokazala su da se najveći izvor razmaknica nalazi između mjesta Chi i zaustavljenih replikacijskih rašlji, glavnog izvora dvostrukih lomova DNA (Levy i sur. 2015).

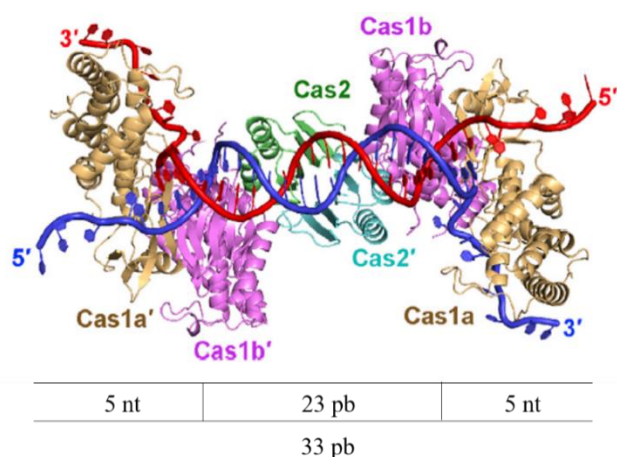
Genom *E. coli* obogaćen je mjestima Chi, koja se pojavljuju svakih otprilike 4,6 kb. Prilikom dvolančanog loma egzozukeazna aktivnost enzima RecBCD, prije nego što je degradacija zaustavljena mjestom Chi, odmota manji dio bakterijske DNA koji može poslužiti kao izvor protorazmaknica (Slika 3).



Slika 3. Genom strane DNA i genom stanice domaćina, *E. coli*. Vitičastom zagradom označena su mjesta pogodna za generiranje razmaknica smještena između mjesta Chi (crveni pravokutnici) nukleaze RecBCD (podjedinice B, C i D obojane su crvenom, narančastom i bež bojom). Preuzeto i doručeno iz Levy i sur. 2015.

Proteini Cas1 i Cas2 tvore heksamerni kompleks, koji obavlja glavni dio adaptacijskog procesa, a koji je sastavljen od dva dimera proteina Cas1 međusobno spojenih dimerom proteina Cas2 (Slika 4). Karakteristika proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 jest prepoznavanje motiva PAM. Naime, podjedinica Cas1 prepoznaje motiv PAM, pri čemu najveći afinitet ima za motiv PAM sekvence 5'-AAG-3' (Levy i sur. 2015).

Kompleks Cas1-Cas2 najprije veže protorazmaknicu, a potom je ugrađuje u lokus CRISPR, stoga je njegova uloga u adaptaciji dvostruka. Najprije, kompleks Cas1-Cas2 prepoznaje fragmente dsDNA s jednolančanim krajevima koje stvara egzonukleaza RecBCD, koja prepoznaje dvolančane lomove, odmotava molekulu DNA te cijepa do mjesta Chi (sekvenca od 8 nukleotida). Nastali jednolančani fragmenti mogu se hibridizirati te postati potencijalni supstrat za kompleks Cas1-Cas2, pri čemu se podjedinice Cas1 vežu za 3'-krajeve pronađenog fragmenta, prepoznaju PAM i režu lance, odnosno stvaraju protorazmaknicu duljine oko 33 pb koju čine centralni dvolančani dio (duljine 23 pb) i jednolančani stršeci krajevi od 5 nukleotida sa svake strane (Nuñez i sur. 2015) (Slika 4). Dvolančani dio protorazmaknice stabiliziran je interakcijama s dimerom Cas2 (Amitai i Sorek 2016; Westra i sur. 2013; Yosef i sur. 2012), odnosno veže se na površinu dimera Cas2, pri čemu je stabiliziran interakcijama između seta argininskih kompleksa Cas1-Cas2 i fosfatnih ostataka fosfodieterskih veza protorazmaknice.



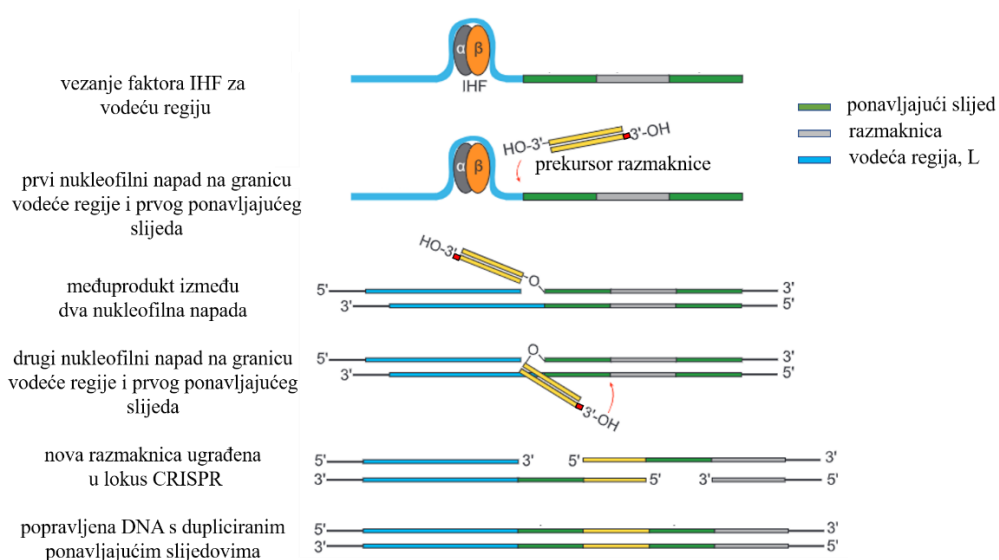
Slika 4. Adaptacijski kompleks Cas1-Cas2 bakterije *E. coli* K-12 građen je od dva dimera proteina Cas1 međusobno spojenih dimerom proteina Cas2 i vezan za prekursor razmaknice. Podjedinice dimera Cas2 svojom su površinom u interakciji s dvolančanom regijom (23 pb) molekule DNA. 5'-stršeci krajevi izloženi su okolini, dok se 3'-stršeci krajevi (5 nt) nalaze u aktivnom mjestu podjedinica Cas1a i Cas1a'. Preuzeto i doručeno iz Wang i sur. 2015.

Fragmenti molekule DNA nastali nukleaznim cijepanjem enzima RecBCD u pravilu su duži od finalnog supstrata kojeg proteinski kompleks Cas1-Cas2 ugrađuje u kromosom, stoga dolazi do njihove obrade i sazrijevanja. Budući da u drugim sustavima CRISPR-Cas tipa I postoji protein Cas koji cijepa prekursore razmaknica, protein Cas4, (Kieper i sur. 2018; Rollie i sur. 2018) i da se 3'-stršeci krajevi u proteinskom kompleksu Cas1-Cas2 nalaze unutar nukleaznog centra svake

od podjedinica Cas1 (Nuñez i sur. 2015), moguće je da kompleks Cas1-Cas2 sudjeluje u procesiranju i sazrijevanju prekursora razmaknica (Radovčić 2021).

U završnoj fazi adaptacije, kompleks Cas1-Cas2 s vezanom zreom razmaknicom prepoznaje lokus CRISPR te katalizira ugradnju razmaknice u lokus CRISPR za što je neophodno formiranje kompleksa Cas1-Cas2 i funkcionalna nukleazna aktivnost podjedinice Cas1 (Nuñez i sur. 2015). Nova razmaknica ugrađuje se između vodeće sekvence i prve ponavljajuće sekvence lokusa CRISPR (Yosef i sur. 2012). Kompleks Cas1-Cas2 dovodi 3'-OH skupine razmaknice na 5'-kraj prvog ponavljajućeg slijeda poradi čega dolazi do nukleofilnog napada i dvije reakcije transesterifikacije (Slika 5).

Ispravnu orijentaciju nove razmaknice određuje 3'-citozin motiva PAM (5'-CTT-3') (Amitai i Sorek 2016) u aktivnom mjestu dimera Cas1. U aktivnom mjestu dimera Cas1 dolazi do cijepanja motiva PAM između nukleotida G1 i A2 te nastaje razmaknica veličine 33 pb čiji 3'-kraj završava OH skupinom gvanina, odnosno nukleotidom motiva PAM (Wang i sur. 2015). Također, motiv PAM bitan je za zaštitu vlastite genomske DNA od sustava CRISPR-Cas i za prepoznavanje strane DNA. Motiv PAM se prije ugradnje u lokus CRISPR izrezuje iz razmaknice (Datsenko i sur. 2012) kako u fazi interferencije sam lokus CRISPR ne bi bio pocijepan nukleazom Cas3. Za ugradnju nove razmaknice u lokus CRISPR potreban je heterodimer IHF (od engl. *integration host faktor*) iz bakterijske porodice histonskih proteina, koji se veže uzvodno od vodeće regije (Nuñez i sur. 2016; Rollie i sur. 2015), inducira savijanje molekule DNA te određuje točno mjesto ugradnje nove razmaknice (Amitai i Sorek 2016; Jackson i sur. 2017). Krajnji produkt adaptacije je novougrađena razmaknica s čije se obje strane nalazi jedan istisnuti lanac prvog ponavljajućeg slijeda (Radovčić 2021) (Slika 5).



Slika 5. Ugradnja razmaknice u lokus CRISPR. Faktor IHF sastoji se od podjedinica α (označena tamno sivom bojom) i β (označena narančastom bojom) te se veže za vodeću regiju, L (označena plavom bojom). Tijekom dviju reakcija transesterifikacije OH skupine na 3'-stršecim krajevima prekursora razmaknice nukleofilno napadaju 5'-stršeci kraj prvog ponavljajućeg slijeda (označen zelenom bojom) smještenog uz vodeću regiju, L, te 5'-kraj prvog ponavljajućeg slijeda smještenog uz prvu razmaknicu (označena svijetlo sivom bojom) u lokusu CRISPR. Crvenom bojom označen je motiv PAM, prisutan u prekursoru razmaknice. Preuzeto i doradeno iz Nuñez i sur. 2015.

1.1.2. Ekspresija i sazrijevanje crRNA – druga faza

U fazi ekspresije dolazi do prepisivanja lokusa CRISPR čime nastaje dugački transkript nezrele molekule CRISPR DNA (pre-crRNA). Kako bi se spriječilo antisense prepisivanje nizvodnih gena, zadnja ponavljajuća sekvenca kod bakterije *E. coli* je degenerirana i predstavlja potencijalan signal za terminaciju transkripcije (Pougach i sur. 2010). Pre-crRNA sadrži ponavljajuće palindromske sekvence koje mogu stvarati omče. Protein CasE iz proteinskog kompleksa Cascade cijepa pre-crRNA na zrele molekule crRNA, od kojih svaka sadrži 8 nukleotida, porijeklom od ponavljajuće regije na 5'-kraju, cijelu razmaknicu u sredini i ukosnicu sastavljenu od 7 parova baza na 3'-kraju, formiranu od strane palindromskih sljedova sljedeće ponavljajuće regije (Charpentier i sur. 2015). Za aktivnost proteina CasE neophodno je prisustvo konzerviranog aminokiselinskog ostatka His²⁰ (Brouns i sur. 2008). Dokazano je da protein CasE, koji zajedno s proteinima CasA, CasB, CasC i CasD čini proteinski kompleks Cascade, ne može

cijepati pre-crRNA iz drugog bakterijskog soja niti molekule RNA koji porijeklom nisu iz regije CRISPR. Zrela crRNA ostaje vezana na proteinski kompleks Cascade, formirajući nukleoproteinski kompleks crRNA-Cascade.

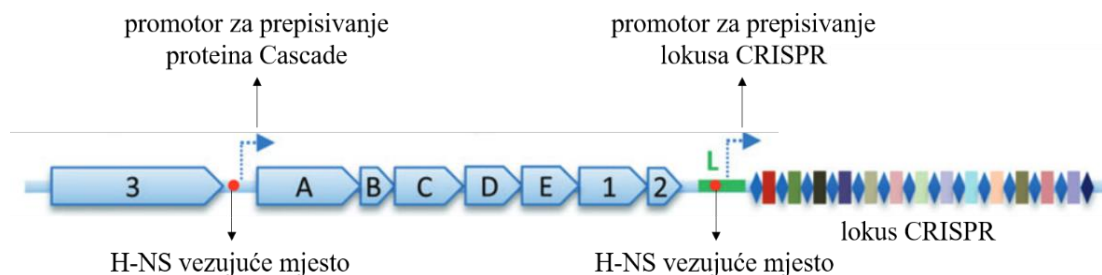
1.1.3. Interferencija – treća faza

Formirani nukleoproteinski kompleks cr-RNA-Cascade pretražuje DNA sadržaj stanice, pri čemu podjedinica CasA, po prisutstvu motiva PAM u ciljnoj DNA, pomaže u razlikovanju ciljne DNA od identične DNA iz lokusa CRISPR (Hayes i sur. 2016). Nakon prepoznavanja motiva PAM, kompleks Cascade započinje odmotavanje lanca ciljne DNA, pri čemu se jedan lanac ciljne molekule DNA komplementarno sparuje s molekulom crRNA, dok drugi lanac ciljne molekule DNA ostaje istisnut te se formira struktura R-omče (Xiao i sur. 2017; Xiao i sur. 2019).

Pokazano je da za uspješnu obradnu od faga u bakteriji *E. coli* nije dovoljno samo prisustvo molekula crRNA i proteinskog kompleksa Cascade, već je potreban i protein Cas3 (Brouns i sur. 2008) koji ima helikaznu i nukleaznu aktivnost. Komplementarnost između crRNA i ciljne DNA stvara stabilnu R-omču koja dovodi do konformacijske promjene kompleksa Cascade što rezultira dovođenjem proteina Cas3 na ciljnu DNA (Xue i sur. 2016). Naposljetku, protein Cas3 helikaznom aktivnošću uz utrošak ATP-a odmatu ciljnu molekulu DNA te je nukleaznom aktivnošću cijepa čime završava faza interferencije (Gong i sur. 2014; Huo i sur. 2014).

1.2. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E

Na aktivnost sustava CRISPR-Cas utječu različiti faktori, među kojima su protein H-NS, protein LeuO, šaperon HtpG i temperatura. Prepisivanje proteina Cascade pod kontrolom je promotora smještenog uzvodno od gena koji kodira protein CasA. Promotor odgovoran za prepisivanje lokusa CRISPR nalazi se unutar vodeće regije smještene uzvodno od lokusa CRISPR (Slika 6). Oba promotora utišana su proteinom H-NS (od eng. *heat stable nucleoid structuring*), globalnim transkripcijskim represorom (Pougach i sur. 2010; Pul i sur. 2010), koji se veže za regije bogate AT baznim parovima (Pul i sur. 2010) (Slika 4).



Slika 6. Mjesta vezanja proteina H-NS u sustavu CRISPR-Cas I-E u bakteriji *E. coli*. Plavim strelicama s lijeva na desno prikazani su geni *cas*, plavim isprekidanim strelicama označani su promotori, a crvenim točkama vezna mjesta proteina H-NS smještena uzvodno od gena koji kodiraju proteine kompleksa Cascade i uzvodno od lokusa CRISPR u vodećoj regiji označenoj zelenom bojom i slovom L. Lokus CRISPR prikazan je u obliku plavnih rombova (ponavljajućih sljedova) i različito obojanih pravokutnika (jedinstveni sljedovi, odnosno razmanice). Preuzeto i prilagođeno iz Mojica i Díez-Villaseñor 2010.

U bakteriji *E. coli* regulacijski protein H-NS inhibira transkripciju svih gena *cas* i lokusa CRISPR. Istraživanja su pokazala da zaštita bakterija od infekcije fagom lambda u slučaju kada su kompleks Cascade, crRNA i Cas3 eksprimirani, a transkripcijski represor sustava CRISPR-Cas, H-NS inaktiviran (mutant Δhns), ovisi o temperaturi inkubiranja. Majsec i sur. (2016) su pokazali da u slučaju kada su stanice uzgojene do stacionarne faze rasta na 37 °C protein H-NS negativno regulira transkripciju gena *cas3*. Osim toga, protein H-NS sudjeluje u organizaciji kromosomske DNA (Fang i Rimskey 2008), a njegov utjecaj može se smanjiti promjenom u temperaturi, osmolarnosti, pH ili kompeticijom raznih proteina (Pul i sur. 2010). Kako bi se aktivirano sustav CRISPR-Cas i osigurala obrana od stranih nukleinskih kiselina potrebno je poništiti represiju gena *cas* uzrokovanu proteinom H-NS.

Protein LeuO, pozitivni regulator ekspresije koji pripada porodici LysR transkripcijskih faktora, je antagonist proteinu H-NS. Inaktivacija proteina H-NS DNA-vezujućim proteinom LeuO omogućuje inicijaciju prepisivanja (Westra i sur. 2010), pri čemu se protein LeuO veže na regiju koja sadrži promotor ta tako sprječava polimerizaciju proteina H-NS duž te regije (Mojica i Díez-Villaseñor 2010). Dakle, povećana ekspresija gena *leuO* ili delecija gena *hns* uzrokuje povećanu transkripciju gena *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5*, *cas6*, *cas1* i *cas2* te akumulaciju zrelih crRNA. Prisutnost proteina LeuO u stanicama *E. coli*, koje u lokusu CRISPR imaju razmaknicu komplementarnu dijelu genoma faga λvir , smanjuje njihovu osjetljivost na infekciju fagom λvir .

Protein HtpG iz *E. coli* spada u skupinu šaperona Hsp90 te je homologan proteinu Hsp83 (od engl. *heat shock protein 83*) izoliranom iz vrste *Drosophila melanogaster*. Količina šaperona

povećava se pri povišenoj temperaturi, infekciji fagom ili u prisustvu toksičnih tvari (Bardwell i Craig 1987). Pokazano je da je šaperon HtpG važan u održavanju funkcionalne razine proteina Cas3 (Yosef i sur. 2011). Također, Josef i sur. (2011) otkrili su da nedostatak proteina HtpG rezultira smanjenjem aktivnog proteina Cas3, čiji se nedostak može nadomijestiti povećanom količinom protina Cas3 ekspresijom s plazmida.

1.3. Proteini različitih funkcija CspE, IbpB, OppA, SymE, YgcU i YjfN

Navedeni proteini spadaju u slabije istražene proteine i o njima nema dovoljno podataka u literaturi. Protein CspE pripada skupini proteina hladnog šoka te djeluje kao transkripcijski antiterminator (Bae i sur. 2000) i regulator stabilnosti RNA. Ekspresija *cspE* na 37 °C je konstitutivna (Bae i sur. 2000) i privremeno inducirana kao odgovor na hladni šok na razini transkripta i proteina (Uppal i sur. 2008). CspE se konstitutivno proizvodi u svim fazama rasta, osim u lag fazi, kada je uočeno povećanje njegove sinteze (Bae i sur. 1999). Prekomjerna ekspresija *cspE* pokazuje deseterostruko povećanje otpornosti na kamfor (Sand i sur. 2003). Pokazano je da CspE *in vitro* inhibira transkripcijsku antiterminaciju posredovanu fagom Q (Hanna i Liu 1998). Delecijski mutant *cspE* ($\Delta cspE$) nema inhibiciju rasta, ali pokazuje dulje zadržavanje u lag fazi od divljeg tipa nakon razrjeđivanja u svježem mediju (Bae i sur. 1999). S druge strane, insercijski mutanat *cspE* vrlo je osjetljiv na UV i gama zračenje (Mangoli i sur. 2001).

Protein IbpB pripada skupini široko konzerviranih malih proteina toplinskog šoka. IbpB je molekularni šaperon koji pomaže u ponovnom smatanju denaturiranih proteina u prisutnosti drugih šaperona (Veinger i sur. 1998). Smatra se da je homodimer funkcionalna jedinica aktivnog IbpB. Također, IbpB stvara oligomere, čije je smanjenje veličine povezano s povećanjem aktivnosti. Oligomeri IbpB vežu i stabiliziraju urea denaturiranu laktat dehidrogenazu i toplinski denaturiranu malat dehidrogenazu (MDH) te na taj način sprječavaju nepovratnu agregaciju proteina tijekom nastalog stresa (Veinger i sur. 1988). Prekomjerna ekspresija *ibpB* dovodi do povećane otpornosti na toplinu (Kitagawa i sur. 2000). S druge strane, mutant *ibpB* je, u odnosu na divlji tip, osjetljiviji na vodikov peroksid i stres uzrokovan kadmijem (Lee i sur. 2010).

Protein OppA je periplazmatski protein koji posreduje u unosu oligopeptida. OppA iz *E. coli* ima 85 % identičnih sekvenci s OppA iz vrste *Salmonella typhimurium* (Klepsch i sur. 2011). *oppA* pokazuje diferencijalnu adaptaciju kodona koja rezultira diferencijalnom učinkovitosti transkripcije u termofilnim mikrobima. Sukladno tome, smatra se da *oppA* igra ulogu u reakcijama

toplinskog šoka. Pročišćeni protein OppA povećava smatanje denaturiranog supstrata i štiti od termičke denaturacije (Richarme i Caldas 1997). Dakle, OppA ima svojstva slična šaperonima. Delecijski mutant *oppA* ($\Delta oppA$) je, u odnosu na divlji tip, osjetljiviji na toplinski šok, ali ne i na druge vrste stresova (Krisko i sur. 2014).

Iako SymE pripada sustavu toksin-antitoksin tipa I, on nije hidrofobni protein i ne pokazuje funkcionalnu homologiju s drugim proteinima tipa I (Kawano 2012). SymE potiče razgradnju RNA od mRNA i nekodirajuće RNA, ali ne i SymR RNA (Kawano 2012), što nalikuje funkciji toksina tipa II, poput MazF, koji cijepa mRNA neovisno o ribosomu. Biološka uloga proteina SymE eksprimiranog s kromosoma nije u potpunosti jasna. U slučaju proteina SymE koji je induciran kao odgovor na oštećenje DNA ili druge čimbenike, sugerira se da bi svojstvo cijepanja RNA proteinom SymE moglo biti važno za recikliranje oštećene RNA (Kawano 2012). Nadalje, gen *symE* ima tendenciju povezivanja s mobilnim elementima, poput transpozona i patogenih otoka (Kobayashi i sur. 1999; Schmidt i Hensel 2004). Sinteza proteina SymE može se dogoditi u kasnoj fazi SOS odgovora, no prije lize stanice. Smatra se da je cijepanje RNA, od strane proteina SymE, važno za spašavanje ribosoma jer se RNA oštećena u SOS uvjetima reciklira (Kawano 2012). Također, SOS inducirani protein SymE može doprinijeti sprječavanju širenja infekcije fagima u slučaju da preferira mRNA faga kako bi inhibirao njegovu translaciju (Kawano 2012). Prema Kawano (2012) prekomjerna ekspresija gena *symE* utječe na rast stanica i sintezu proteina, odnosno smanjuje sposobnost stvaranja kolonija i sintezu proteina i dovodi do razgradnje mRNA. Delecijski mutant *symE* ($\Delta symE$) pokazuje povećanu osjetljivost na alkilirajuće sredstvo metil metansulfonat (MMS) (Rooney i sur. 2009).

Protein YjfN kodira za mali periplazmatski protein te je supstrat i aktivator proteaze DegP, periplazmatske serin proteaze neophodne za preživljavanje pri visokim temperaturama. DegP je visoko kondenzirana proteaza koja provodi reguliranu proteolizu s ciljem selektivnog uklanjanja pogrešno smotanih proteina u periplazmi *E. coli* (Sungjae i sur. 2018). Kako bi testirali utjecaj prekomjerne ekspresije proteina YjfN na funkciju DegP, Sungjae i sur. (2018) su umetnuli prazan plazmid ili plazmid s ekspresijom proteina YjfN u stanice koje sadrže divlji tip *degP* i stanice koje nemaju gen *degP*. Stanice koje proizvode divlji tip DegP i one koje ne proizvode DegP, a koje su bile izložene toplinskom šoku (43 °C), bile su vijabilne, bez obzira na prekomjernu ekspresiju YjfN. Također, delecija gena *yjfN* ($\Delta yjfN$) u stanicama nije promijenila prethodni rezultat. Budući da delecija gena *yjfN* nije značajno smanjila preživljenje stanica na visokoj temperaturi ili drugim

stresnim uvjetima, Sungjae i sur. (2018) tvrde da funkcija *yjfN* nije nužna, već dodatna za DegP proteolizu. Protein YgcU je FAD-dehidrogenaza nepoznate funkcije.

2. CILJ ISTRAŽIVANJA

Sekvenciranjem transkriptoma bakterije *E. coli* uzgojenih u različitim uvjetima rasta, i s aktivnim/neaktivnim proteinom H-NS – represorom sustava CRISPR-Cas, pronađeni su zanimljivi geni kandidati koji bi mogli utjecati na aktivnost sustava CRISPR-Cas. Stoga su ciljevi ovog istraživanja:

1. Klonirati gene *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU* i *yjfN* u ekspresijske vektore.
2. Konstruirati delecije mutante istih gena.
3. Istražiti kako suvišak ili nedostatak ovih gena utječe na zaštitnu ulogu sustavom CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli*.

3. MATERIJALI I METODE

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Bakterijski sojevi i plazmidi

U Tablici 1 prikazani su bakterijskih sojevi korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 1. Popis sojeva bakterije *E. coli* K-12 korištenih u eksperimentalnom radu.

Oznaka soja	Genotip	Izvor, referenca
BW25113	F^- , $\Delta(araD-araB)567$, $\Delta lacZ4787(::rrnB-3)$, λ^- , $rph-1$, $\Delta(rhaD-rhaB)568$, $hsdR514$	B. L. Wanner (Keio kolekcija sojeva bakterije <i>E. coli</i>)
Oznaka soja dobivenog od BW25113	Razlika u genotipu u odnosu na soj BW25113	Izvor, referenca ili metoda dobivanja soja
IIB1297	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::kan \Delta hns::cat$	Mitić i sur. 2020
IIB1043	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::FRT$	Majsec i sur. 2016
IIB1243	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::FRT His-cas3 \Delta hns::cat \Delta htpG::kan$	I. Ivančić Baće
IIB1374	+ $\Delta ibpB::kan$	Ovaj rad (recombineering)
IIB1377	+ $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)::FRT \Delta ibpB::kan$	Ovaj rad (P1. IIB1374 x IIB1165)
IIB1378	+ $\lambda T3 \lambda c \Delta cas1::FRT \Delta hns::cat \Delta ibpB::kan$	Ovaj rad (P1. IIB1374 x IIB1297)
MR2	+ $araB::T7RNAP-tetA \Delta(cas1-casC) \Delta cas3::apra$	M. Radovčić
MR58	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::FRT \Delta hns::cat \Delta cspE::kan$	Ovaj rad (P1. MR53 x IIB1297)
MR59	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::FRT \Delta oppA::kan$	P1.MR51 x IIB1043
MR62	+ $\lambda T3$ + $\lambda c \Delta cas1::FRT \Delta oppA750::kan \Delta hns::cat$	P1. IIB1023 x MR59

U Tablici 2 prikazani su plazmidi korišteni u ovom istraživanju.

Tablica 2. Popis plazmida korištenih u eksperimentalnom radu.

Plazmid	Genotip	Izvor
pBad-HisA	Prazan vektor	Invitrogen
pKD46	<i>repA101(ts) oriR101 bla P_{araB}-(gam bet exo)</i>	Datsenko i Wanner 2000
pMR20	<i>oppA</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pMR21	<i>ibpB</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pMR22	<i>jyfN</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pMR23	<i>symE</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pMR24	<i>ygcU</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pMR25	<i>cspE</i> u pBad-HisA	ovaj rad
pDCF-1b	Prazan vektor	
pEB628	Uklonirani geni <i>cas1</i> i <i>cas2</i> u pBad-HisA	E. L. Bolt
pTK43	R u pBad-HisA	T. Killelea

3.1.2. Početnice za PCR

U Tablici 3 prikazane su korištene početnice, njihove sekvence i svrha.

Tablica 3. Popis početnica za lančanu reakciju polimerazom (PCR). Kod početnica za stvaranje delecije gena podebljanim slovima označen je dio početnice koji se veže na pKD13 (FRT-*kan*-FRT).

Oznaka početnice	Sekvenca	Svrha
pBad-F	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'	Sekvenciranje
pBad-R	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'	Sekvenciranje
cspE-F	5'-TGTACTCGAGATGTCTAAGATTAAAGGTAACG-3'	Kloniranje
cspE-R	5'-TGCTAAGCTTTTACAGAGCGATTACGTTTG-3'	Kloniranje
ibpB-F	5'-TGTAGGTACCATATGCGTAACTTCGATTTATCC-3'	Kloniranje
ipbB-R	5'-TAAGCTGAATTCTTAGCTATTTAACGCGGGA-3'	Kloniranje
oppA-F	5'-TGTAGGTACCATATGACCAACATCACCAAGAG-3'	Kloniranje
oppA-R	5'-TGCTTAGAATTCCCATTAGTGCTTCACAATGT-3'	Kloniranje

Tablica 3. - nastavak

symE-F	5'-TG TAGGT ACCATATGACTGACACGCATTCTAT-3'	Kloniranje
symE-R	5'-TGCAACGAATTCTTACGCGACTTTCTGTTTACC-3'	Kloniranje
ygcU-F	5'-TG TAGGT ACCATATGTCTTTATCTCGCGCAG-3'	Kloniranje
ygcU-R	5'-GCTTAGAATTCCCTGACACATTATTTTCAATCG-3'	Kloniranje
yjfN-F	5'-TG TACTCGAGATGAAACAATTACTTGCCTCAC-3'	Kloniranje
yjfN-R	5'-TGCTAAGCTTTCATGCATACAGTATCGCC-3'	Kloniranje
cspE-F	5'-TAACCGACACAGCATTTGTGTCTATTTTTCATGTAA AGGTAATTTTGATG ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
cspE-R	5'-AGCGGGTTTTGAATTCTTGCTGACGTATCTTACAG AGCGATTACGTTTGCT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena
ibpB-F	5'-CTTCGGATTTGCAGGTACTTACTCGCTTCTTAGAAG GAGAAATGACTATG ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
ibpB-R	5'-CAGAATGGCGGGGCAAAGAGAATAGCTAGTTAGCT ATTTAACGCGGGACGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena
oppA-F	5'-ACATGCTGGTTAATACCAGTAATTATAATGAGGGAG TCCAAAAACAATG ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
oppA-R	5'-GCAGGACACTCCTGCCCCACGTATTGCCATTAGTGC TTCACAATGTACATT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena
symE-F	5'-TCCCGGTGGTTAACCGGGAGTAAACGCTGTTACGCG ACTTTCTGTTTACC ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
symE-R	5'-CCCCATATTTACTGATGATATATACAGGTATTTAGC GCGGTGCGGATGTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena
ygcU-F	5'-CCCGTCATCGCGGAACGCTGCCTGACACATTATTTT CAATCGGATAGAT ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
ygcU-R	5'-ATCATCATCGCAACGAAGGTGCATTGTGCTATATCA CTGAAGTAACAGTGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena
yjfN-F	5'-CGGCATTGTTCAATTTGCTGTAGATGACACTCATGCAT ACAGTATCGCCTG ATTCCGGGGATCCGTCGACC -3'	Stvaranje delecije gena
yjfN-R	5'-GATGGAATGCCCTGCAACATGTGGGGAAACGAAAA ATGGAGCTGACGATGT GTAGGCTGGAGCTGCTTCG -3'	Stvaranje delecije gena

Tablica 3. - nastavak

kt-R	5'-CGGCCACAGTCGATGAATCC-3'	Provjera kanamicinske kazete
CRISPR- Sp4	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR
CRISPR- R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR

3.1.3. Hranidbeni mediji

U Tablicama 4, 5 i 6 prikazani su sastavi različitih medija za uzgoj bakterijskih stanica.

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

Sastojak	Koncentracija/(g L ⁻¹)
BD Bacto Tryptone	10
BD Bacto Yeast Extract	5
NaCl	10

Sastojci se otope u 1L deionizirane vode, pH-vrijednost podesi se na 7, a dobivena smjesa se autoklavira. Za pripremu čvrstog LB-medija sastavu tekućeg LB-medija doda se 15 g L⁻¹ BD Bacto Agara, a za pripremu mekog LB-medija sastavu tekućeg LB-medija doda se 6 g L⁻¹ BD Bacto Agara.

Tablica 5. Dodaci dodani u tekući LB-medij prema potrebi.

Dodatak	Koncentracija/(μg mL ⁻¹)
Ampicilin	100
Kanamycin	40
Streptomycin	50

Tablica 6. Sastav tekućeg SOB-medija korištenog za pripremu elektrokompetentnih stanica.

Sastojak	Koncentracija/(g L ⁻¹)
Ekstrakt kvasca	5
Trypton	20
NaCl	0,58
KCl	0,19
MgCl ₂	0,95
MgSO ₄	1,20

3.1.4. Puferi

U Tablicama 7, 8 i 9 prikazani su sastavi pufera koje sam koristila u ovom radu (TAE, M/15, MC).

Tablica 7. Sastav pufera TAE korištenog za agaroznu gel elektroforezu.

Otopina	Koncentracija/(g L ⁻¹)
Tris (Roth)	4,85
99,5 % octena kiselina	1,20
0,5 M EDTA (pH = 8,0)	0,29

Tablica 8. Sastav fosfatnog pufera M/15 korištenog za resuspendiranje bakterija.

Otopina	Koncentracija/(g L ⁻¹)
Na ₂ HPO ₄ · 12 H ₂ O (Kemika)	5,94
KH ₂ PO ₄ (Kemika)	4,54

Soli se otope u 1L deionizirane vode, a pH-vrijednost pufera podesi se na 7,0. Dobivena otopina se autoklavira.

Tablica 9. Sastav pufera MC korištenog za transdukciju.

Otopina	Koncentracija/(g L ⁻¹)
MgSO ₄	12,0
CaCl ₂	0,55

3.2. METODE

3.2.1. Konstrukcija plazmida

3.2.1.1. Kloniranje gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU* i *yjfN*

Početni korak u kloniranju gena je umnožiti željeni fragment molekule DNA metodom lančane reakcije polimerazom (od engl. *polymerase chain reaction*, PCR) koristeći degenerirane početnice koje imaju uvedene sekvence određenih restrikcijskih enzima i termostabilnu DNA polimerazu. Kalup DNA za umnažanje gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU*, *yjfN* metodom PCR pripremila sam lizom 10 µL prekonoćne kulture stanica divljeg tipa u epruveti s 50 µL dH₂O, kuhanjem na 98 °C 3 minute i hlađenjem na 10-12 °C. Koristila sam DNA polimerazu koja ima lektorirajući aktivnost, Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (NEB). Reakcijske smjese za PCR pripremila sam prema uputama proizvođača pri čemu je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 12,5 µL (Tablica 10). U reakcijsku smjesu dodala sam 1,0 µL pripremljenog kalupa DNA. Početnice su dizajnirane prema uputama NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB), a njihove sekvence nalaze se u Tablici 3. Za reakciju PCR koristila sam uređaj Applied Biosystem 2720 Thermal Cycler, a program umnažanja DNA metodom PCR nalazi se u Tablici 11. Uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provjerila sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu.

Tablica 10. Sastav reakcijske smjese za umnažanje gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU*, *yjfN* metodom PCR pomoću Q5® Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix. Ukupni volumen reakcijske smjese je 12,5 µL.

Koncentracija i naziv otopine	Volumen/(µL)
Q5 High-Fidelity 2x MasterMix	6,25
10 µM F-početnica	0,625
10 µM R-početnica	0,625
Kalup DNA	1
dH ₂ O	4

Tablica 11. Opis programa korištenog za PCR kojim su umnoženi geni *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ycgU* i *yjfN*.

Naziv koraka	Temperatura/(°C)	Vrijeme/(s)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	5	30
Vezanje početnica	52	5	
Elongacija	72	55	
Završna elongacija	72	1	1
Hlađenje	4	∞	

3.2.1.2. Elektroforeza u agaroznom gelu

Gel sam pripremila u 1 % TAE-puferu kojeg sam koristila i kao pufer za elektroforezu. U jažice sam nanijela 2 µL GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) markera za provjeru veličine fragmenta i po 4 µL pojedinog PCR uzorka. Elektroforezu sam radila u Embi Tec sustavu za elektroforezu, pri naponu 100 V u trajanju od 15 minuta, odnosno dok žuta boja iz PCR reakcijske smjese ne bi prošla sredinu gela. Dobivene gelove snimala sam na transiluminatoru i analizirala programom Kodak 1D Image Analysis Software v.3.6.0.

3.2.1.3. Pročišćavanje DNA iz PCR reakcija i mjerenje koncentracije fragmenata DNA

Umnoženu DNA pročistila sam pomoću kompleta GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača. Uzorcima sam dodala pufer za vezanje u omjeru 1:1. Za DNA fragmente manje od 500 parova baza *cspE*, *ibpB*, *symE* i *yjfN*, dodala sam 100 % izopropanol u omjeru 1:2. Pripremljene smjese stavila sam u kolonu za pročišćavanje te sam ih centrifugirala 30 sekundi na 12000 g. DNA se vezala za membranu u koloni. Potom sam dodala 700 µL pufera za ispiranje te sam ponovo centrifugirala. Odlila sam supernatant, a praznu kolonu centrifugirala 1 minutu na 12000 g. Kolone za pročišćavanje prebacila sam u čiste epruvete te sam dodala 30 µL sterilne destilirane vode. Uzorke sam centrifugirala 1 minutu na 12000 g. Nakon centrifugiranja uzorci DNA su eluirani s membrane i otopljeni u sterilnoj destiliranoj vodi.

Koncentraciju fragmenata DNA izmjerila sam uređajem NanoVue (GE Healthcare). Uređaj mjeri apsorbanciju uzoraka pri odabranoj valnoj duljini svjetlosti i preračunava u koncentraciju, koja je proporcionalna apsorbanciji, uzimajući u obzir i faktor razrjeđenja uzorka. Za molekulu

DNA mjerenje se vrši pri valnoj duljini od 260 nm zato što pri toj valnoj duljini molekula DNA najbolje apsorbira svjetlost. Korišteni uređaj računa koncentraciju prema poznatoj činjenici da otopina čiste dvolančane molekule DNA koncentracije $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, pri valnoj duljini 260 nm i duljini puta svijetlosti od 1 cm, ima apsorbanciju 1. Kao referentni uzorak koristila sam sterilnu deioniziranu vodu (dH_2O), a za svako mjerenje nanosila sam $2 \mu\text{L}$ uzorka.

3.2.1.4. Rezanje DNA (produkata PCR i vektora pBad-HisA) restrikcijskim enzimima

Pročišćene produkte PCR za gene *cspE* i *yjfN* i vektor pBad-HisA pocijepala sam restrikcijskim enzimima *XhoI* i *HindIII* (Thermo Scientific). Reakcijske smjese pripremila sam prema uputama proizvođača (Tablica 12). U pojedinu reakcijsku smjesu dodala sam ili pročišćene PCR produkte ili vektor pBad-HisA ($12 \mu\text{L}$) i smjese inkubirala 1 sat i 15 minuta na 37°C . Uspješnost restrikcije provjerila sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.).

Tablica 12. Sastav smjese za dvostruku restrikciju restrikcijskim enzimima *XhoI* i *HindIII*.

Otopina	Volumen/ (μL)
Kalup DNA	12
Pufer (10x Buffer R)	2
<i>XhoI</i>	1
<i>HindIII</i>	1
H_2O	4

Pročišćene produkte PCR za gene *ibpB*, *oppA*, *symE* i *ygcU* i vektor pBad-HisA pocijepala sam restrikcijskim enzimima Fast Digest *KpnI* i *EcoRI* (Thermo Scientific). Reakcijske smjese pripremila sam prema uputama proizvođača (Tablica 13). U pojedinu reakcijsku smjesu dodala sam ili pročišćene PCR produkte ili vektor pBad-HisA ($12 \mu\text{L}$). Reakcijske smjese inkubirala sam 25 minuta na 37°C . Enzime sam inaktivirala temperaturom od 65°C kroz 20 minuta. Uspješnost restrikcije provjerila sam na alikvotima svake reakcijske smjese elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.).

Tablica 13. Sastav smjese za dvostruku restrikciju restriktivnim enzimima *KpnI* i *EcoRI*.

Otopina	Volumen/(μL)
Kalup DNA	12
Pufer (10x FastDigest)	2
<i>KpnI</i>	1
<i>EcoRI</i>	1
H ₂ O	4

Sve porezane produkte PCR i porezani vektor pBad-HisA sam pročistila te sam izmjerila koncentraciju porezanim PCR produktima (3.2.1.3.)

3.2.1.5. Ligacija fragmenata DNA u vektor pBad-HisA

Pročišćene porezane fragmente DNA i vektor pBad-HisA sam međusobno povezala pomoću T4 DNA ligaze (Thermo Scientific) koja katalizira stvaranje fosfodiesterne veze. Za svaki pojedini gen ligacijsku smjesu sam napravila prema uputama proizvođača u omjeru 1:3 za gene *ibpB*, *oppA*, *symE* i *ygcU*, a u omjeru 1:6 za gene *cspE* i *yjfN* u ukupnom volumenu od 20 μL (Tablica 14). Ligacija je trajala 20 minuta na sobnoj temperaturi, nakon čega sam inkubiranjem na 65 °C 10 minuta inaktivirala enzim T4 DNA ligazu. Dobivenu ligacijsku smjesu koristila sam za transformaciju *E. coli* NEB 5 α stanica.

Tablica 14. Molarni omjer plazmidnog vektora i inserta te masa plazmidnog vektora i inserta (ng) za ligacijsku smjesu pojedinog gena.

Plazmidni vektor	Insert	Molarni omjer vektora i inserta	Plazmidni vektor/(ng)	Koncentracija PCR produkta ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$)	Insert/(ng)
pBad-HisA	ibpB	1:3	20,0	7,9	6,28
	oppA			11,9	23,9
	symE			6,6	1,00
	ygcU			9,1	21,3
	yjfN	1:6	4,4	8,3	1,00
	cspE			7,6	1,00

3.2.1.6. Transformacija bakterija plazmidnom DNA

Za transformaciju ligacijskih smjesa u bakterije koristila sam već priređene komercijalne kemijski kompetentne stanice *E. coli* NEB 5 α . Stanicama u alikvotima od 50 μ L dodala sam po 2 μ L ligacijske smjese, i uzorke sam inkubirala 30 minuta na ledu. Potom sam uzorke podvrgnula toplinskom šoku stavljanjem epruveta u termoblok na 42 °C 1 minutu, a zatim na led 1 minutu. Transformiranim bakterijama dodala sam 650 μ L medija SOC te stanice oporavljala 1 sat na 37 °C. Potom sam cijelu smjesu zasadila na čvrste podloge LB s antibiotikom ampicilinom i inkubirala ih preko noći na 37 °C.

3.2.1.7. Provjera uspješnosti kloniranja

Uspješnost kloniranja pojedinog gena u vektor pBad-HisA provjerila sam metodom PCR na pojedinačnim bakterijskim kolonijama koje su narasle nakon transformacije. Kalup za PCR pripremila sam na način da sam pojedine bakterijske kolonije čačalicom prebacila u epruvetu s 50 μ L sterilne vode, i inkubirala 3 minute na 98 °C. Za umnažanje sam koristila DNA polimerazu PhireGreen i univerzalne početnice koje se vežu na *forward* i *reverse priming* mjesto na plazmidu pBad-HisA. Reakcijsku smjesu pripremila sam prema uputama proizvođača (Tablica 15). Koristila sam isti PCR program kao i za umnažanje pojedinog gena (Tablica 11). Uspješnost umnažanja provjerila sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.). Iz onih kolonija u kojima se umnožio insert u vektoru zasadila sam prekonoćne u 3 mL tekućeg LB-medija s dodatkom ampicilina, kako bih sutradan iz njih mogla izolirati plazmide (3.2.1.8.).

Tablica 15. Sastav reakcijske smjese za PCR s enzimom PhireGreen Master Mix.

Otopina	Volumen/(μ L)
2x PhireGreen Master Mix	10
F-početnica	1
R-početnica	1
Kalup DNA	1
H ₂ O	7

Uspješnost ugradnje pojedinog gena dodatno sam provjerila cijepanjem izoliranog plazmida restrikcijskim enzimom Fast Digest *Nco*I (Thermo Scientific). Reakcijsku smjesu u volumenu od 10 μ L pripremila sam prema uputama proizvođača i kako je ranije opisano (Tablica

13), ali sam dodala samo jedan restrikcijski enzim i plazmidnu DNA u koncentraciji 100 ng/ μ L. Inkubirala sam 15 minuta na 37 °C i rezultate restrikcije odmah sam provjerila elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.).

3.2.1.8. Izolacija plazmidne DNA

Plazmidnu DNA izolirala sam pomoću kompleta Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) prema uputama proizvođača. 1,5 mL prekonoćnih stanica istaložila sam 5 minuta na 10000 g. Supernatant sam odlila, a talog reuspendirala u 250 μ L pufera za resuspendiranje. Potom sam dodala 250 μ L pufera za lizu, a sadržaj epruvete promiješala okretanjem epruvete 4 puta i inkubirala 5 minuta. Potom sam dodala 10 μ L alkalne proteaze, ponovo promiješala okretanjem epruvete 4 puta i inkubirala 5 minuta. Zatim sam dodala 350 μ L pufera za neutralizaciju, a uzorke sam centrifugirala 10 minuta na 13000 g. Bistri lizat prebacila sam u kolone za pročišćavanje te sam ih centrifugirala 1 minutu na 13000 g. Supernatant sam odlila, dodala 750 μ L pufera za ispiranje te sam ponovo centrifugirala 1 minutu na 13000 g. Odlila sam supernatant i dodala 250 μ L pufera za ispiranje te centrifugirala 2 minute na 13000 g. Kolone za pročišćavanje prebacila sam u nove epruvete. Dodala sam 50 μ L sterilne destilirane vode, i centrifugiranjem od 1 minutu na 14000 g, eluirala DNA s kolone. Izoliranim plazmidima otopljenim u sterilnoj destiliranoj vodi izmjerila sam koncentraciju (3.2.1.3.) i pohranila na –20 °C.

3.2.1.9. Sekvenciranje

Konstruirane plazmide pMR20, pMR21, pMR22, pMR23, pMR24 i pMR25 poslala sam na sekvenciranje u servis MacroGen kako bi se utvrdila ispravnost kloniranja. Uzorke za sekvenciranje pripremila sam prema uputama na web stranici servisa MacroGen. Na sekvenciranje sam poslala 10 μ L svakog plazmida. Korištene su univerzalne početnice koje se vežu na forward i *reverse priming* mjesto na plazmidu pBad-HisA, a plazmidi su sekvencirani metodom po Sangeru. Rezultati sekvenciranja dobiveni su preko interneta u formatu prikladnom za analizu sekvence.

3.2.2. Priprema kemijski kompetentnih stanica i transformacija konstruiranim plazmidima

Bakterije narasle do logaritamske faze ($OD_{600} = 0,60$) razdijelila sam u epruvete od 1,5 mL i centrifugirala 2 minute i 30 sekundi na 9000 g. Nakon centrifugiranja odlila sam supernatant, a talog sam resuspendirala u 200 μ L hladne vodene otopine 50 mM kalcijeva klorida. Centrifugiranje

sam ponovila, supernatant odlila, a talog rասuspendirala u 50 μ L hladne vodene otopine kalcijeva klorida. Naime, kalcijev klorid veže se na bakterijsku ovojnicu čime destabilizira nabijenu membranu koja postaje polupropusna za plazmidnu DNA. Bakterije sam inkubirala na ledu otprilike 15 minuta. Zatim sad dodala 1 μ L plazmida te bakterije ponovno inkubirala na ledu otprilike 15 minuta. Nakon inkubacije na ledu, uzorke sam podvrgnula toplinskom šoku, odnosno uzorke sam stavila u termoblok zagrijan na 42 °C na 1 minutu, a potom na led na 1 minutu. Dodala sam 350 μ L tekućeg LB-medija, i uzorak sam inkubirala u tresilici na 37 °C 1 sat, kako bi se bakterije oporavile. Nakon sat vremena bakterije sam centrifugirala 2 minute na 10000 g, odlila sam supernatant, a talog resuspendirala u 400 μ L M/15 pufera. Pripremljeni uzorak zasadila sam na čvrste LB podloge s ampicilinom i inkubirala preko noći na 37 °C. Sljedeći dan sam jednu koloniju inokulirala u 3 ml tekućeg LB-medija s ampicilinom i priredila prekonoćne kulture uzgojem u inkubatoru preko noći uz aeraciju.

3.2.3. Konstrukcija delecijskog mutanta

Delecijske mutante, odnosno zamjene bakterijskog gena s genom otpornosti na antibiotik kanamicin, napravila sam metodom recombineering (Datsenko i Wanner 2000). Soj BW25113, u kojem želim napraviti mutacije, transformirala sam s plazmidom pKD46 na kojem se nalaze geni faga lambda za rekombinaciju koji trebaju napraviti zamjenu gena. Plazmid pKD46 nosi gen za otpornost na ampicilin i ima temperaturno-osjetljivo izvoriste replikacije, pa sam transformante selektirala na krutoj LB podlozi s ampicilinom na 30 °C. Sutradan sam od transformanata BW25113 + pKD46 napravila prekonoćnu kulturu u LB-mediju uz dodatak amplicilina na 30 °C.

3.2.3.1. Priprema linearne DNA

Napravila sam PCR s početnicama koje se svojim 3'-krajem vežu kazetu za otpornost na kanamicin, a čiji su 5'-krajevi stršeći i homologni regijama kromosoma oko gena kojeg želim deletirati, odnosno zamijeniti kazetom za otpornost na kanamicin. Kao kalup za umnažanje kanamicinske kazete koristila sam DNA iz soja IIB1297, umjesto plazmida pKD13, koja u kromosomu već ima kazetu za otpornost na kanamicin. Stanice sam kuhala na 98 °C 3 minute (3.1.1.1.). Reakcijske smjese za PCR pripremila sam prema uputama proizvođača pri čemu je ukupni volumen reakcijske smjese iznosio 25 μ L (dvostruki volumen reakcijske smjese prikazane u Tablici 10). U reakcijsku smjesu dodala sam 2,0 μ L pripremljenog kalupa DNA. Koristila sam

isti PCR program kao i za umnažanje pojedinog gena (Tablica 11, pri čemu je vrijeme elongacije bilo 28 s). Uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provjerila sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.). Dobiveni PCR produkt pročistila pomoću kompleta GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača (3.2.1.3.).

3.2.3.2. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija linearnom DNA

Elektrokompetentne stanice sam pripremila na način da sam prekonoćne kulture BW25113 + pKD46 razrijedila oko 50 puta u 20 mL SOB-medija uz dodatak L-arabinoze u finalnoj koncentraciji 0,2 % (v/v) da se inducira ekspresija rekombinacijskih gena (500 µL bakterijske kulture u 20 mL SOB-medija) i uzgojila na 30 °C do $OD_{600} \approx 0,5$. Optičku gustoću mjerila sam spektrofotometrom, a kao referentni uzorak koristila sam čisti tekući LB-medij. Kad su bakterije postigle željenu optičku gustoću, nakon otprilike 90 minuta, stavila sam ih na led kako bih zaustavila daljnji rast bakterija. Sve daljnje korake u pripremi elektrokompetentnih stanica sam, zbog očuvanja vijabilnosti, radila u hladnim uvjetima.

Stanice sam odcentrifugirala 6 minuta na 6000 rpm (okretaja u minuti) pri temperaturi 4 °C. Odlila sam supernatant, a talog sam resuspendirala u 15 mL hladnog sterilnog 10 % glicerola. Sadržaj sam ponovo centrifugirala 6 minuta na 6000 rpm pri temperaturi 4 °C, odlila supernatant, a talog resuspendirala u 7 mL 10 % glicerola, Postupak sam ponovila još jednom, a talog sam resuspendirala u 3 mL 10 % glicerola, pa potom u 1 mL i konačno u 100 µL.

Alikvotu (100 µL) elektrokompetentnih stanica sam dodala pročišćenu DNA od PCR produkta (100 ng), lagano promiješala i prebacila u kivetu za elektroporaciju koja je prethodno ohlađena držanjem na ledu. Kivetu sam kratko obrisala, kako se uzorak ne bi zagrijao, smjestila u nosač elektroporatora MicroPulser, Bio-Rad, te izložila udaru struje napona 1,8 kV. Budući da strujni udar stvara pore u membrani bakterijskih stanica, u kivetu sam odmah potom dodala 450 µL tekućeg LB-medija s dodatkom L-arabinoze (finalno 0,2 %). Uzorak sam prebacila u sterilnu 1,5 mL epruvetu i ostavila preko noći na 30 °C kako bi se bakterijske stanice oporavile.

Sljedeći dan stanice sam nasadila na čvrste selektivne LB podloge i inkubirala na 37 °C kako bi se uklonio plazmid pKD46. Dobivene kolonije pretraživala sam metodom PCR. Za umnažanje sam koristila DNA polimerazu PhireGreen i početnice koje umnažaju wt gen (to su zapravo početnice za kloniranje gena) i početnice koje se uzvodno vežu ispred gena a nizvodno se vežu usred kanamicinske kazete (kt-R). Reakcijsku smjesu pripremila sam prema uputama

proizvođača (Tablica 15). Koristila sam isti PCR program kao i za umnažanje pojedinog gena (Tablica 11, pri čemu je vrijeme elongacije bilo 25 s). Uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provjerila sam elektroforezom na 1 % agaroznom gelu (3.2.1.2.).

3.2.4. Određivanje formiranja čistina faga *λvir* pri različitim temperaturama inkubacije

Napravila sam decimalna razrjeđenja faga *λvir* (od 10^{-3} do 10^{-6}) u 10 mM vodenoj otopini magnezijeva sulfata, a alikvot faga (10 μ L) nakapala sam na pripremljene "bakterijske livade" koje sam pripremila miješanjem mekog agara i 200 μ L prekonoćnih bakterija transformiranih s konstruiranim plazmidima. Podloge sam preko noći inkubirala na 30 °C i 37 °C. Sljedeći dan prebrojila sam čistine faga *λvir* te sam izračunala PFU/mL (od engl. *plaque-forming unit*) za svaki soj i svaku temperaturu. PFU/mL izračunala sam tako da sam broj nastalih čistina pomnožila s faktorom decimalnog razrjeđenja i sa 100, jer sam na podloge stavila alikvot od 10 μ L, a PFU se izražava u mL.

3.2.5. Konstrukcija bakterijskih sojeva metodom transdukcije fagom P1*vir*

Najprije sam pripremila lizat faga P1*vir* na odgovarajućim donorskim bakterijskim sojevima. Uzgojila sam stanice u 10 mL tekućeg LB-medija u tresilici na 37 °C do rane logaritamske faze ($OD_{600} = 0,3$) i dodala 60 μ L 1 M vodene otopine kalcijeva klorida i 50 μ L faga P*vir*. Inficirane bakterije inkubirala sam u tresilici oko 3 sata na 37 °C ili sve dok stanice nisu lizirale. Liziranim bakterijama dodala sam 500 μ L kloroforma, a sadržaj sam miješala otprilike 5 minuta kako bi se bakterije dodatno lizirale. Dobiveni lizat sam centrifugirala 12 minuta na 13000 g pri temperaturi od 4 °C kako bi se uklonili bakterijski ostaci. Supernatant sam prebacila u sterilne staklene epruvete. Pripremljene lizate bakteriofaga P1*vir* za transdukciju pohranila sam u hladnjak na 4 °C.

Prekonoćne kulture recipijentnih bakterijskih sojeva centrifugirala sam 2 minute i 30 sekundi na 6500 g. Supernatant sam odlila, a talog sam resuspendirala u 200 μ L MC pufera (Tablica 9) koji pomaže adsorpciji bakteriofaga. Zatim sam bakterijama dodala 200 μ L bakteriofaga P1*vir* uzgojenog na donorskom soju. Dobiveni smjesu inkubirala sam 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, dodala sam 200 μ L 1 M vodene otopine natrijeva citrata koji veže kalcijeve katione, čime se zaustavlja infekcija bakteriofagom P1*vir*. Na selektivne LB podloge izlila sam 3 mL mekog

agara u koji sam prethodno dodala smjesu za transdukciju. Podloge sam inkubirana preko noći na 37 °C ili dok ne narastu transduktanti.

3.2.6. Određivanje efikasnosti naivne adaptacije (ugradnje novih razmaknica)

Za naivnu adaptaciju u bakteriji *E. coli* potrebni su geni *cas1* i *cas2* koji se u pokusima eksprimiraju s plazmida. Zato sam kemijskom transformacijom u bakterijski MR2 prvo dodala plazmid pSDC20 koji ima gene *cas1* i *cas2*, a potom ostale kontruirane plazmide. Kao negativnu kontrolu dodala sam prazni vektor pCDF1b. Transformante sam nasadila na selektivne LB podloge i inkubirala preko noći na 37 °C.

Naivnu adaptaciju sam pratila tijekom 2 uzastopna presađivanja - pasaže. Pojedinačne kolonije transformanata sam nasadila u 3 mL tekućeg LB-medija bez antibiotika, ali uz dodatak L-arabinoze i IPTG-a (finalno 1 mM) te inkubirala preko noći na 37 °C uz trešnju (300 rpm). Ova prekonoćna kultura predstavljala je prvu pasažu iz koje sam pripremila drugu pasažu razrjeđivanjem 300 puta, dodala L-arabinozu i IPTG i opet inkubirala preko noći u istim uvjetima. IPTG se morao dodati jer se na *T7lac* promotor za ekspresiju gena *cas1* i *cas2* veže *lac* represor koji se uklanja kada se u medij doda IPTG, a L-arabinozom se inducira ekspresija T7 RNA polimeraze koja je pod arabinoznim promotorom.

Ugradnju novih razmaknica provjerila sam metodom PCR koristeći par početnica CRISPR-Sp4/CRISPR-R kojima se umnaža dio lokusa CRISPR u kojeg se ugrađuju nove razmaknice. Za PCR sam koristila enzim PhireGreen, a radnu reakcijsku smjesu enzima, početnica i vode napravila sam po uputama prikazanim u Tablici 15. Od pripremljene radne reakcijske smjese pipetirala sam alikvote od 9 µL kojima sam dodala 1 µL kalupa koji sam priredila lizom 10 µl bakterijskih kultura (pasaža) u 50 µl sterilnoj destiliranoj vodi i kuhanjem na 98 °C kroz 3 minute (3.1.1.1.). Koristila sam PCR program prikazan u Tablici 16.

Tablica 16. PCR program za umnažanje CRISPR lokusa.

Naziv koraka	Temperatura/(°C)	Vrijeme/(s)	Broj ciklusa
Inicijalna denaturacija	98	30	1
Denaturacija	98	5	30
Vezanje početnica	53	5	
Elongacija	72	15	
Završna elongacija	72	1	1
Hlađenje	4	∞	

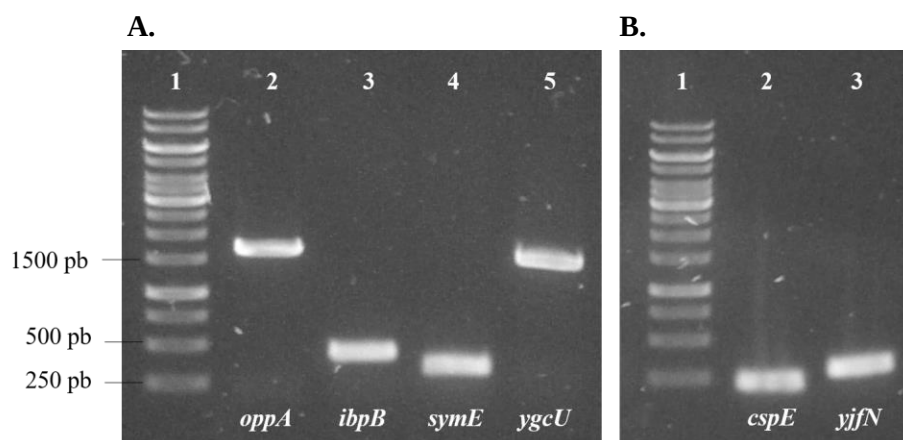
Uspješnost umnažanja DNA metodom PCR provjerila sam elektroforezom na 2 % agaroznom gelu (3.2.1.2.) obzirom da je razlika između fragmenata DNA mala. Nanosila sam 4 µL pojedinog PCR uzorka i elektroforezu sam radila u Embi Tec sustavu za elektroforezu pri naponu 50 V u trajanju od 50 minuta, odnosno dok žuta boja iz PCR reakcijske smjese ne bi došla do kraja gela.

4. REZULTATI

4.1. Kloniranje gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ycgU* i *yjfN*

Kako bih istražila utječu li geni *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ycgU* i *yjfN* na zaštitnu ulogu sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli*, pretpostavili smo da se moguća uloga može uočiti ili kad su navedeni geni u suvišku i aktiviraju sustav CRISPR-Cas ili da u njihovom odsustvu može doći do lošije ili bolje zaštitne uloge. Stoga sam najprije odlučila klonirati navedene gene i istražiti njihov utjecaj na aktivnost sustava CRISPR-Cas kad su prisutni u stanicama u suvišku. Metodom PCR pomoću DNA polimeraze koja ima lektorirajući aktivnost, Q5[®] Hot Start High-Fidelity (NEB), umnožila sam gene *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ycgU* i *yjfN*. Reakcijske smjese za PCR pripremila sam prema uputama proizvođača, a potrebne početnice, čije se sekvence nalaze u Tablici 3, dizajnirane su prema uputama NEBuilder HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB). Dobivene PCR produkte analizirala sam agaroznom gel elektroforezom.

Na Slici 7 prikazani su rezultati elektroforeze dobivenih PCR produkata. U jažici 1 na Slici 7 A i B nalazi se marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder pomoću kojeg sam provjerila odgovara li veličina PCR produkta veličini pojedinog gena. U ostalim jažicama se nalaze vrpce čija veličina odgovara očekivanoj veličini umnoženih gena *oppA* (1632 pb), *ibpB* (429 pb), *symE* (342 pb), *ycgU* (1455 pb) (Slika 7 A), *cspE* (210 pb) i *yjfN* (276 pb) (Slika 7 B).



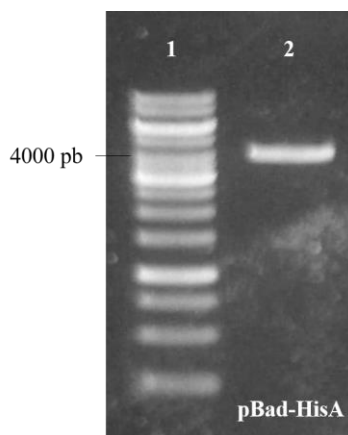
Slika 7. Prikaz produkata PCR reakcije s DNA polimerazom, Q5[®] Hot Start High-Fidelity (NEB), elektroforezom na 1 % agaroznom gelu. **A.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *oppA* (1632 pb), 3) *ibpB* (429 pb), 4) *symE* (342 pb), 5) *ycgU* (1455 pb). **B.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *cspE* (210 pb), 3) *yjfN* (276 pb).

Kako nije bilo nespecifičnih produkata umnažanja, DNA sam pročistila direktno iz PCR reakcija pomoću kompleta GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific) te sam izmjerila koncentraciju pročišćenih fragmenata DNA spektrofotometrom (Tablica 17).

Tablica 17. Koncentracije DNA nakon pročišćavanja PCR produkata.

PCR produkt	Koncentracija/(ng μL^{-1})
<i>cspE</i>	31,0
<i>ibpB</i>	38,5
<i>oppA</i>	41,0
<i>symE</i>	37,0
<i>ygcU</i>	30,5
<i>yjfN</i>	36,5

DNA iz PCR produkata za gene (*cspE* i *yjfN*) i vektor pBad-HisA pocijepala sam restrikcijskim enzimima *XhoI* i *HindIII* (Thermo Scientific), a DNA iz PCR zaprodukata za gene *ibpB*, *oppA*, *symE* i *ygcU* i vektor pBad-HisA restrikcijskim enzimima *KpnI* i *EcoRI* (Thermo Scientific). Reakcijske smjese napravila sam prema uputama proizvođača prema protokolu (Tablica 12 i Tablica 13). U pojedinu reakcijsku smjesu dodala sam ili DNA od PCR produkta ili vektor pBad-HisA, a uspješnost restrikcije provjerila sam elektroforezom. Na Slici 8 vidi se vrpca čija veličina oko 4000 pb odgovara veličini porezanog plazmida pBad-HisA.



Slika 8. Prikaz porezanog plazmida pBad-HisA (4102 pb) s restrikcijskim enzimima *XhoI/HindIII* elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Prva jažica sadrži marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder.

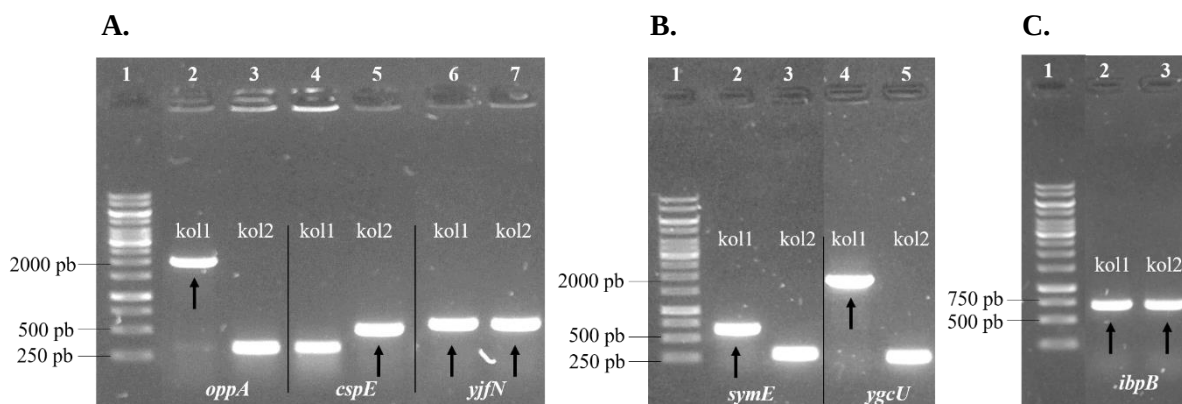
DNA nakon restrikcije sam pročistila pomoću kompleta GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific) te sam ponovo izmjerila koncentraciju pročišćenih fragmenata DNA. U Tablici 18 prikazane su koncentracije DNA porezanih i pročišćenih PCR produkata i vektora pBad-HisA.

Tablica 18. Koncentracije DNA porezanih i pročišćenih PCR produkata i vektora pBad-HisA.

PCR produkt	Koncentracija/(ng μL^{-1})
<i>cspE</i>	7,6
<i>ibpB</i>	7,9
<i>oppA</i>	11,9
<i>symE</i>	6,6
<i>ygcU</i>	9,1
<i>yjfN</i>	8,3
pBad-HisA	4,4

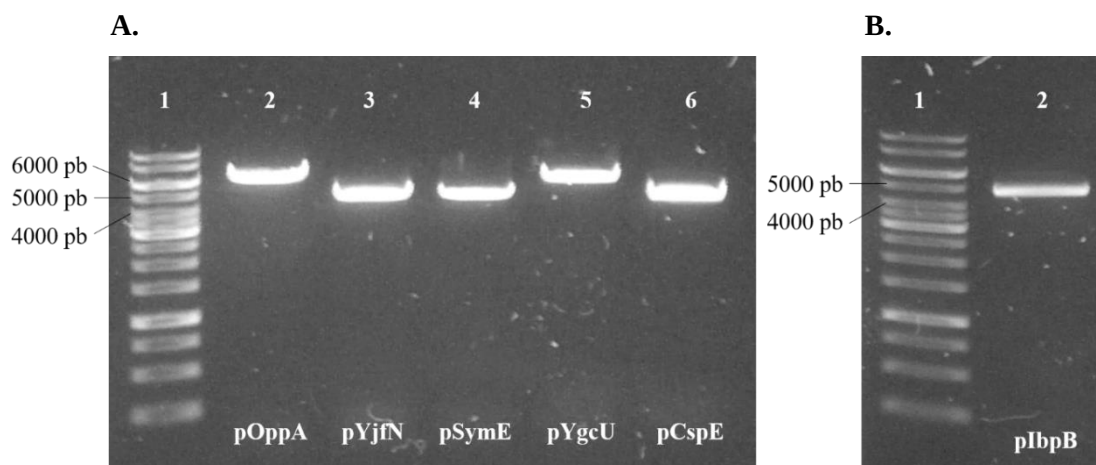
Nakon pročišćavanja, svaki fragment DNA za pojedini gen ligirala sam u vektor pBad-HisA pomoću T4 DNA ligaze (Thermo Scientific). Ligacijske smjese sam transformirala u komercijalne kemijski kompetentne stanice *E. coli* NEB 5 α te transformante selektirala na podlogama s ampicilinom. Uspješnost kloniranja pojedinog gena u vektor pBad-HisA provjerila sam metodom PCR na bakterijskim kolonijama (provjeravala sam 2 kolonije). Za PCR sam koristila PhireGreen Master Mix i univerzalne početnice koje se vežu na *forward* i *reverse priming* mjesto na plazmidu pBad-HisA. Navedenim početnicama provjerila sam da su u MCS (od engl. *multiple cloning site*) vektora pBad-HisA uklonirani željeni geni. Reakcijsku smjesu pripremila sam prema uputama proizvođača (Tablica 13).

Analizom PCR produkata elektroforezom na 1 % agaroznom gelu dobila sam vrpce koje veličinom odgovaraju za inserte *oppA* (1944 pb) kolonija 1, *cspE* (494 pb) kolonija 2 i *yjfN* (560 pb) obje kolonije (Slika 9 A), *symE* (651 pb) kolonija 1, *ygcU* (1773 pb) kolonija 1 (Slika 9 B) i *ibpB* (738 pb) obje kolonije (Slika 9 C).



Slika 9. Provjera kloniranja gena u vektor pBad-HisA metodom PCR na bakterijskim kolonijama. Korištene su univerzalne početnice koje se vežu na *forward* i *reverse priming* mjesto na plazmidu pBad-HisA, a kojima se provjerava postojanje ukloniranih gena u MCS (od engl. *multiple cloning site*). **A.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *oppA* (1944 pb), kolonija 1, 3) *oppA*, kolonija 2, 4) *cspE*, kolonija 1, 5) *cspE* (494 pb), kolonija 2, 6) *yjfN* (560 pb), kolonija 1, 7) *yjfN* (560 pb). **B.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *symE* (651 pb), kolonija 1, 3) *symE*, kolonija 2, 4) *ygcU* (1773 pb), kolonija 1, 5) *ygcU*, kolonija 2. **C.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *ibpB* (738 pb), kolonija 1, 3) *ibpB* (738 pb), kolonija 2. Strelicama su označene kolonije koje sadrže očekivani insert.

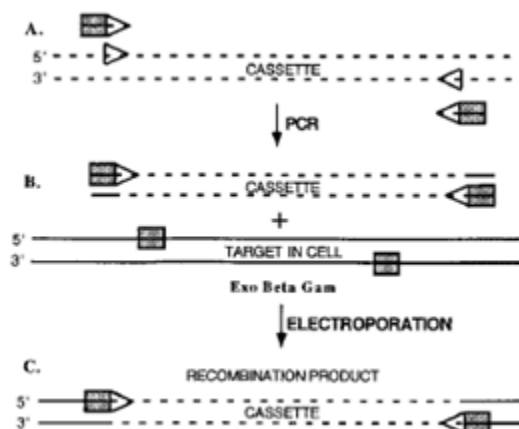
Od kolonija s ispravnim insertom napravila sam prekonoćne kulture i iz njih izolirala plazmide. Uspješnost ugradnje pojedinog gena dodatno sam provjerila cijepanjem izoliranih plazmida restriksijskim enzimom *NcoI*. Reakcijsku smjesu pripremila sam prema uputama proizvođača (Tablica 13) i rezultate restrikcije provjerila sam elektroforezom na 1% agaroznom gelu koji su potvrdili ispravnost svih konstrukata. Dobivene vrpce veličinom odgovaraju veličini plazmida s kloniranim genom, pOppA (5700 pb), pIbpB (4500 pb), pYjfN (4400 pb), pSymE (4400 pb), pCspE (4300 pb) i pYgcU (5600 pb) (Slika 10 A i B). Uspješnost ugradnje pojedinog gena u vektor pBad-HisA dodatno se potvrdila sekvenciranjem, čiji rezultati nisu prikazani. Sekvenciranjem je potvrđeno da su svi geni uspješno klonirani u plazmid te da imaju ispravnu sekvencu.



Slika 10. Provjera kloniranja gena u plazmid pBad-HisA restriksijskom analizom. Pročišćeni plazmidi su porezani restriksijskim enzimom *NcoI* FastDigest (Thermo Scientific). **A.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) pMR20 (*oppA* u pBad-HisA, 5733 pb), 3) pMR22 (*yjfn* u pBad-HisA, 4349 pb), 4) pMR23 (*symE* u pBad-HisA, 4440 pb), 5) pMR24 (*ycgU* u pBad-HisA, 5562 pb), 6) pMR25 (*cspE* u pBad-HisA, 4283 pb), **B.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) pMR21 (*ibpB* u pBad-HisA, 4527 pb).

4.2. Konstrukcija mutanata s kromosomskom delecijom gena

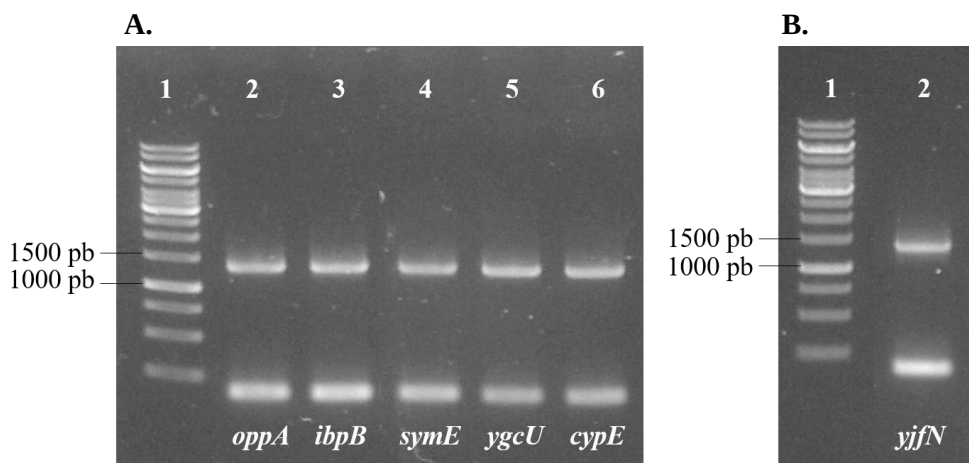
Delecijske mutante konstruirala sam metodom recombeneering (Datsenko i Wanner 2000).



Slika 11. Strategija delecije gena i zamjena s genom za otpornost na antibiotik. Preuzeto iz: Datsenko i Wanner 2000.

Za to sam trebala prirediti linearnu DNA koja se sastoji od gena koji kodira za otpornost na kanamicin – kanamicinsku kazetu i koja je omeđena mjestima homologije s ciljnom DNA s kojom treba doći do homologne rekombinacije s kromosomskom DNA (Slika 11). Za to sam koristila posebne duge početnice koje se s 3'-krajem vežu na kanamicinsku kazetu (trokutić), a na 5'-kraju imaju dodanu ciljnu sekvencu dugu oko 50 pb (Tablica 3). Također, trebala sam stanice, u koje se treba unijeti mutacija, transformirati s plazmidom pKD46. Taj plazmid nosi gene za rekombinaciju faga lambda koji trebaju rekombinirati linearnu DNA u kromosom (3.2.1.6.). Kako je ugradnja linearne DNA neefikasna, za unos DNA u stanice koristi se metoda elektroporacije. Umnožena linearna DNA treba biti duga oko 1400 pb, a kao kalup sam koristila lizirane bakterije i DNA polimerazu Q5[®] Hot Start High-Fidelity 2X Master Mix (NEB). Uspješnost umnažanja kanamicinske kazete provjerila sam agaroznom gel elektroforezom.

Na Slici 12 su prikazani produkti PCR reakcije s umnoženom kanamicinskom kazetom. Dobivene vrpce veličinom odgovaraju veličini kanamicinske kazete otprilike 1400 pb (Slika 12 A i B). Osim DNA očekivane veličine, mogu se uočiti i manji nespecifični produkti od oko 200-300 pb. Duge produkte reakcije PCR, sam pročistila kompletom GeneJET PCR Purification (Thermo Scientific) prema uputama proizvođača i odredila koncentraciju DNA za svaki gen/kazetu.

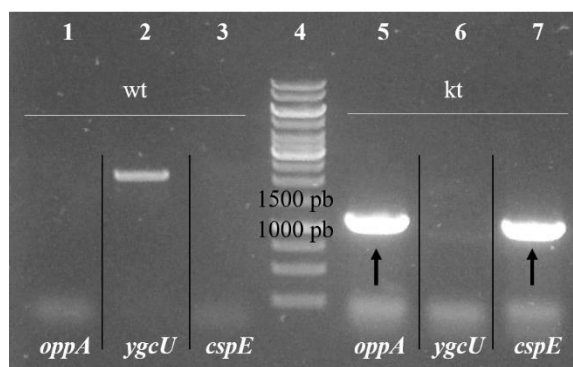


Slika 12. Produkti PCR reakcije s umnoženom kanamicinskom kazetom. Korištene su posebne duge početnice koje se s 3' krajem vežu na kanamicinsku kazetu, a na 5' kraju imaju dodanu ciljnu sekvencu dugu oko 50 kb. **A.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *oppA*, 3) *ibpB*, 4) *symE*, 5) *ygcU*, 6) *cspE*, **B.** Jažice: 1) marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder, 2) *yjfN*.

Čistu DNA sam elektroporirala u elektrokompetentne stanice i stanice nasadila na selektivne podloge kako je opisano u 3.2.3.1.. Stanice sam uzgajala preko noći na 37 °C da se spriječi replikacija plazmida pKD46. Idući dan naraslo je oko 20-tak kolonija otpornih na kanamicin za svaki gen.

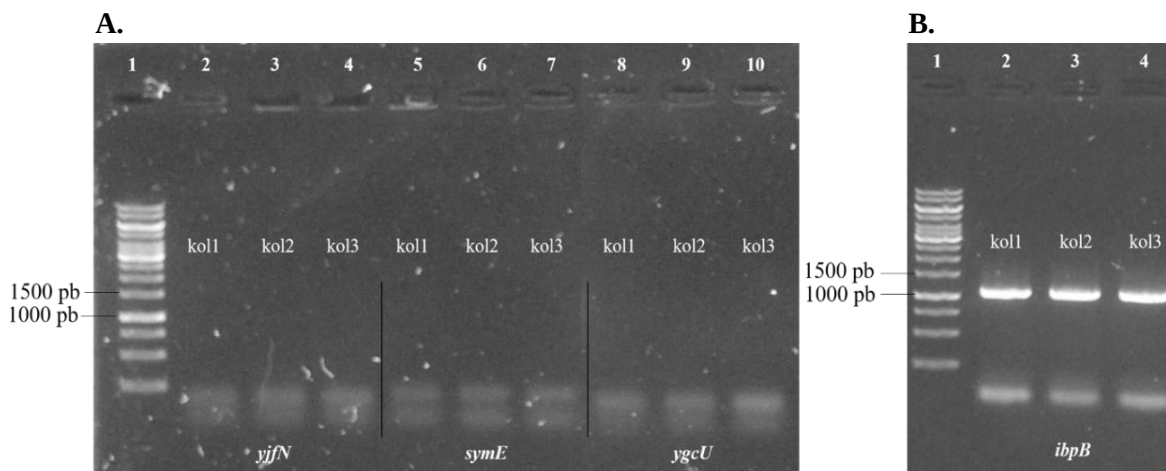
Uspješnost konstrukcije delecijских mutanata provjerila sam metodom PCR i elektroforezom na 1% agaroznom gelu. Koristila sam početnice koje umnažaju *wt* gen (to su zapravo početnice za kloniranje gena) i početnice koje se uzvodno vežu ispred gena, a nizvodno se vežu usred kanamicinske kazete (kt-R). Ukoliko su mutanti s kromosomskom delecijom gena uspješno konstruirani, početnice koje umnažaju *wt* gen ne smiju dati produkt, a početnice koje umnažaju kanamicinsku kazetu moraju dati produkt, odnosno vrpce veličine oko 1200 pb.

Vrpca u jažici broj 2 dobivena je korištenjem početnica *ygcU*-F/*ygcU*-R koje umnažaju sekvence oko gena *ygcU* ukazuje da se gen nije deletirao (Slika 13). To je dodatno potvrđeno jer vrpce u jažici broj 6 nema jer gen *ygcU* nije izrezan, a nema kanamicinske kazete. Gen *oppA* (veličine 1632 pb) izrezan je te je na njegovo mjesto ugrađena kanamicinska kazeta koja bakterijskom soju daje kanamicinsku otpornost. Stoga vrpca u jažici 1 veličine 1632 pb koja odgovara veličini gena *oppA* nije dobivena, već je u jažici 5 dobivena vrpca veličine 1200 pb (Slika 13). Gen *cspE* (veličine 210 pb) je deltiran te je na njegovo mjesto ugrađena kanamicinska kazeta koja bakterijskom soju daje kanamicinsku otpornost. Stoga vrpca u jažici 3 veličine 210 pb koja odgovara veličini gena *cspE* nije dobivena, već je u jažici 7 dobivena vrpca veličine 1200 pb (Slika 13).



Slika 13. Provjera uspješnosti konstrukcije mutanata s kromosomskom delecijom gena metodom PCR na bakterijskim kolonijama. U jažicama 1, 2 i 3 korištena je početnica koja umnaža *wt* gen, a u jažicama 5, 6 i 7 početnica koja umnaža kanamicinsku kazetu (kt-R). Jažice: 1) *oppA*, 2) *ygcU*, 3) *cspE*, 4) marker. GenerRuler 1 kb DNA ladder, 5) *oppA*, 6) *ygcU*, 7) *cspE*. Strelicama su označene kolonije koje sadrže ispravan konstrukt.

Na isti način su pretraživani ostali mutanti. PCR produkti dobiveni korištenjem početnice yjfN-F/symE-F/ibpB-F/ygcU-F koja se veže ispred navedenih gena i početnice kt-R u jažicama 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 i 10 nisu dali produkt to znači da se kanamicinska kazeta nije ugradila (Slika 14 A). U jažicama 2, 3 i 4 dobivena je vrpca veličine 1200 pb koja odgovara veličini kanamicinske kazete na mjesto izrezanog gena *ibpB* (Slika 14 B). Dakle, agaroznom gel elektroforezom potvrđeno je da su uspješno konstruirani mutanti s kromosomskom delecijom gena *oppA*, *cspE* (Slika 13) i *ibpB* (Slika 14 B). Za ove mutante nije napravljen PCR s početnicama za wt gena.



Slika 14. Provjera uspješnosti konstrukcije mutanata s kromosomskom delecijom gena metodom PCR na bakterijskim kolonijama. Korištene su početnice koje umnažaju kanamicinsku kazetu (kt-R). **A.** Jažice: 1) marker GenerRuler 1 kb DNA ladder, 2, 3, 4) *yjfN*, 5, 6, 7) *symE*, 8, 9, 10) *ygcU*. **B.** Jažice: 1) marker GenerRuler 1 kb DNA ladder, 2, 3, 4) *ibpB*.

4.3. Utjecaj prekomjerne ekspresije istraživanih gena na efikasnost formiranja čistina faga λ vir

Utjecaj kloniranih gena na aktivnost sustava CRISPR-Cas provjerila sam otpornošću bakterija na infekciju fagom lambda. Pripremila sam decimalna razrjeđenja (10^{-3} do 10^{-6}) faga lambda, i alikvote od 10 μ L nanijela sam na "bakterijske livade" soja λ T3 + λ c Δ *casI* Δ *hns* (IIB1297) transformiranog s konstruiranim plazmidima. Soj IIB1297 ima dvije anti-lambda razmaknice i deletiran gen *hns* što znači da je sustav CRISPR-Cas aktivan i može specifično napasti fag lambda. Podloge sam preko noći inkubirala na 30 °C i 37 °C jer je poznato da aktivnost sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* ovisi o temperaturi (Majsec i sur. 2016). Sljedeći dan prebrojila sam čistine faga lambda te sam izračunala PFU/mL (od engl. plaque-forming unit) za svaki soj i svaku temperaturu.

Fag λ vir nije formirao čistine na 30 °C niti s praznim vektorom niti bilo kojim konstruiranim plazmidom (Tablica 19). Blagi efekt uočen je nakon prekomjerne ekspresije gena *yjfN* i *symE* na 37 °C gdje je fag λ vir imao oko 10 puta manji PFU u odnosu na transformante s praznim vektorom (Tablica 19). Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA* i *ygcU* nije imala značajan utjecaj na efikasnost formiranja čistina faga λ vir na 37 °C.

Tablica 19. Efikasnost formiranja čistina faga λ vir nakon infekcije bakterijskog soja (IIB1297) s ektopičnom ekspresijom gena s plazmida. Nakon infekcije fagom λ vir bakterijski sojevi inkubirani su preko noći na 30 °C i 37 °C. PFU/mL faga λ vir za pojedini bakterijski soj i pojedinu temperaturu izračunat je iz broja formiranih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
IIB1297+pBad	-	-	1,12 x 10 ⁹	3,04 x 10 ⁸
IIB1297+pOppA	-	-	7,51 x 10 ⁸	3,01 x 10 ⁷
IIB1297+pIbpB	-	-	1,59 x 10 ⁹	1,59 x 10 ⁹
IIB1297+pYjfN	-	-	2,31 x 10 ⁸	7,25 x 10 ⁷
IIB1297+pSymE	-	-	4,49 x 10 ⁸	1,68 x 10 ⁸
IIB1297+pYgcU	-	-	1,08 x 10 ⁹	2,19 x 10 ⁸
IIB1297+pCspE	-	-	7,93 x 10 ⁸	2,02 x 10 ⁸
Temperatura	30 °C		37 °C	

Efikasnost formiranja čistina faga λ vir odredila sam u soju λ T3 + λ c Δ cas1 (IIB1043) u kojem je sustav CRISPR-Cas inaktivan jer je aktivan represor H-NS. Stoga unatoč anti-lambda razmaknici ne može doći do zaštite protiv infekcije fagom. Ovaj put fag λ vir je na obje temperature formirao je bistre, vidljive čistine sa sličnom efikasnošću (Tablica 20). Za razliku od velikih čistina formiranih na 37 °C, čistine formirane na 30 °C bile su manje, a kod bakterijskih stanica s prekomjernom ekspresijom *cspE* i na 37 °C uočene su nešto manje čistine od ostalih. Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *yjfN* i *ygcU* nije utjecala na efikasnost infekcije fagom λ na 30 °C, kao ni na 37 °C u odnosu na prazni vektor.

Tablica 20. Efikasnost formiranja čistina faga λ vir nakon infekcije bakterijskog soja (IIB1043) s ektopičnom ekspresijom gena s plazmida. Nakon infekcije fagom λ vir bakterijski sojevi inkubirani su preko noći na 30 °C i 37 °C. PFU/mL faga λ vir za pojedini bakterijski soj i pojedinu temperaturu izračunat je iz broja formiranih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
IIB1043+pBad	1,42 x 10 ⁹	6,75 x 10 ⁸	4,01 x 10 ⁹	1,89 x 10 ⁹
IIB1043+pOppA	1,75 x 10 ⁹	8,17 x 10 ⁸	3,83 x 10 ⁹	2,01 x 10 ⁹
IIB1043+pIbpB	1,92 x 10 ⁹	6,72 x 10 ⁷	3,70 x 10 ⁹	6,36 x 10 ⁸
IIB1043+pYjfN	1,57 x 10 ⁹	6,66 x 10 ⁸	5,16 x 10 ⁹	3,03 x 10 ⁹
IIB1043+pSymE	1,36 x 10 ⁹	1,05 x 10 ⁹	4,90 x 10 ⁹	2,40 x 10 ⁹
IIB1043+pYgcU	1,25 x 10 ⁹	4,42 x 10 ⁸	4,11 x 10 ⁹	1,97 x 10 ⁹
IIB1043+pCspE	1,54 x 10 ⁹	8,87 x 10 ⁸	5,09 x 10 ⁹	4,61 x 10 ⁹
Temperatura	30 °C		37 °C	

Efikasnost formiranja čistina faga λ vir odredila sam i u soju λ T3 + λ c $\Delta casI$ Δhns $\Delta htpG$ (IIB1243) u kojem je sustav CRISPR-Cas aktivan jer je deletiran represor H-NS, ali nedostaje šaperon HtpG koji pomaže u stabilnosti proteina Cas3 (Majsec i sur. 2016). Stoga unatoč anti-lambda razmaknicama i mutaciji H-NS ne očekuje se da će doći do zaštite protiv infekcije fagom na obje temperature. Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA* i *ygcU* nije utjecala na efikasnost infekcije fagom λ vir na 30 °C u odnosu na prazan vektor (Tablica 21), dok prekomjernom ekspresijom gena *symE* i *yjfN* na 30 °C nije došlo do formiranja čistina u odnosu na prazan vektor. Dakle, prekomjerna ekspresija gena *symE* i *yjfN* ima pozitivan učinak u mutantu Δhns $\Delta htpG$ (IIB1243) na 30 °C. S druge strane, prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *yjfN* i *ygcU* nije utjecala na efikasnost infekcije faga λ vir na 37 °C u odnosu na prazan vektor, osim *yjfN* gdje su se formirane čistine jedva nazirale.

Tablica 21. Efikasnost formiranja čistina faga λ vir nakon infekcije bakterijskog soja (IIB1243) s ektopičnom ekspresijom gena s plazmida. Nakon infekcije fagom λ vir bakterijski sojevi inkubirani su preko noći na 30 °C i 37 °C. PFU/mL faga λ vir za pojedini bakterijski soj i pojedinu temperaturu izračunat je iz broja formiranih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	Standardna devijacija	PFU/mL	Standardna devijacija
IIB1243+pBad	$3,63 \times 10^8$	$8,66 \times 10^7$	$2,47 \times 10^9$	$9,95 \times 10^8$
IIB1243+pOppA	$3,19 \times 10^8$	$7,99 \times 10^7$	$2,41 \times 10^9$	$8,76 \times 10^8$
IIB1243+pIbpB	$1,96 \times 10^8$	$9,84 \times 10^7$	$2,99 \times 10^9$	$2,32 \times 10^8$
IIB1243+pYjfN	-	-	$8,12 \times 10^7$	$1,31 \times 10^8$
IIB1243+pSymE	-	-	$2,20 \times 10^9$	$1,03 \times 10^9$
IIB1243+pYgcU	$6,38 \times 10^8$	$8,37 \times 10^8$	$3,16 \times 10^9$	$1,38 \times 10^9$
IIB1243+pCspE	$1,96 \times 10^8$	$8,25 \times 10^7$	$2,79 \times 10^9$	$6,00 \times 10^8$
Temperatura	30 °C		37 °C	

4.4. Utjecaj delecije pojedinog gena na aktivnost sustava CRISPR-Cas

Osim istraživanja utjecaja na infekciju fagom λ vir kad su geni u suvišku, istražila sam kakvu ulogu ima delecija pojedinog gena (*cspE/ibpB/oppA*) u soju λ T3 + λ c Δ casI Δ hns (IIB1297). Delecije gena sam transdukcijom pomoću faga P1 vir prebacila u soj IIB1297 i konstruirala sojeve MR58, MR62 i IIB1378. Nakon infekcije konstruiranih sojeva Δ cspE, Δ ibpB, Δ oppA, fag λ vir nije formirao čistine na 30 °C (Tablica 22), dok je efikasnost infekcije na 37 °C slična u sva tri soja. Stoga se može zaključiti da delecija pojedinog gena (*cspE/ibpB/oppA*) u mutantu Δ casI Δ hns (IIB1297) nema nikakav učinak na efikasnost formiranja čistina faga λ vir.

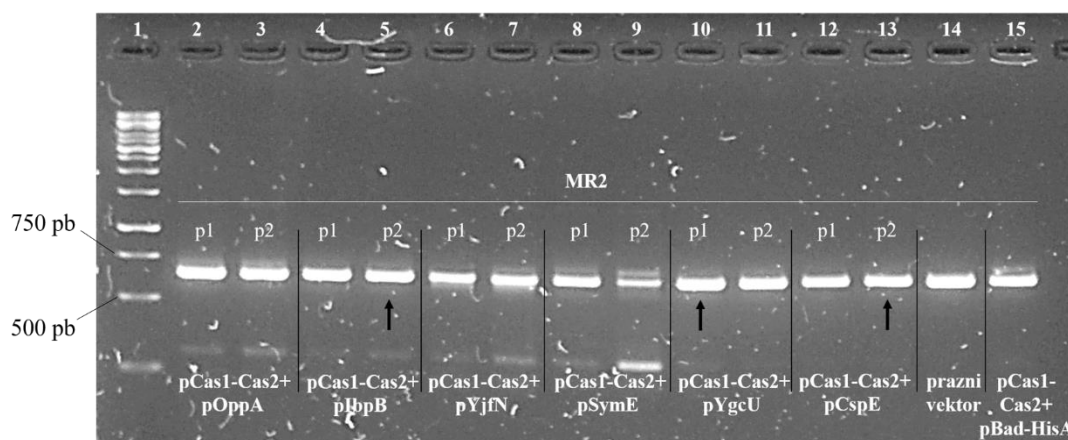
Tablica 22. Efikasnost formiranja čistina faga λ vir nakon infekcije bakterijskog soja (MR58, MR62 i IIB1378) s ektopičnom ekspresijom gena s plazmida. Nakon infekcije fagom λ vir bakterijski sojevi inkubirani su preko noći na 30 °C i 37 °C. PFU/mL faga λ vir za pojedini bakterijski soj i pojedinu temperaturu izračunat je iz broja formiranih čistina.

Bakterijski soj	PFU/mL	PFU/mL
MR58 (λ T3 + λ c Δ cas1 Δ hns Δ cspE)	0	1,10 x 10 ⁹
MR62 (λ T3 + λ c Δ cas1 Δ hns Δ oppA)	0	4,43 x 10 ⁹
IIB1378 (λ T3 + λ c Δ cas1 Δ hns Δ ibpB)	0	3,15 x 10 ⁹
Temperatura	30 °C	37 °C

4.5. Utjecaj istraživanih gena na naivnu adaptaciju

Za istraživanje procesa naivne adaptacije koristila sam bakterijski soj MR2 koji ima deletirane gene *cas* (genotip Δ cas3::apra Δ (casC-cas1)), i dodanu T7 RNA polimerazu pod arabinoznim promotorom (Tablica 1). Delecijom navedenih gena *cas* onemogućena je faza interferencije koja bi mogla ometati naivnu adaptaciju, a potrebni su samo geni *cas1* i *cas2*. Soj MR2 najprije sam transformirala plazmidom pSDC20 koji omogućava ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2 u suvišku, a potom konstruiranim plazmidima ili odgovarajućom negativnom kontrolom, praznim vektorom pBad-HisA. Također, soj MR2 transformirala sam s još jednom negativnom kontrolom, plazmidom pCDF1b, praznim vektorom za pSDC20. T7 RNA polimeraza je potrebna za ekspresiju gena *cas1-cas2* na plazmidu pSDC20 koji su u vektoru pod promotorom *T7lac*. Obzirom da je gen za T7 RNA polimerazu u kromosomu soja MR2 pod arabinoznim promotorom, dodavala sam L-arabinozu u medij kako bi se potaknula ekspresija polimeraze T7. Međutim, dodavala sam i IPTG jer se na promotor *T7lac* veže represor Lac koji se uklanja dodatkom IPTG-a. Transformirane bakterije s dva plazmida sam potom uzgajala uz dodane induktore kroz dva uzastopna uzgoja (pasaže). Metodom PCR provjerila sam je li došlo do ugradnje novih razmaknica. Lizirane prekonoćne stanice koristila sam kao kalup DNA te sam koristila, početnice koje okružuju mjesto ugradnje. Dobivene PCR produkte analizirala sam elektroforezom na 2 % agaroznom gelu (Slika 15). Očekivana veličina vrpce koja odgovara lokusu CRISPR je ~ 700 nukleotida, a vrpca koja odgovara lokusu CRISPR s ugrađenom novom razmaknicom i dodatnim ponavljajućim slijedom je veća za 61 nukleotid.

Slika 15 prikazuje rezultat reakcije PCR u stanicama bakterijskih sojeva MR2 nakon dvije pasaže. U jažicama 2 i 3 (MR2 + pCas1-Cas2 + pOppA), 6 i 7 (MR2 + pCas1-Cas2 + pYjfN), 8 i 9 (MR2 + pCas1-Cas2 + pSymE) uz donju, početnu vrpca od 662 pb, koja odgovara lokusu CRISPR, vidljiva je dodatna gornja vrpca (duljine veće za oko 60 pb) manjeg intenziteta koja predstavlja novougrađenu razmaknicu. U jažicama 4 i 5 (MR2 + pCas1-Cas2 + pIbpB), 10 i 11 (MR2 + pCas1-Cas2 + pYgcU) slabije se uočava druga vrpca dok je u 12 i 13 (MR2 + pCas1-Cas2 + pCspE) vidljiva samo jedna vrpca u obje pasaže što ukazuje da nije došlo do ugradnje razmaknice usprkos prekomjernoj ekspresiji proteina Cas1 i Cas2 s plazmida. U prisustvu CspE došlo je do najvećeg smanjenja adaptacije, dok je uz SymE adaptacija nešto efikasnija u odnosu na kontrolu. U jažici 14 nalazi se soj MR2 transformiran najprije plazmidom pCDF1b, a potom plazmidom pBad-HisA, koji služi kao negativna kontrola. Kod navedenog soja nije došlo do ugradnje razmaknice zato što nema pojačane ekspresije gena *cas1-cas2*. U jažici 15 nalazi se soj MR2 transformiran plazmidom pSDC20 i plazmidom pBad-HisA, koji služi kao pozitivna kontrola (Slika 15). Obzirom da plazmid pSDC20 ima gene *cas1* i *cas2*, njihova ekspresija je moguća i može doći do ugradnje razmaknice. Dobiveni rezultati potvrđuju da prekomjerna ekspresija pojedinog proteina (CspE, IbpB i YgcU) ima slab utjecaj na naivnu ugradnju razmaknice u lokus CRISPR.



Slika 15. Agarozna gel elektroforeza na 2 % gelu za vizualizaciju produkata dvije pasaže naivne adaptacije soja MR2 (wt) transformiranog plazmidom pSDC20 za ekspresiju proteinskog kompleksa Cas1-Cas2, i plazmidima pOppA (jažice 2 i 3), pIbpB (jažice 4 i 5), pYjfN (jažice 6 i 7), pSymE (jažice 8 i 9), pYgcU (jažice 10 i 11) i pCspE (jažice 12 i 13). Plazmid pCDF1b, prazan vektor, je negativna kontrola (jažica 14), a plazmid pBad-HisA pozitivna kontrola (jažica 15). U jažici 1 nalazi se marker, GeneRuler 1 kb DNA Ladder. Strelice pokazuju na smanjenu efikasnost ugradnje razmaknica u lokus CRISPR.

5. RASPRAVA

Kako bi se osigurala obrana bakterije *E. coli* od stranih virusnih nukelinskih kiselina pomoću sustava CRISPR-Cas, potrebno ga je aktivirati, odnosno poništiti represiju gena *cas* uzrokovanu proteinom H-NS ili delecijom gena *hns* ili ekspresijom aktivatora LeuO. U oba slučaja stanice će postati otporne na infekciju fagom λ vir, ukoliko je još u lokus CRISPR ugrađena razmaknica anti-lambda komplementarna dijelu genoma faga λ vir. Međutim, imunost/otpornost se ispoljava samo na 30 °C (Majsec i sur. 2016; Markulin i sur. 2020; Mitić i sur. 2020). Ova otpornost indirektno ovisi o šaperonu HtpG, pa u nedostatku gena *hns* i *htpG*, stanice postaju osjetljive na infekciju fagom λ vir i na 30 °C (Majsec i sur. 2016; Yosef i sur. 2011). Slično će se dogoditi ako se u soju Δ *hns* poveća ekspresija proteina StpA s plazmida, paraloga proteina H-NS, koji se ponaša kao dodatni represor promotora operona *cas* (Mitić i sur. 2020). Navedeni rezultati upućuju da osim gena *cas* i poznatih regulatora H-NS, LeuO, StpA i HtpG na aktivnost sustava CRISPR-Cas možda mogu utjecati i neki drugi geni regulatori direktno ili indirektno.

U slučaju novog nepoznatog aktivatora, može se očekivati da će se u stanicama divljeg tipa s anti-lambda razmaknicom aktivirati sustav CRISPR-Cas, ako je produkt gena aktivatora prisutan u suvišku. To će se manifestirati kao izostanak plakova, čistina nakon infekcije fagom λ vir. U slučaju represora, može se očekivati smanjena aktivnost sustava CRISPR-Cas u soju Δ *hns*, i u slučaju zaštitne uloge u stabilnosti proteina Cas može se očekivati poboljšanje aktivnosti sustava CRISPR-Cas na 30 °C u soju Δ *hns* Δ *htpG*. U ovom diplomskom radu prvo sam istražila te mogućnosti – utjecaj kloniranih gena, odnosno njihove prekomjerne ekspresije na efikasnost formiranja čistina faga λ vir u različitim sojevima bakterije *E. coli*. Svih šest gena sam uspješno klonirala u ekspresijski vektor što sam provjerila metodom PCR na pojedinačnim kolonijama i restrikcijom pročišćenih plazmida (Slika 9 i Slika 10). Sekveniciranje je potvrdilo da su konstruirani plazmidi ispravni (rezultati nisu prikazani). Obzirom da je prethodnim istraživanjima uočeno da aktivnost sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* ovisi o temperaturi (Majsec i sur. 2016), podloge inficirane fagima sam inkubirala preko noći inkubirala na 30 °C i 37 °C.

Prvo sam koristila soj IIB1297 s dvije anti-lambda razmaknice i deletiranim genom *hns* (genotip λ T3 + λ c Δ *casI* Δ *hns*) što znači da je sustav CRISPR-Cas aktivan i može specifično napasti fag λ vir. Soj IIB1297 transformirala sam konstruiranim plazmidima i praznim vektorom kao negativna kontrola. Na 30 °C fag λ vir nije formirao čistine, ni s praznim vektorom ni bilo kojim konstruiranim plazmidom što je u skladu s prethodnim rezultatima (Majsec i sur. 2016). S druge

strane, blagi efekt uočen je nakon prekomjerne ekspresije gena *yjfN* i *symE* na 37 °C (Tablica 19). Dakle, prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA* i *ygcU* nije imala značajan utjecaj na efikasnost formiranja čistina faga λ vir na 30 °C i 37 °C. To ukazuje da njihova povećana ekspresija ne inhibira aktivnost sustava CRISPR-Cas i da nisu potencijalni represori.

Nadalje, efikasnost formiranja čistina faga λ vir odredila sam u soju divljeg tipa λ T3 + λ c Δ cas1 (IIB1043) u kojem je sustav CRISPR-Cas neaktivan jer je aktivan represor H-NS. Zato unatoč anti-lambda razmaknici ne može doći do adekvatne zaštite bakterija protiv infekcije fagom λ vir i fag λ vir formira bistre čistine sa sličnom efikasnošću na obje temperature. Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *yjfN* i *ygcU* nije utjecala na efikasnost infekcije fagom λ vir u soju λ T3 + λ c Δ cas1 na 30 °C, kao ni na 37 °C (Tablica 20). Dakle, može se zaključiti da prekomjerna ekspresija kloniranih gena ne može aktivirati sustav CRISPR-Cas, odnosno da istraživani geni nisu potencijalni aktivatori.

Konačno, efikasnost formiranja čistina faga λ vir odredila sam i u soju λ T3 + λ c Δ cas1 Δ hns Δ htpG (IIB1243) u kojem je sustav CRISPR-Cas aktivan jer je deletiran represor H-NS, ali nedostaje šaperon HtpG koji pomaže u stabilnosti proteina Cas3 (Majsec i sur. 2016). Stoga, unatoč mutaciji H-NS i anti-lambda razmaknicama ne očekuje se da će doći do zaštite protiv infekcije fagom λ vir na obje temperature. Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA* i *ygcU* nije utjecala na efikasnost infekcije fagom λ vir na 30 °C, ali prekomjernom ekspresijom gena *symE* i *yjfN* na 30 °C nije došlo do formiranja čistina u odnosu na prazan vektor (Tablica 21). Dakle, prekomjerna ekspresija gena *symE* i *yjfN* povratila je aktivnost sustava CRISPR-Cas u mutantu Δ hns Δ htpG (IIB1243). Mogući razlog pozitivnog učinka gena *symE* u mutantu Δ hns Δ htpG (IIB1243) jest taj što je SymE SOS inducirani protein koji preferira mRNA faga λ vir kako bi inhibirao njegovu translaciju te na taj način sprječava širenje infekcije (Kawano 2012). S druge strane, YjfN kao aktivator proteaze DegP, možda utječe na stabilnost proteina faga λ vir čime indirektno poboljšava aktivnost sustava CRISPR-Cas. Prekomjerna ekspresija gena *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *yjfN* i *ygcU* očekivano nije utjecala na efikasnost infekcije faga λ vir na 37 °C, u odnosu na prazan vektor, osim *yjfN* gdje su se formirane čistine jedva nazirale.

Osim utjecaja prekomjerne ekspresije istraživanih gena na efikasnost formiranja čistina faga λ vir, istražila sam i utjecaj delecija pojedinog gena (*cspE/ibpB/oppA*) u soju λ T3 + λ c Δ cas1 Δ hns (IIB1297). U slučaju da su ovi geni važni, njihovom delecijom očekuje se gubitak aktivnosti sustava CRISPR-Cas. Nakon infekcije konstruiranih sojeva Δ cspE, Δ ibpB, Δ oppA, fag λ vir nije

formirao čistine na 30 °C, dok je efikasnost infekcije na 37 °C bila slična u sva tri soja (Tablica 22). Dakle, delecija pojedinog gena (*cspE/ibpB/oppA*) u mutantu $\Delta casI \Delta hns$ (IIB1297) nema nikakav učinak na efikasnost formiranja čistina faga λvir i istraživani geni nisu potrebni za aktivnost sustava CRISPR-Cas.

Na žalost, od 6 istraživanih gena uspjela sam deletirati samo njih tri (Slika 13 i Slika 14). Elektroporacija je bila uspješna jer sam selektirala stanice otporne na kanamicin, ali ugradnja kanamicinske kazete nije bila na očekivanom mjestu u genomu u tri soja. Nakon PCR umnažanja, uz očekivane produkte od oko 1400 pb (Slika 12) u svim uzorcima se pojavljivao i mali nespecifični produkt. To ukazuje na moguće probleme u specifičnosti početnica ili samu reakciju umnažanja. Moguće je da je nespecifični produkt PCR reakcije utjecao na samu efikasnost elektroporacije i time efikasnost rekombinacije linearne DNA. Zbog vremena koje sam mogla odvojiti na izradu ovog rada, nisam stigla ponoviti konstrukciju deletanata.

Za uspješnu zaštitu bakterije *E. coli* sustavom CRISPR-Cas protiv strane, virusne DNA, potrebno je napraviti fragmente strane DNA koji će se u obliku razmaknice ugraditi u lokus CRISPR. Za bakteriju *E. coli* i organizme koji imaju sustav CRISPR-Cas tip I karakteristična su dva oblika ugradnje: naivna i pripremljena (Yosef i sur. 2012). Naivnu adaptaciju karakterizira ugradnja razmaknice u lokus CRISPR s kojom se stanica domaćina prethodno nije susrela. Za naivnu adaptaciju, koja je istraživana u ovom diplomskom radu, potrebni su samo proteini Cas1 i Cas2 koji tvore adaptacijski kompleks Cas1-Cas2 koji najprije veže protorazmaknicu, a potom je ugrađuje u lokus CRISPR. Nadalje, smatra se da je u nastajanju fragmenata molekule DNA za naivnu ugradnju važan enzim RecBCD, koji ima ulogu i u razlikovanju vlastite DNA od strane (Levy i sur. 2015).

U ovom sam diplomskom radu istraživala utječu li geni *cspE*, *ibpB*, *oppA*, *symE*, *ygcU* i *yjfN* na naivnu adaptaciju. Za istraživanje procesa naivne ugradnje koristila sam bakterijski soj MR2 koji ima deletirane gene *cas* (genotip $\Delta cas3::apra \Delta(casC-cas1)$), i dodanu T7 RNA polimerazu pod arabinoznim promotorom. Delecijom gena *cas1*, *cas3* i *casC* onemogućena je faza interferencije koja bi mogla ometati naivnu adaptaciju za koju su potrebni samo geni *cas1* i *cas2*. Plazmid pSDC20 ima gene *cas1* i *cas2*, stoga je njihova ekspresija moguća i može doći do ugradnje razmaknice. Transformacijom soja MR2 plazmidom pSDC20, a potom konstruiranim plazmidima ili odgovarajućom negativnom kontrolom, pokazala sam da na naivnu ugradnju prekomjerna ekspresija proteina CspE, IbpB i YgcU ima slab utjecaj (Slika 15) i gdje najveći utjecaj ima protein

CspE. CspE utječe na transkripciju, stabilnost RNA i uključen je hladni šok (Bae i sur. 2000). Trenutno nije jasno na koji bi način utjecao na proces naivne adaptacije budući da je za adaptaciju potrebno cijepanje i procesiranje DNA u male fragmente. Ovaj rezultat ukazuje na moguću indirektnu ulogu ovog proteina i potrebno je to detaljnije proučiti. Efekti IbpB i YgcU su blagi i vjerojatno nisu značajni.

Od svih istraživanih proteina, jedino protein OppA nije pokazao nikakv učinak. Iako je OppA sličan šaperonima to nije dovoljan razlog da bi imao ulogu u aktivnosti sustava CRISPR-Cas. Istraživani geni su odabrani na temelju njihove pojačane ekspresije u mutantu *hns* u odnosu na stanice divljeg tipa, a ne po njihovoj funkciji, što objašnjava zašto neki nisu pokazali učinak. Za gene *symE* i *yjfN* bilo bi dobro ponoviti pokus te istražiti dolazi li do promjene u ekspresiji nekog od gena *cas* metodom RT-PCR ili proteina metodom Western blot. Na taj način bi se dobio bolji uvid u mogućí mehanizam njihovog djelovanja.

6. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata istraživanja utjecaja različitih gena na zaštitnu ulogu sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* K-12 može se zaključiti sljedeće:

- Istraživane gene *oppA*, *ibpB*, *symE*, *ycgU*, *cspE* i *yjfN* uspješno sam klonirala u ekspresijski vektor pBad-HisA što sam potvrdila na tri različita načina (PCR, restrikcija plazmida i sekvenciranje).
- Uspješno sam konstruirala tri delecijaska mutanta koja sam potvrdila metodom PCR.
- Niti jedan od istraživanih gena nije aktivator niti represor sustava CRISPR-Cas.
- Geni *symE* i *yjfN* povratili su aktivnost sustava CRISPR-Cas na 30 °C u mutantu bez gena *hns* i *htpG* što upućuje na indirektnu, za sad nepoznatu, ulogu.
- Gen *cspE* pokazao je negativan utjecaj na adaptaciju, dok su efekti gena *ibpB* i *ycgU* blagi i vjerojatno nisu značajni.
- Od svih istraživanih gena samo gen *oppA* nije pokazao učinak na aktivnost sustava CRISPR-Cas.

7. LITERATURA

- Amitai, G., Sorek, R. (2016): CRISPR-Cas adaptation: Insights into the mechanism of action. *Nat. Rev. Microbiol.* 14: 67-76.
- Bae, W., S. Phadtare, K. Severinov, and M. Inouye. (1999): Characterization of *E. coli cspE*, whose product negatively regulates transcription of *cspA*, the gene for the major cold shock protein. *Mol. Microbiol.* 31: 1429-1441.
- Bae, W., Xia, B., Inouye, M., Severinov, K. (2000): *E. coli* CspA-family RNA chaperones are transcription antiterminators. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97: 7784-7789.
- Brouns, S.J.J., Jore, M. M., Lundgren, M., Westra, E. R., Slikhuis R. J. H., Snijders A. P. L., 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.
- Charpentier, E., Richter, H., van der Oost, J., White, M. F. (2015): Biogenesis pathways of RNA guides in archaeal and bacterial CRISPR-Cas adaptive immunity. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 428-441.
- Datsenko, K.A., Wanner, B.L. (2000): One-step inactivation of chromosomal genes in *E. coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 6640-6645.
- Datsenko, K. A., Pougach, K., Tikhonov, A., Wanner, B. L., Severinov, K., Semenova, K. (2012): Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system. *Nat. Commun.* 3: 945.
- EcoCyc: Encyclopedia of *E.coli* Genes and Metabolism. <<https://ecocyc.org/>>
- E. coli* Genetic Resources at Yale. CGSC, The Coli Genetic Stock Center. <<https://cgsc.biology.yale.edu/>>
- Fang F. C., Rimsky S. (2008): New insights into transcriptional regulation by H-NS. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 113-120.
- Gong, B., Shin, M., Sun, J., Jung C. H., Bolt, E. L., van der Oost, J., Kim, J. S. (2014): Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111: 16359-16364.

- Hanna, M. M., Liu, K. (1998): Nascent RNA in transcription complexes interact with CspE, a small protein in *E. coli* implicated in chromatin condensation. *J. Mol. Biol.* 282: 227-239.
- Hayes, R. P., Xiao, Y., Ding, F., van Erp, P. B. G., 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.
- Huo, Y., Nam, K. H., Ding, F., Lee, H. Wu. L., Xia, Y., Farchione, F. D., Zhou, S., Rajashankar, R., 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.
- Jackson, S. A., McKenzie, R. E., Fagerlund, R. D., Kieper, S. N., Fineran, P. C., Brouns, S. J. J. (2017): CRISPR-Cas: Adapting to change. *Science* 356: eaal5056.
- Jore, M.M., Lundgren, M., van Duijn, E., Bultema, J.B., Westra, E.R., Waghmare, S.P., Wiedenheft, B., Pul, Ü., Wurm, R., Wagner, R., Beijer, M.R., Barendregt, A., Zhou, K., Snijders, A.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.
- Kawano, M. (2012): RNA Biology Divergently overlapping cis-encoded antisense RNA regulating toxin-antitoxin systems from *E. coli* *hok/sok*, *ldr/rdl*, *symE/symR*. *RNA Biology* 9: 1520-1527.
- Kawano, M., Aravind, L., Storz, G. (2007): An antisense RNA controls synthesis of an SOS-induced toxin evolved from an antitoxin. *Molecular Microbiology* 64: 738-754.
- Kieper, S. N., Almendros, C., Behler, J., McKenzie, R. E., Nobrega, F. L., Haagsma, A. C., Vink, J. N. A., Hess, W. R., Brouns, S. J. J. (2018): Cas4 Facilitates PAM-Compatible Spacer Selection during CRISPR Adaptation. *Cell Rep.* 22: 3377-3384.
- Kitagawa, M., Matsumura, Y., Tsuchido, T. (2000): Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *E. coli*. *FEMS Microbiol Lett.* 18: 165-171

- Klepsch, M. M., Kovermann, M., Löw, C., Balbach, J., Permentier, H. P., Fusetti, F., de Gier, J. W., Slotboom, D. J., Berntsson R. P.-A. (2011): *E. coli* peptide binding protein OppA has a perfect for positively charged peptides. *J Mol Biol.* 414: 75-85.
- Kobayashi, I., Nobusato, A., Kobayashi-Takahashi, N., Uchiyama, I. (1999): Shaping the genome--restriction-modification systems as mobile genetic elements. *Curr Opin Genet Dev* 9: 649-656.
- Koonin, E. V., Makarova, K. S. (2019): Origins and evolution of CRISPR-Cas systems. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374: 20180087.
- Krisko, A., Copic, T., Gabaldón, T., Lehner, B., Supek, F. (2014): Inferring gene function from evolutionary change in signatures of translation efficiency. *Genome Biol.* 15: R44.
- Lee, J., Hiibel, S. R., Reardon, K. F., Wood, T. K. (2010): Identification of stress-related proteins in *E. coli* using the pollutant cis-dichloroethylene. *J Appl Microbiol.* 108: 2088-2102.
- Levy, A., Goren, M. G., Yosef, I., Auster, O., Manor, M., Amitai, G., Edgar, R., Qimron, U., Sorek, R. (2015): CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA. *Nature* 520: 505-510.
- Majsec K., Bolt E. L., Ivančić-Baće I. (2016): Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *E. coli* cells lacking H-NS. *BMC Microbiol.* 16: 28.
- Mangoli, S., Sanzgiri, V. R., Mahajan, S. K. (2001): A common regulator of cold and radiation response in *E. coli*. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 20: 23-6.
- Markulin, D., Mitić, D., Radovčić, M., Ivančić Baće, I. (2020): CRISPR-Cas in *E. coli*: regulation by H-NS, LeuO and temperature. *Periodicum Biologorum.* 3-4: 155-160
- Marraffini, L.A., Sontheimer, E.J. (2008): CRISPR interference limits horizontal gene transfer in *Staphylococci* by targeting DNA. *Science* 322: 1843-1845.
- Mitić, D., Radovčić, M., Markulin, D., Ivančić Baće, I. (2020): StpA represses CRISPR-Cas immunity in H-NS deficient *E. coli*. *Biochimie* 174: 136-143.
- Mojica, F. J. M., Díez-Villaseñor, C. (2010): The on-off switch of CRISPR immunity against phages in *E. coli*. *Molecular Microbiology* 77: 1341-1345.

- 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* 155: 733-740.
- Mojica, F.J.M., Díez-Villaseñor, 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
- Nuñez, J. K., Bai, L., Harrington, L. B., Hinder, T. L., Doudna, J. A. (2016): CRISPR Immunological Memory Requires a Host Factor for Specificity. *Mol. Cell* 62: 824-833.
- Nuñez, J. K., Harrington, L. B., Kranzusch, P. J., Engelman, A. N., Doudna, J. A. (2015): Foreign DNA capture during CRISPR-Cas adaptive immunity. *Nature* 527: 535-538.
- 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 *E. coli*. *Mol. Microbiol.* 77: 1367-1379.
- Pul Ü., Wurm R., Arslan Z., Geißen R., Hofmann N., Wagner R. (2010): Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS. *Mol. Microbiol.* 75: 1495-1512.
- Radovčić, M. (2021): Uloga enzima RecBCD i drugih nukleaza u CRISPR-Cas naivnoj adaptaciji u bakteriji *E. coli*. Doktorska disertacija. Biološki odsjek. Prirodoslovno-matematički fakultet Sveučilišta u Zagrebu
- Richarme, G., Caldas, T. D. (1997): Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J Biol Chem.* 272: 15607-15612.
- Rollie, C., Graham, S., Rouillon, C., White, M. F. (2018): Prespacer processing and specific integration in a Type I-A CRISPR system. *Nucleic Acids Res.* 46: 1007-1020.
- 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.

- Rooney, J. P., George, A. d., Patil, A., Begley, U., Bessette, E., Zappala, M. R., Huang, X., Concklin, D. S., Cunningham, R. P., Befley, T. J. (2009): Systems based mapping demonstrates that recovery from alkylation damage requires DNA repair, RNA processing, and translation associated networks. *Genomics* 91: 42-51.
- Sand, O., Gingras, M., Beck, N., Hall, C., Trun, N. (2003): Phenotypic characterization of overexpression or deletion of the *E. coli crcA*, *cspE* and *crcB* genes. *Microbiology* 149: 2107-2117.
- Schmidt, H., Hensel, M. (2004): Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol Rev.* 17: 14-56.
- Sungjae, K., Song, I. Eom, G., Seokhee, K. (2018): A Small Periplasmic Protein with a Hydrophobic C-Terminal Residue Enhances DegP Proteolysis as a Suicide Activator. *Journal of Bacteriology* 200: e00519-17.
- Uppal, S., Rao Akkipeddi, V., Jawaii, N. (2008): Posttranscriptional regulation of *cspE* in *E. coli*: involvement of the short 5' untranslated region. *FEMS Microbiol Lett.* 279: 83-91.
- Veinger, L., Diamant, S., Johannes, B., Goloubinoff, P. (1998): The Small Heat-shock Protein IbpB from *E. coli* Stabilizes Stress-denatured Proteins for Subsequent Refolding by a Multichaperone Network. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 11032-11037.
- 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
- Westra E.R., Pul Ümit, Heidrich N., Jore M.M., Lundgren M., Stratmann T., Wurm R., Raine A., Mescher M., Heereveld L. Van, Mastop M., Wagner E.G.H., Schnetz K., Oost J. Van Der, Wagner R., Brouns S.J.J. (2010): H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *E. coli* K-12 can be relieved by the transcription activator LeuO. *Mol. Microbiol.* 77: 14.
- Westra, E.R., Semenova, E., Datsenko, K.A., Jackson, R.N., Wiedenheft, B., Severinov, K., Brouns, S.J.J. (2013): Type I-E CRISPR-Cas systems discriminate target from non-target DNA through base pairing-independent PAM recognition. *PLoS Genet.* 9.

- Xiao, Y., Lou, M., Hayes, R. P., Kim, J., Ng, S., Ding, F., Liao, M., Ke, A. (2017): Structure Basis for Directional R-loop Formation and Substrate Handover Mechanisms in Type I CRISPR-Cas System. *Cell* 170: 48-60.
- 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: eaat0839.
- Xue, C., Sashital, D. G. (2019): Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in *Enterobacteriaceae*. *EcoSal Plus* 8: 100-106.
- Xue, C., Whitis, N. R., Sashital, D. G. (2016): Conformational Control of Cascade Interference and Priming Activities in CRISPR Immunity. *Mol. Cell* 64: 826-834.
- Yosef, I., Goren, M. G., Qimron, U. (2012): Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *E. coli*. *Nucleic Acids Res.* 40: 5569-5576.
- Zhang, D., Hussain, A., Manghwar, H., Xie, K., Xie, S., Zhao, S., Larkin, R. M., Quing, P., Jin, S., Ding, F. (2020): Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective. *Plant Biotechnol. J.* 18: 1651-1669.

8. ŽIVOTOPIS

Klara Peter rođena je 20. rujna 1997. godine u Čakovcu. Osnovnu školu završila je u Svetoj Mariji, a srednjoškolsko obrazovanje nastavila u Čakovcu gdje je 2016. završila opći smjer u Gimnaziji Josipa Slavenskog Čakovec. Iste godine upisala je integrirani preddiplomski i diplomski studij Biologije i kemije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.

Tijekom studijskog obrazovanja aktivno sudjeluje u izvedbi popularno-znanstvene manifestacije "Otvoreni dan Kemije" 2017. i 2018. godine i "Noć biologije" 2018. i 2019. godine koje su dio cjelodnevnog događanja "Dan i noć na PMF-u". Tijekom druge godine studija odradila je Laboratorijsku stručnu praksu pod vodstvom doc. dr. sc. Ivane Buj gdje je stekla vještine rada u laboratoriju. Tijekom završne godine studija odradila je metodičku praksu iz biologije u Prirodoslovnoj Školi Vladimira Preloga i metodičku praksu iz kemije u Osnovnoj školi Janka Draškovića gdje je stekla socijalne vještine, kompetencije i iskustvo rada s učenicima. Također, tijekom metodičke prakse iz kemije stekla je vještinu rada s učenicima s posebnim potrebama. Nadalje, tijekom metodičke prakse iz biologije stekla je digitalne vještine potrebne za održavanje online nastave.

Posebno zanimanje gaji prema molekularnoj biologiji, mikrobiologiji i fiziologiji čovjeka. Diplomski rad u području molekularne biologije upisuje na Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka pod vodstvom izv. prof. dr. sc. Ivane Ivančić Baće.

Dobitnica je STEM stipendije za akademsku godinu 2017./2018. i 2018./2019. koja se dodjeljuje u okviru projekta "Dodjela stipendija studentima u prioritetnim područjima (STEM)". Također, dobitnica je Dekanove nagrade za izuzetan uspjeh u studiju.