

Mehanizmi regulacije sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Mitić, Damjan

Doctoral thesis / Disertacija

2023

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:557423>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-14**



Repository / Repozitorij:

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





Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Damjan Mitić

**MEHANIZMI REGULACIJE SUSTAVA
CRISPR-CAS U BAKTERIJI *Escherichia
coli***

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2022



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DEPARTMENT OF BIOLOGY

Damjan Mitić

**MECHANISMS REGULATING THE
CRISPR-CAS SYSTEM IN *Escherichia
coli***

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2022

Ovaj je doktorski rad izrađen u Zavodu za molekularnu biologiju Biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, pod vodstvom dr. sc. Ivane Ivančić Baće, izv. prof., u sklopu Sveučilišnog poslijediplomskog doktorskog studija Biologije pri Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

INFORMACIJE O MENTORICI

Izv. prof. dr. sc. Ivana Ivančić Baće diplomirala je 1997. godine Molekularnu biologiju na Biološkom odsjeku PMF-a Sveučilišta u Zagrebu. Po završetku studija zapošljava se na Zavodu za Molekularnu biologiju Biološkog odsjeka PMF-a Sveučilišta u Zagrebu kao asistent-znanstveni novak. Magistrirala je 2000., potom se usavršavala 9 mjeseci u Institutu za genetiku Sveučilišta u Nottinghamu, Ujedinjeno Kraljevstvo, te je doktorirala 2004. Docent je postala 2008. iz područja prirodnih znanosti, polje biologija, znanstvena grana molekularna biologija i biokemija, a izvanredni profesor 2017. Na preddiplomskom sveučilišnom studiju Molekularna biologija predaje obavezni kolegij "Molekularna genetika", i "Molekularna biologija i biotehnologija" na integriranom preddiplomskom i diplomskom sveučilišnom studiju Biologija i kemija, smjer: nastavnički. Na doktorskom studiju Biologija je sunositeljica kolegija "Genetička rekombinacija i popravak DNA".

Fokus njenih istraživanja su mehanizmi homologne rekombinacije i popravka DNA te obrane bakterija od napada virusima (sustav CRISPR-Cas). Bila je voditeljica dvije potpore Zaklade HAZU, pet potpora SUZ, jednog bilateralnog projekta od British Councila, i HRZZ projekta "Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*" (2017-2021).

Objavila je 27 znanstvenih radova i jedno poglavlje u knjizi. Dobitnica je nagrade "Željko Trgovčević" za 2003. godinu Hrvatskog genetičkog društva i Državne nagrade za znanost za znanstveno otkriće za 2018. Bila je voditeljica preddiplomskog i diplomskog sveučilišnog studija Molekularna biologija, članica povjerenstva za provedbu upisa na diplomске sveučilišne studije na Biološkom odsjeku PMF-a. Sudjelovala je u radu panela ZŽ1 (znanosti o životu) pri HRZZ, bila je predsjednica Hrvatske udruge genetičkih inženjera (HUGI) od 2019.-2021. i članica je Odbora za ograničenu uporabu genetski modificiranih organizama (GMO) od 2022.

Zahvaljujem se svojoj mentorici dr. sc. Ivani Ivančić Baće, izv. prof. na prilici da izradim svoju doktorsku disertaciju pod njenim vodstvom. Hvala joj na strpljenju, pomoći i brojnim savjetima tijekom laboratorijskih pokusa i pisanja ove doktorske disertacije. Zahvalan sam što mi je u ovih malo više od četiri godine rada pokazala kako izgleda vesela i prijateljska radna atmosfera i što je uvijek bila otvorena za sva moja pitanja i nove ideje.

Hvala kolegi dr. sc. Edwardu L. Boltu što me je primio u svoj laboratorij u Nottinghamu i pružio mi priliku za dodatno usavršavanje. Zahvaljujem se i kolegama dr. sc. Liu He i dr. sc. Tomu Killeleai, koji su me srdačno dočekali i pomogli u snalaženju u laboratoriju dr. Bolta.

Hvala kolegama dr. sc. Branimiru Bertoši i Zoe Jelić Matošević na suradnji i računalnim analizama proteina Cas3 koje su značajno pridonjele našem istraživanju i ovoj doktorskoj disertaciji.

Zahvaljujem se i kolegama sa Zavoda za molekularnu biologiju za sve kave, pub kvizove i game nightove, uz njih je ovaj posao bio i zabava. Posebno hvala kolegama iz grupe Marinu Radovčiću i Dori Markulin od kojih sam mnogo naučio. Marinu hvala i na mnogobrojnim partijama tenisa i badmintona. Veliko hvala i mojim cimerima iz svjetlarnika, Adeli, Karli i Brunu, uz vas je ova soba sigurno bila najzabavnija i najglasnija na zavodu!

Na kraju, velika zahvala mojoj obitelji, roditeljima, baki i bratu na bezrezervnoj podršci i ljubavi. Velika zahvala ide i mojoj zaručnici Aniti, uvijek je bila tu za mene i vjerovala u mene, čak i kad ja nisam, bez nje ovaj uspjeh ne bi bio moguć.

Mehanizmi regulacije sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Damjan Mitić

Zavod za molekularnu biologiju Prirodoslovno-matematičkog fakulteta,

Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

Sustav CRISPR-Cas je adaptivni imunosni sustav za obranu prokariota od stranih genetičkih elemenata. Regulacija sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* je kompleksna i nije u potpunosti razjašnjena. Poznato je da protein H-NS djeluje na razini transkripcije, šaperon HtpG na razini post-translacije, dok temperatura utječe na aktivnost proteina Cas3 na nepoznati način. U ovom radu su detaljnije istraženi mehanizmi regulacije aktivnosti sustava CRISPR-Cas na razini transkripcije i post-translacije. Praćenjem otpornosti stanica na infekciju fagom λ vir i određivanjem količine transkripata gena *cas* utvrđeno je da protein StpA može inhibirati promotore *Pcas8e* i anti-*Pcas* u nedostatku proteina H-NS, te da pojačana ekspresija ili inaktivacija proteaze Lon u mutantu Δ *hns* aktivira zaštitu od infekcije neovisno o sustavu CRISPR-Cas. Na aktivnost proteina Cas3 utječe "anti-sense" mRNA na nepoznat način, dok temperatura uzrokuje alosteričku promjenu konformacije ovog proteina čime se inhibira njegova nukleazna aktivnost. Šaperon HtpG nije utjecao na količine proteina Cas3, već vjerojatno na zauzimanje njegove pravilne konformacije.

(106 stranica / 28 slika / 18 tablica / 225 literaturnih navoda / jezik izvornika hrvatski)

Ključne riječi: *E. coli*, CRISPR-Cas, Cas3, StpA, HtpG, Lon

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

Ocjenjivači: dr. sc. Nenad Malenica, doc.

dr. sc. Davor Zahradka, viši znanstveni suradnik

dr. sc. Dušica Vujaklija, znanstvena savjetnica

Mechanisms regulating the CRISPR-Cas system in *Escherichia coli*

Damjan Mitić

Division of Molecular Biology, Faculty of Science,
Horvatovac 102a, 10 000 Zagreb

The CRISPR-Cas system is a prokaryotic adaptive immune system that provides defense against foreign DNA. The regulation of the CRISPR-Cas system in *E. coli* is complex and not fully understood. The repressor H-NS acts at the transcriptional level, HtpG post-translationally, while the activity of Cas3 is affected by temperature in an unknown way. The aim of this research was to further elucidate the mechanisms regulating the activity of the CRISPR-Cas system at the transcriptional and post-translational level. Phage sensitivity assays and quantification of *cas* transcripts showed that StpA can inhibit *Pcas8e* and anti-*Pcas* promoters in the absence of H-NS. Overexpression or inactivation of Lon protease in Δhns mutants provides protection against phage infection independent of CRISPR-Cas. Cas3 protein activity is affected by an "anti-sense" mRNA in an unknown way, while allosteric change in Cas3 structure by temperature inhibits its nuclease activity. HtpG did not affect Cas3 levels, but the acquisition of the correct conformation.

(106 pages / 28 figures / 18 tables / 225 references / original in Croatian)

Keywords: *E. coli*, CRISPR-Cas, Cas3, StpA, HtpG, Lon

Supervisor: Dr. Ivana Ivančić Baće, Associate Professor

Reviewers: Dr. Nenad Malenica, Associate Professor

Dr. Davor Zahradka, Senior Research Associate

Dr. Dušica Vujaklija, Senior Scientist

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	5
2.1. Otkriće i povijest sustava CRISPR-Cas.....	5
2.2. Klasifikacija i primjena sustava CRISPR-Cas.....	7
2.3. Građa i ekspresija sustava CRISPR-Cas u bakteriji <i>Escherichia coli</i> K-12	10
2.4. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	12
2.5. Građa i uloga proteina Cas3	14
2.6. Ostali regulatori sustava CRISPR-Cas u bakteriji <i>Escherichia coli</i>	16
2.6.1. Protein StpA.....	17
2.6.2. Proteaza Lon	17
2.6.3. Šaperon HtpG	18
3. MATERIJALI I METODE.....	20
3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi.....	20
3.2. Početnice za PCR i RT-qPCR	24
3.3. Hranjivi mediji.....	26
3.4. Puferi	26
3.5. Metode rada s bakterijama	29
3.5.1. Uzgoj i pohrana bakterijskih sojeva.....	29
3.5.2. Konstrukcija sojeva P1 transdukcijom.....	29
3.5.3. Konstrukcija sojeva uklanjanjem antibiotske kazete.....	30
3.5.4. Konstrukcija sojeva zamjenom gena	30
3.5.5. Provjera genotipa kromosomskih mutanata bakterije <i>E. coli</i>	31
3.5.6. Kemijska transformacija bakterijskih sojeva	32
3.5.7. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija	32
3.5.8. Određivanje efikasnosti infekcije fagom λ vir	33
3.6. Metode rada s DNA	33
3.6.1. Priprema plazmida.....	33
3.6.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)	34
3.6.3. Agarozna gel elektroforeza.....	34
3.6.4. Restriksijska razgradnja, ligacija molekula DNA i provjera ugradnje	34
3.6.5. Ciljana mutageneza plazmidne DNA	36
3.6.6. Određivanje efikasnosti pripremljene adaptacije	37
3.7. Metode rada s RNA	38
3.7.1. Izolacija ukupne RNA	38

3.7.2. Određivanje količine transkripata metodom RT-qPCR.....	39
3.7.3. Priprema RNA za sekvenciranje ukupne RNA.....	39
3.8. Metode rada s proteinima.....	40
3.8.1. Liza stanica i izolacija ukupnih proteina	40
3.8.2. Određivanje koncentracije proteina	40
3.8.3. Provjera uspješnosti izolacije proteina metodom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)	41
3.8.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (<i>Western blot</i>)	42
3.8.5. Imunodetekcija proteina Cas3 i GAPDH	42
4. REZULTATI.....	44
4.1. Utjecaj proteina StpA na promotor <i>Pcas8e</i>	44
4.2. Utjecaj proteina StpA na promotor anti- <i>Pcas</i>	49
4.3. Utjecaj transkripta <i>antiCas</i> na transkripciju i translaciju gena <i>cas3</i>	51
4.4. Utjecaj transkripta <i>antiCas</i> na pripremljenu adaptaciju	54
4.5. Utjecaj proteaze Lon na aktivnost sustava CRISPR-Cas.....	56
4.6. Utjecaj proteaze Lon na efikasnost transformacije bakterijskih stanica.....	58
4.7. Utjecaj proteaze Lon na promotor <i>Pcas8e</i>	59
4.8. Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3	60
4.9. Utjecaj enzimatskih aktivnosti šaperona HtpG na aktivnost proteina Cas3 u zaštiti od infekcije fagom <i>λvir</i>	63
4.10. Utjecaj promjene konformacije na aktivnost proteina Cas3.....	64
4.11. Utjecaj delecije gena <i>hns</i> na transkriptom bakterije <i>E. coli</i>	69
5. RASPRAVA.....	71
5.1. Utjecaj proteina StpA na regulaciju promotora <i>Pcas8e</i>	71
5.2. Aktivnost promotora anti- <i>Pcas</i>	75
5.3. Utjecaj transkripta <i>antiCas</i> na aktivnost sustava CRISPR-Cas	76
5.4. Utjecaj proteaze Lon na aktivnost sustava CRISPR-Cas.....	78
5.5. Utjecaj šaperona HtpG na aktivnost sustava CRISPR-Cas	79
5.6. Utjecaj promjene konformacije na aktivnost proteina Cas3.....	81
5.7. Utjecaj delecije gena <i>hns</i> na transkriptom bakterije <i>E. coli</i>	85
6. ZAKLJUČAK.....	86
7. LITERATURA.....	87
8. ŽIVOTOPIS.....	106

1. UVOD

Prokarioti su razvili različite mehanizme za obranu od stranih genetičkih elemenata, poput bakteriofaga ili plazmida. Jedan od njih je adaptivni imunostni sustav CRISPR-Cas (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats; CRISPR-associated*) koji je prisutan u mnogim bakterijama i većini arheja [1–3]. Sustavi CRISPR-Cas građeni su od lokusa CRISPR i pridruženih gena *cas*, a međusobno se razlikuju u organizaciji gena *cas* i efektorskih proteina, te su podijeljeni u dvije klase, šest tipova i 33 podtipova [4–6]. Sustav CRISPR-Cas iz bakterije *Escherichia coli* spada u klasu 1, tip I-E, a sastoji se od 8 gena *cas* (*cas1*, *cas2*, *cas3* i *casABCDE* ili *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5* i *cas6e*) i dva lokusa CRISPR [4,7]. Lokusi CRISPR sadrže vodeću regiju bogatu AT parovima baza u kojoj se nalazi promotor, te niz ponavljajućih sljedova nukleotida odvojenih razmaknicama (engl. *spacers*) porijeklom iz strane molekule DNA [8]. Umetanje novih razmaknica osigurava imunitet u slučaju ponovne infekcije istom stranom molekulom DNA [1,3]. Stjecanje imuniteta i obrana od stranih genetičkih elemenata putem sustava CRISPR-Cas može se podijeliti u tri faze: adaptacija, ekspresija i sazrijevanje, te interferencija [9,10]. U fazi adaptacije, koja je posredovana proteinima Cas1 i Cas2, mali fragmenti strane molekule DNA, zvani protorazmaknice, ugrađuju se u lokus CRISPR čime postaju nove razmaknice [11–13]. Razlikujemo dva različita oblika adaptacije, naivnu (engl. *naïve*) i pripremljenu (engl. *primed*) adaptaciju [13–15]. Za stjecanje novih razmaknica pripremljenom adaptacijom potrebni su proteini Cas1, Cas2 i Cas3, kompleks Cascade (engl. *CRISPR associated complex for antiviral defence*) i već prisutna razmaknica u lokusu CRISPR porijeklom iz te strane DNA [15]. U idućoj fazi, lokus CRISPR prepisuje se u dugu, nezrelu molekulu pre-CRISPR RNA (pre-crRNA) koju proteini Cas obrađuju u kratke, zrele molekule CRISPR RNA (crRNA) koje predstavljaju pojedinačne razmaknice (omeđene dijelovima ponavljajuće DNA) [2,16]. Svaka se crRNA zatim povezuje s kompleksom Cascade i služi kao vodič za identifikaciju strane molekule DNA iz koje je razmaknica potekla na principu komplementarnosti [2,17]. Komplementarnim sparivanjem nukleotida RNA i dvolančane DNA formira se R-omča u kojoj se ciljani lanac protorazmaknice spaja s crRNA, a nekomplementarni lanac se istiskuje [18–20]. U zadnjoj fazi, interferenciji, promjena u konformaciji kompleksa Cascade vezanog na stabilnu R-omču privlači protein Cas3, sastavljen od HD-nukleazne i ATP-ovisne helikazne domene, koji cijepa i uništava ciljnu molekulu DNA [21–24].

Tri promotora kontroliraju ekspresiju komponenata sustava CRISPR-Cas: *Pcas3* kontrolira ekspresiju samostalnog gena *cas3*, *Pcas8e* kontrolira ekspresiju operona od 7 gena *casABCDEI2* i promotor P_{CRISPR} smješten u vodećoj regiji kontrolira ekspresiju lokusa CRISPR

[8,25]. Uloga četvrtog promotora, anti-*Pcas*, trenutno je nepoznata, ali pretpostavlja se da ima ulogu u terminaciji transkripcije ili prevenciji translacije *cas3* mRNA [25]. Ekspresija komponenata sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* snažno je utišana aktivnošću proteina H-NS (engl. *histone-like nucleoid-structuring protein*), globalnog regulatora transkripcije kod mnogih Gram-negativnih bakterija [8,25]. Protein H-NS se veže za intergensko područje između gena *cas3* i *casA* poznato kao regija IGLB (engl. *intergenic region ygcL-ygcB*), koja sadrži dva divergentno orijentirana promotora, *Pcas8e* i anti-*Pcas* [25,26]. Osim proteina H-NS, afinitet vezanja na regiju IGLB ima i paralog proteina H-NS, protein StpA (engl. *suppressor of td phenotype A*) [27]. Proteini H-NS i StpA inhibiraju transkripciju jedan drugom [28,29], pa je gen *stpA* slabo eksprimiran u stanicama divljeg tipa, a transkripcija mu je inducirana tek u mutantu Δhns [27]. Uloga proteina StpA u regulaciji sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* nije poznata, ali postoji mogućnost da bi se mogao ponašati kao represor i vezati za promotore *Pcas8e* i anti-*Pcas* u odsustvu proteina H-NS i inhibirati ekspresiju operona i transkripta *antiCas*. Na ekspresiju gena *cas* mogle bi indirektno utjecati i proteaze razgradnjom transkripcijskih faktora, represora ili drugih proteina. Na aktivnost proteina sustava CRISPR-Cas mogu djelovati šaperoni na način da mogu utjecati na količine ili aktivnost proteina. Osim toga, temperatura inkubacije utječe na aktivnost proteina Cas3 trenutno nepoznatim mehanizmom. Jedna zanimljiva mogućnost je da dolazi do promjene konformacije proteina Cas3 zbog koje se ponaša kao prekidač u ovisnosti o temperaturi čime se mijenja ili vezanje supstrata, ili enzimska aktivnost ili interakcija s kompleksom Cascade.

Cilj ovog istraživanja bio je detaljno istražiti mehanizme regulacije aktivnosti sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* na razini transkripcije i post-translacije. Za mehanizme regulacije na razini transkripcije hipoteza je bila da se protein StpA ponaša kao dodatni represor operona *casABCDE12* i promotora anti-*Pcas*. U skladu s postavljenom hipotezom, na post-translacijskoj razini istražio sam utjecaj i) šaperona HtpG na količine proteina Cas3, ii) proteaze Lon na infekciju fagom λvir i ekspresiju operona *casABCDE12*, iii) transkripta *antiCas* na infekciju fagom λvir , ekspresiju gena *cas3*, količine proteina Cas3 i efikasnost pripremljene adaptacije, te iv) temperature na promjenu konformacije i aktivnost proteina Cas3 primjenom biokemijske, računalne, biofizičke i *in vivo* analize.

U prvom dijelu istraživanja analizirao sam mehanizme regulacije ekspresije gena *cas* na razini transkripcije. Utjecaj proteina StpA na ekspresiju operona *casABCDE12* i promotor anti-*Pcas* istražio sam praćenjem otpornosti bakterijskih sojeva na infekciju fagom λvir korištenjem mutanata bakterije *E. coli* sa i bez gena *hns* i *stpA* i plazmida s kloniranim genom *stpA*.

Otpornost navedenih sojeva na infekciju fagom λ vir sam izmjerio određivanjem broja virusnih čestica (engl. *plaque forming units*, PFU) faga λ vir na dvije temperature inkubacije, 30 °C i 37 °C. Istražio sam i količine transkripata *casA*, *antiCas* i *cas3* metodom kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR) iz izolirane ukupne RNA istih mutanata u različitim fazama rasta i temperaturama inkubacije.

Na sličan način istražio sam i utjecaj transkripta *antiCas* na infekciju fagom λ vir i ekspresiju gena *cas3*, kao i na efikasnost pripremljene adaptacije. Pripremljenu adaptaciju sam odredio u soju bakterije *E. coli* s inducibilnim genima *cas* i anti-lambda razmaknicom u lokusu CRISPR. Kao izvor novih razmaknica mi je poslužio plazmid pTK43, a transkript *antiCas* sam eksprimirao s plazmida pDM16. Prekonoćne kulture sam lizirao te u njima lokus CRISPR analizirao metodom PCR i elektroforezom u agaroznom gelu. Usporedbom intenziteta signala umnoženog lokusa CRISPR kvantificirao sam efikasnost adaptacije ovisno o indukciji ekspresije proteina Cas3 i transkripta *antiCas*.

Utjecaj proteaze Lon na infekciju fagom λ vir i ekspresiju operona *casABCDEI2* istražio sam korištenjem mutanata bakterije *E. coli* sa i bez gena *hns* i *lon* i plazmida s kloniranim genom *lon*. U istim sojevima sam usporedio i količine transkripata *casA* metodom RT-qPCR. Osim toga, utjecaj delecije gena *lon* na aktivnost sustava CRISPR-Cas sam istražio i praćenjem efikasnosti transformacije s ciljnim plazmidom pTK43. Stanice sam nakon elektroporacije i oporavka nasadio na selektivne podloge i usporedio efikasnost transformacije ovisno o genotipu.

Mehanizme regulacije na razini post-translacije istražio sam određivanjem količina proteina Cas3 u prisustvu šaperona HtpG eksprimiranog s plazmida. Ukupne proteine sam izolirao iz različitih mutanata bakterije *E. coli* uzgojenih do stacionarne faze rasta na dvije temperature inkubacije, 30 °C i 37 °C. Uspješnost izolacije proteina sam provjerio metodom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE). Utjecaj šaperona HtpG na količinu proteina Cas3 sam odredio usporedbom intenziteta vrpce dobivenih metodom *Western blot*. Kao kontrolu nanošenja uzorka (engl. *loading control*) i za normalizaciju intenziteta vrpce, koristio sam protein GAPDH. Istražio sam i utjecaj točkastih mutacija u šaperonu HtpG na aktivnost proteina Cas3 praćenjem otpornosti na infekciju fagom λ vir. Utjecaj transkripta *antiCas* na količinu proteina Cas3 sam istražio u istim sojevima i na isti način kao i utjecaj šaperona HtpG.

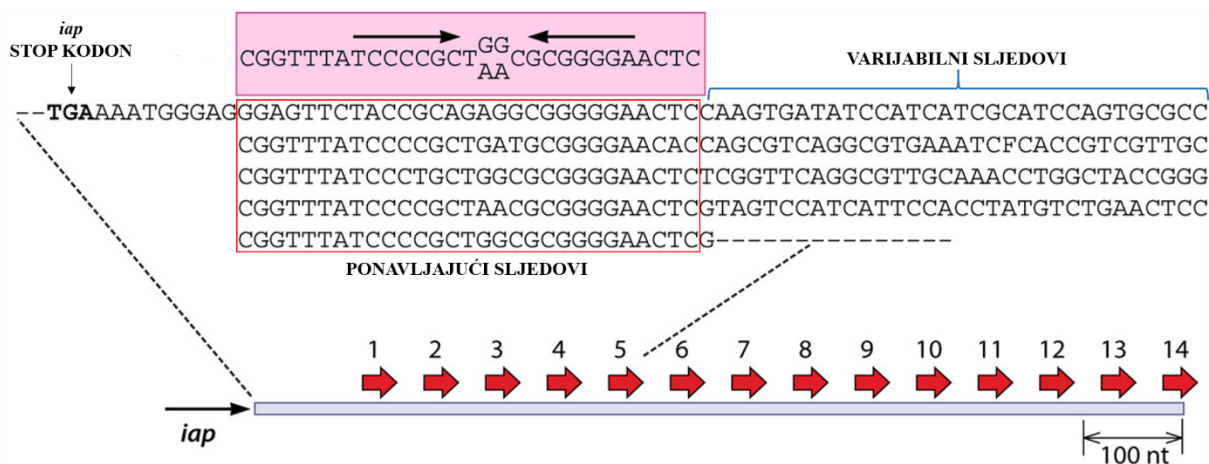
Kako bih istražio utjecaj temperature na aktivnost i konformaciju proteina Cas3, prvo sam napravio točkaste mutante u genu *cas3* (Cas3^{W149A}, Cas3^{W152A}, Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A}) ciljanom mutagenezom gena *cas3* u plazmidu pAH4 i odredio utjecaj tih mutacija na aktivnost proteina Cas3 *in vivo* praćenjem otpornosti na infekciju fagom λ vir. Osim na plazmidu, metodom zamjene gena sam gen *cas3* na kromosomu zamijenio s mutiranim genom, te i u tako dobivenim sojevima odredio otpornost na infekciju. U suradnji s prof. dr. sc. Boltom (Sveučilište u Nottinghamu, Ujedinjeno Kraljevstvo), prof. dr. sc. Bertošom (PMF, Sveučilište u Zagrebu, Hrvatska) i dr. sc. Marijom Matković s Instituta Ruđer Bošković napravljena je biokemijska, računalna i biofizička analiza proteina Cas3.

Utjecaj delecije gena *hns* na ekspresiju drugih gena u genomu *E. coli* istražena je na razini transkriptoma odabranih sojeva. Za ovu analizu izolirao sam ukupnu RNA iz divljeg tipa bakterije *E. coli* i soja s deletiranim genom *hns*, uzgajanih do stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C. Uzorci izolirane ukupne RNA sekvencirani su u servisu Macrogen (Južna Koreja), gdje su dobiveni podaci i bioinformatički obrađeni.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Otkriće i povijest sustava CRISPR-Cas

Pokušavajući identificirati protein odgovoran za stvaranje izoenzima alkalne fosfataze, japanski znanstvenik Yoshizumi Ishino je sredinom 80-ih godina 20. stoljeća sekvencirao fragment genoma bakterije *Escherichia coli* (*E. coli*) K-12 koji je obuhvaćao područje oko gena *iap* (engl. *isozyme of alkaline phosphatase*) [30]. Tijekom sekvenciranja tog fragmenta otkrio je neobične, ponavljajuće palindromske sljedove nizvodno od stop kodona gena *iap*, koji nisu imali sličnosti s do tada poznatim ponavljajućim sljedovima (Slika 1). Ubrzo nakon toga, slični ponavljajući sljedovi otkriveni su u još dva soja bakterije *E. coli* (C600 i Ymel), te u drugim bakterijama [31–33]. Početkom 90-ih godina 20. stoljeća, slični ponavljajući sljedovi su prvi put otkriveni u arhejama [34]. Kroz idućih nekoliko godina, posebice razvojem metoda sekvenciranja cijelog genoma, takvi ponavljajući sljedovi su, pod raznim imenima, otkriveni i u sve većem broju drugih arheja i bakterija [35,36].



Slika 1. Ponavljajući palindromski sljedovi u genomu *E. coli* K-12, nizvodno od stop kodona gena *iap*. Prikazana je sekvenca prvih pet ponavljajućih sljedova od 29 parova baza (pb), između kojih se nalaze varijabilni sljedovi od 32 pb. Crnim strelicama u crvenom okviru označeni su palindromski nukleotidi u ponavljajućim sljedovima. Ispod sekvence je shematski prikazano ukupno 14 ponavljajućih sljedova (ponavljajući sljedovi su prikazani crvenim strelicama, dok su prazna mjesta između njih varijabilni sljedovi). Preuzeto i prilagođeno iz [37].

Međutim, tek su 2000. godine Francisco Mojica i suradnici prvi shvatili da su svi ti bakterijski i arhealni ponavljajući sljedovi funkcionalno povezani [38]. Kako bi se izbjeglo daljnju zabunu, uzrokovanu mnogim različitim nazivima za međusobno srodne ponavljajuće

sljedove, Ruud Jansen i suradnici su 2002. godine za njih predložili danas općeprihvaćeni termin lokus CRISPR (engl. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) [39]. Daljnjim genomskim analizama, lokusi CRISPR pronađeni su u gotovo svim genomima arheja, te u otprilike polovici bakterijskih genoma, što ih čini najrasprostranjenijom skupinom ponavljajućih sljedova u prokariotima [40]. Do danas, lokus CRISPR nije pronađen ni u jednom eukariotskom genomu [37]. Početkom 21. stoljeća, sve veća dostupnost genomskih sekvenci mnogih bakterija i arheja, dovela je do otkrića četiri evolucijski očuvana gena redovito prisutna uz lokus CRISPR, koji su zbog toga nazvani geni *cas1 – cas4* (engl. *CRISPR-associated*) [39].

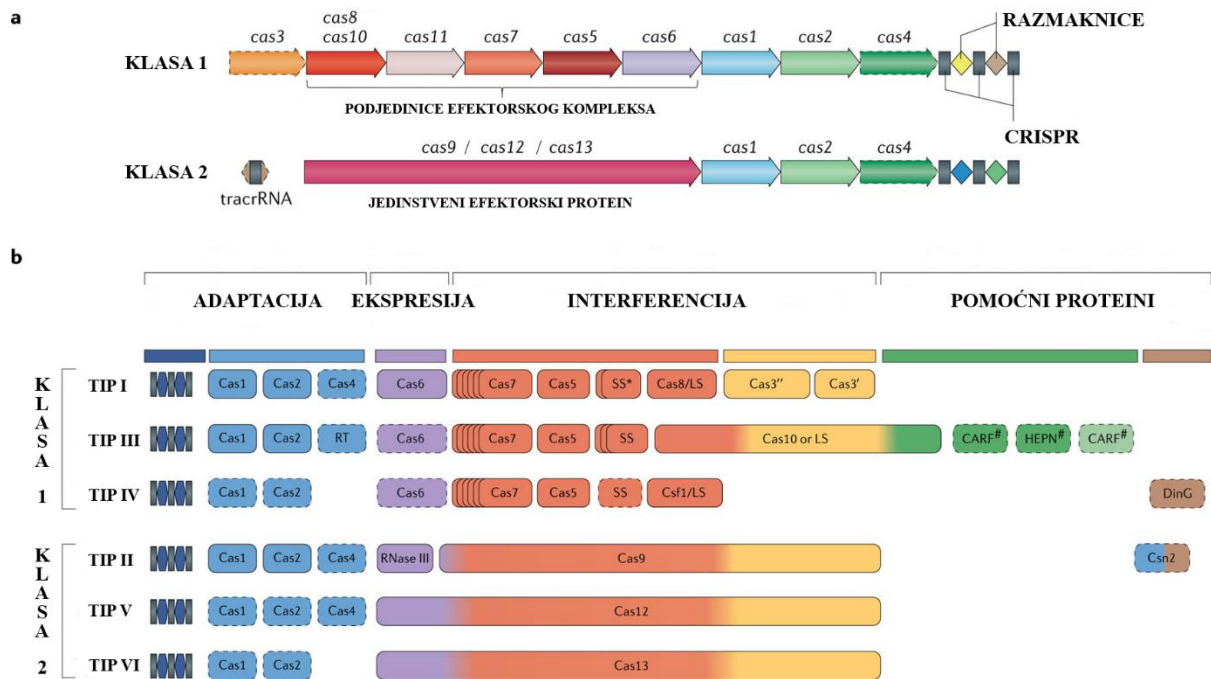
Unatoč ovim brojnim otkrićima, uloga lokusa CRISPR i s njim povezanih gena *cas* još uvijek nije bila poznata. Prva su opažanja smatrala da bi lokus CRISPR, zbog češće prisutnosti u termofilnim bakterijama i arhejama, mogao imati ulogu u prilagodbi organizama na visoke temperature [39]. Međutim, kako je broj sekvenciranih genoma rastao, tako se pokazalo da i mnogi mezofilni organizmi također sadrže lokus CRISPR, pa je ova pretpostavka ubrzo odbačena. Prvo značajno otkriće uloge lokusa CRISPR nastupilo je 2005. godine kada su, neovisno jedna o drugoj, istraživačke skupine Francisca Mojice i Christine Pourcel primijetile da razmaknice (engl. *spacers*, varijabilni sljedovi) između ponavljajućih sljedova odgovaraju sekvencama bakteriofaga, profaga i plazmida [41,42]. Pregledom literature su ustanovili da fagi i plazmidi ne inficiraju sojeve domaćina koji sadrže homologne razmaknice u lokusu CRISPR. Iz ovih zapažanja, obje su grupe predložile da lokus CRISPR funkcionira u okviru biološkog obrambenog sustava sličnog eukariotskoj RNA interferenciji (RNAi), te da na neki način potiče hvatanje dijelova strane DNA kako bi se stvorila genetska memorija prijašnjih infekcija [41,42]. U trećem značajnom radu iz iste godine, Alexander Bolotin i suradnici potvrdili su ova zapažanja, dalje uočavajući korelaciju između broja razmaknica porijeklom iz faga i razine otpornosti na infekciju tim fagom, te sugerirajući da bi i produkti gena *cas* također trebali imati ulogu u ovom obrambenom sustavu [43]. Godinu dana kasnije, Kira Makarova i suradnici su detaljnom analizom sekvenci proteina Cas pokušali predvidjeti njihovu ulogu kao efektora ovog prokariotskog imunosnog sustava [44].

Ulogu sustava CRISPR-Cas kao prokariotskog imunosnog sustava prvi su put eksperimentalno dokazali Rodolphe Barrangou i suradnici 2007. godine [1]. Oni su pokazali da je soj bakterije *Streptococcus thermophilus* otporan na infekciju fagom, ako u lokusu CRISPR sadrži razmaknicu porijeklom iz tog faga. S druge strane, kada je iz genoma faga uklonjena sekvenca homologna toj razmaknici, ova otpornost bakterija na infekciju fagom je nestala [1]. Nadalje, Luciano Marraffini i Erik Sontheimer su eksperimentalno dokazali da sustav CRISPR-

Cas sprječava transformaciju bakterije *Staphylococcus epidermidis* onim plazmidima koji sadrže sekvence homologne razmaknicama u lokusu CRISPR [3]. Nedugo nakon toga, John van der Oost i suradnici su na sustavu CRISPR-Cas iz bakterije *E. coli* pokazali da proteini Cas prvo obrađuju molekule RNA dobivene transkripcijom lokusa CRISPR, te se one potom vežu na proteine Cas i služe im kao vodič do komplementarne molekule DNA, čime zajedno omogućuju zaštitu od strane DNA [2]. Kroz idućih nekoliko godina, kako su se redali novi eksperimentalni dokazi, funkcija sustava CRISPR-Cas više nije bila upitna, te je naširoko prihvaćen kao adaptivni imunosni sustav koji služi za obranu od stranih genetičkih elemenata [45,46].

2.2. Klasifikacija i primjena sustava CRISPR-Cas

Svi sustavi CRISPR-Cas građeni su od lokusa CRISPR i pridruženih gena *cas*, ali slično drugim biološkim obrambenim mehanizmima, oni također pokazuju izuzetnu raznolikost, pa ih tako međusobno dijelimo prema organizaciji efektorskih proteina i gena *cas* (Slika 2) [4,47]. Prema trenutnoj klasifikaciji, sustavi CRISPR-Cas podijeljeni su u dvije klase, šest tipova i 33 podtipova [4–6]. Sustavi klase 1 (tipovi I, III i IV) imaju efektorske komplekse građene od više različitih proteina Cas i široko su rasprostranjeni u bakterijama i arhejama, te u njih spada oko 90 % svih trenutno otkrivenih sustava CRISPR-Cas [4,48]. Preostali sustavi pripadaju klasi 2 (tipovi II, V i VI) koja koristi jedan efektorski protein s više domena i njih nalazimo gotovo isključivo u bakterijama [4,49,50].



Slika 2. Klasifikacija sustava CRISPR–Cas u dvije klase i šest tipova. **a)** Tipična organizacija lokusa CRISPR za sustave klase 1 koji imaju efektorski kompleks sastavljen od više podjedinica, i sustave klase 2 koji imaju jedan efektorski protein. **b)** Sustavi CRISPR-Cas su unutar klasa podijeljeni na tipove, ovisno o sastavu i funkciji proteina Cas. Sivi pravokutnici s tamnoplavim rombovima označavaju lokus CRISPR s umetnutim razmaknicama, prisutan u svim sustavima. Svijetloplavo su obojeni proteini Cas koji sudjeluju u fazi adaptacije, ljubičasto oni koji sudjeluju u ekspresiji i sazrijevanju CRISPR-RNA (crRNA), crveno oni koji sudjeluju u prepoznavanju strane DNA, žuto proteini s nukleaznom funkcijom, te zeleno i smeđe pomoćni proteini. Zvezdica označava predloženu malu podjedinicu (engl. *small subunit*, SS) koja bi se mogla spojiti s velikom podjedinicom (engl. *large subunit*, LS) u nekoliko podtipova tipa I. Komponente koje nedostaju u nekim podtipovima označene su isprekidanim obrisima. Trobojni prikaz za proteine Cas9, Cas10, Cas12 i Cas13 odražava činjenicu da ti proteini doprinose različitim fazama djelovanja sustava CRISPR-Cas. Preuzeto i prilagođeno iz [4].

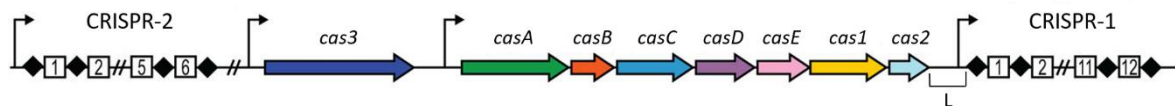
Činjenica da sustav CRISPR-Cas omogućuje prepoznavanje specifičnih sekvenci DNA i njihovo cijepanje pomoću efektorskih proteina Cas, činilo je ovaj sustav potencijalnim novim alatom za uređivanje genoma (engl. *gene editing*) uvođenjem ciljanih lomova u molekuli DNA. Sustavi klase 2 bili su logičan izbor za razvoj ove tehnologije zbog prisutnosti samo jednog efekorskog proteina. Početak korištenja sustava CRISPR-Cas kao biotehnološkog alata bilo je otkriće da se protein Cas9, koji spada u klasu 2 i tip II, može reprogramirati tako da cilja i cijepa željenu sekvencu DNA u bakterijama [51,52]. Ubrzo nakon toga je pokazano da se sustav CRISPR-Cas9 može prilagoditi i za *in vivo* uređivanje genoma u eukariotskim stanicama, čime

je stvoren iznimno fleksibilan alat koji se lako mogao usmjeriti do gotovo bilo kojeg mjesta u eukariotskom genomu [53–55]. Iako i dalje postoje tehnički izazovi u njenom korištenju u kliničkoj terapiji, posebice kako dopremiti sve komponente sustava u ciljno tkivo i kako smanjiti nespecifične učinke (engl. *off-target effects*), danas su u tijeku brojna klinička ispitivanja učinkovitosti tehnologije CRISPR-Cas9 za liječenje mnogih bolesti, od različitih tipova karcinoma, sve do nasljednih bolesti kao što su β -talasemija ili bolest srpastih stanica [56,57]. Moguće posljedice sve raširenije uporabe tehnologije CRISPR-Cas9 za uređivanje genoma čovjeka otvaraju brojna moralna i etička pitanja oko primjene i regulacije metode [58]. Osim za uređivanje genoma, sustav CRISPR-Cas9 je pokazao potencijal kao antimikrobno sredstvo s novim mehanizmom djelovanja, tako što cijepa genom patogenih bakterija otpornih na antibiotike [59,60]. Razvijen je i mutant proteina Cas9 bez nukleazne aktivnosti (dCas9), koji se može vezati na ciljnu sekvencu DNA, ali je ne može pocijepati. Takav sustav se koristi za precizno obilježavanje (engl. *site-specific labelling*) pomoću signalnih molekula vezanih na protein dCas9 ili za regulaciju ekspresije gena vezanjem proteina dCas9 na promotorsku regiju ili otvoreni okvir čitanja gena (engl. *open reading frame*) [61–64]. Također, korištenje sustava u kojem je protein dCas9 fuzioniran s nukleazom *FokI* može povećati preciznost i smanjiti nespecifično cijepanje genoma [65–67]. Osim proteina Cas9, i drugi efektori iz sustava CRISPR-Cas klase 2 se koriste za uređivanje genoma, primjerice protein Cas12 u terapiji AIDS-a ili za uređivanje biljnih genoma [68,69], te protein Cas13 za ciljanje biljnih RNA virusa ili detekciju i liječenje karcinoma [70–72], a u posljednjih nekoliko godina pojavili su se i alati koji koriste komponente sustava klase 1 [73–75]. Za svoj rad na sustavu CRISPR-Cas9 kao alatu za jednostavno i precizno uređivanje genoma, znanstvenice Emmanuelle Charpentier i Jennifer Doudna dobile su Nobelovu nagradu za kemiju 2020. godine.

Za razliku od eukariota, korištenje sustava CRISPR-Cas za uređivanje genoma nije bilo toliko revolucionarno u bakterijama, vjerojatno zato što su već postojale druge metode temeljene na homolognoj rekombinaciji, koje su omogućavale učinkovitu manipulaciju njihovim genomima [37]. Unatoč tome, postupno se pojavljuje sve više alata temeljenih na sustavu CRISPR-Cas koji služe za uređivanje genoma, utišavanje gena i probir esencijalnih gena u genomima bakterija i arheja [76–78]. Međutim, u bakterijama i arhejama lokusi CRISPR su se koristili kao genetski markeri za identifikaciju vrsta i tipizaciju u dijagnostičke i epidemiološke svrhe, čak i prije razjašnjenja stvarne funkcije sustava CRISPR-Cas [33,79–83].

2.3. Građa i ekspresija sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli* K-12

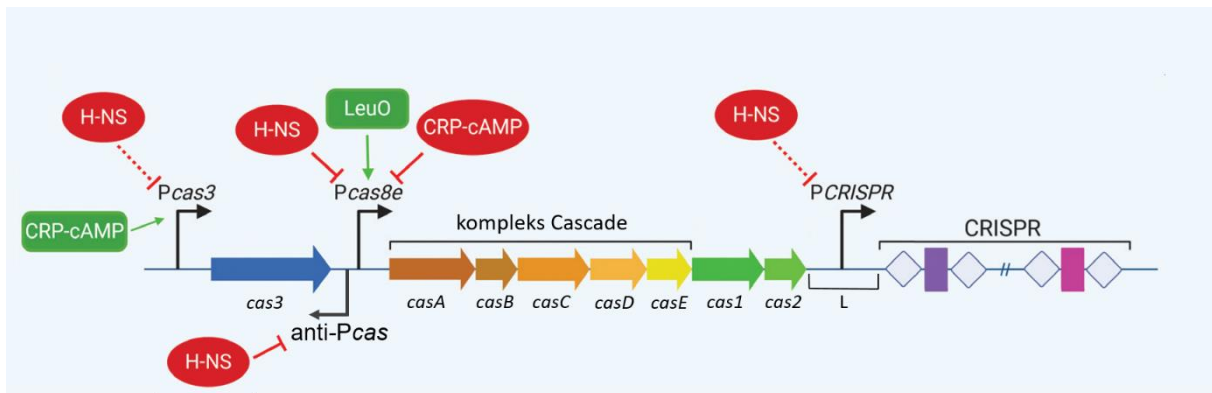
Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* K-12 spada u klasu 1 i tip I-E, a sastoji se od 8 gena *cas* (*cas1*, *cas2*, *cas3* i *casABCDE* ili *cse1*, *cse2*, *cas7*, *cas5* i *cas6e*) i dva lokusa CRISPR (CRISPR-1 i CRISPR-2) (Slika 3) [7,8]. Geni *cas* se u odnosu na smjer prepisivanja nalaze uzvodno od lokusa CRISPR-1, a prvi po redu je gen *cas3*, zatim slijedi kratka intergenska regija, pa operon sastavljen od gena *casABCDEI2*. Nakon operona, a prije samog lokusa CRISPR, nalazi se vodeća regija (engl. *leader*) bogata AT parovima baza s promotorom. Lokus CRISPR čini niz ponavljajućih sljedova nukleotida odvojenih razmaknicama porijeklom iz strane molekule DNA. Lokus CRISPR-2 ne sadrži pridružene gene *cas* [8,84,85]. Svi geni *cas* kodiraju proteine bitne za funkcioniranje sustava CRISPR-Cas, pa tako geni *cas1* i *cas2* kodiraju za proteinski kompleks Cas1-Cas2, gen *cas3* za nukleazu/helikazu Cas3, a geni *casABCDE* za proteinski kompleks Cascade (engl. *CRISPR-associated complex for antiviral defense*) [10]. Budući da postoje razlike u sustavu CRISPR-Cas između različitih sojeva bakterije *E. coli* [84], a primarni modelni organizam ove doktorske disertacije je soj bakterije *E. coli* K-12, daljnji opisi sustava CRISPR-Cas u tekstu se odnose upravo na ovaj soj, osim ako nije drukčije naznačeno.



Slika 3. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E iz bakterije *E. coli* K-12. Geni *cas* su prikazani obojanim strelicama, promotori odgovorni za prepisivanje gena *cas* i lokusa CRISPR prelomljenim crnim strelicama, a slovom L je označena vodeća regija (engl. *leader*). U lokusima CRISPR crni rombovi označavaju ponavljajuće sljedove, a bijeli pravokutnici razmaknice. Dvostruke kose crte (//) označavaju da je stvarna udaljenost u genomu veća od prikazane. Lokus CRISPR-2 ne sadrži pridružene gene *cas*. Preuzeto i prilagođeno iz [10].

Regulacija sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* vrlo je složena i još nije u potpunosti razjašnjena. Međutim, poznato je da u standardnim laboratorijskim uvjetima uzgoja, sustav CRISPR-Cas u divljem tipu bakterije *E. coli* nije aktivan [8,25,86]. Komponente sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* reguliraju tri neovisna promotora P_{cas3} , P_{cas8e} i P_{CRISPR} , dok uloga četvrtog promotora anti- P_{cas} nije poznata (Slika 4). Promotor P_{cas3} kontrolira ekspresiju gena *cas3*, promotor P_{cas8e} kontrolira ekspresiju policistronskog operona *casABCDEI2*, a

slabi promotor P_{CRISPR} iz porodice promotora σ^{70} , koji se nalazi u vodećoj regiji, kontrolira ekspresiju lokusa CRISPR-1 [8,25].



Slika 4. Regulacija sustava CRISPR-Cas tipa I-E iz bakterije *E. coli* K-12. Geni *cas* su prikazani obojanim strelicama, a promotori prelomljenim crnim strelicama. Intergenska regija između gena *cas3* i *casA* sadrži dva divergentno orijentirana promotora (*Pcas8e* i *anti-Pcas*). Crvenom bojom su prikazani represori, a zelenom aktivatori za svaki promotor (isprekidana crta označava djelomičnu regulaciju). Slovom L je označena vodeća regija (engl. *leader*). U lokusu CRISPR plavi rombovi označavaju ponavljajuće sljedove, a obojani pravokutnici razmaknice. Preuzeto i prilagođeno iz [87].

Ekspresija komponenti sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* snažno je utišana represivnom aktivnošću proteina H-NS (engl. *histone-like nucleoid structuring protein*) [8,25]. Protein H-NS je globalni transkripcijski regulator u mnogim Gram-negativnim bakterijama, u kojima utišava mnoge gene uključene u odgovor na stres ili promjene u okolišnim uvjetima, kao što su temperatura, osmolarnost, promjene u pH ili razini kisika [88]. Utišavanje transkripcije se u većini slučajeva postiže rasprostiranjem proteina H-NS duž regije DNA bogate AT parovima baza, čime se molekula DNA kondenzira i nastaju DNA-proteinski mostovi, što sprječava vezanje RNA polimeraze [89,90], ali protein H-NS također može regulirati ekspresiju određenih gena i nakon transkripcije [88]. Pokazalo se da protein H-NS ima afinitet vezanja za intergensku regiju IGLB (engl. *intergenic region ygcL-ygcB*), koja se nalazi između gena *cas3* i *casA* [25,26], čime inhibira ekspresiju s promotora *Pcas8e* [25]. U intergenskoj regiji IGLB se nalazi i divergentno orijentirani promotor *anti-Pcas*, koji je aktivan *in vivo* i kodira kratki transkript od 373 nukleotida koji se preklapa sa zadnjih 205 nukleotida gena *cas3*, i također je pod kontrolom proteina H-NS. Kako se ovaj transkript može smotati u složenu sekundarnu strukturu, predloženo je da može potencijalno stupiti u interakciju s proteinom Cas3 kako bi inhibirao njegovu aktivnost, ili se vezati na RNA transkript gena *cas3*

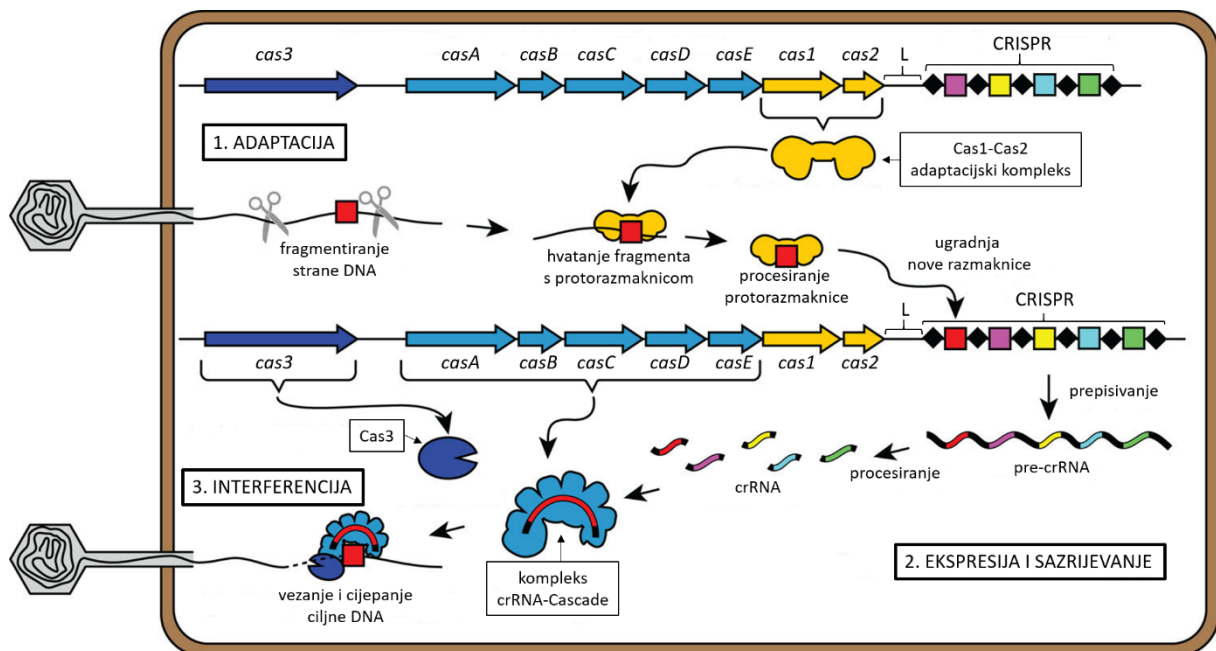
i time inhibirati njegovu terminaciju transkripcije i/ili translaciju [25]. Za razliku od snažno utišanog promotora *Pcas8e*, transkripcija lokusa CRISPR i gena *cas3* samo djelomično ovisi o proteinu H-NS [25,91]. Uz protein H-NS, transkripciju s promotora *Pcas8e* negativno regulira i cAMP receptorski protein CRP (engl. *cAMP receptor protein*), zbog čega transkripcija s ovog promotora ovisi i o razinama glukoze u stanici [92]. Za razliku od operona *casABCDE12*, gen *cas3* je pozitivno koreguliran proteinom CRP i sustavom cijepanja glicina (engl. *glycine cleavage system*), što je primijećeno u stanicama kasne logaritamske faze rasta inkubiranim s glicinom u minimalnom mediju ili u LB mediju s povišenim razinama molekule cAMP [93].

Zbog navedenog represivnog djelovanja proteina H-NS na transkripciju gena *cas*, sustav CRISPR-Cas ne pruža zaštitu od infekcije fagima u divljem tipu bakterije *E. coli* [8,25,86]. Kao jedan od načina za ublažavanje represije gena *cas* uzrokovane proteinom H-NS, koristi se tetramerni protein koji se veže za DNA, protein LeuO (engl. *transcriptional activator for leuABCD operon*), transkripcijski faktor iz obitelji LysR i poznati antagonist represora H-NS [86,94]. Osim aktivatora LeuO, *in vivo* istraživanja sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* se još oslanjaju ili na ekspresiju gena *cas* s plazmida u soju BL21-AI [2], na sojeve bakterije *E. coli* K-12 s deletiranim genom *hns* ili sojeve kod kojih su nativni promotori za gene *cas* zamijenjeni inducibilnim promotorima [10]. Protein LeuO je pleiotropni, pozitivni regulator raznih lokusa u Gram-negativnim bakterijama, te se preklapa s proteinom H-NS u koregulaciji mnogih gena (78 % u bakteriji *E. coli* i 40 % u bakteriji *Salmonella enterica*), kod kojih protein LeuO djeluje kao anti-represor [94,95].

2.4. Mehanizam djelovanja sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

Stjecanje imuniteta i obrana od stranih genetičkih elemenata putem sustava CRISPR-Cas može se podijeliti u tri faze: adaptacija, ekspresija i sazrijevanje, te interferencija (Slika 5). U prvoj fazi, adaptaciji, proteinski kompleks Cas1-Cas2 hvata kratke fragmente strane molekule DNA, zvane protorazmaknice (engl. *protospacers*), i ugrađuje te fragmente kao nove razmaknice u lokus CRISPR [11–13]. U svim sustavima CRISPR-Cas tipa I, pa tako i kod bakterije *E. coli*, razlikujemo dva različita oblika adaptacije, naivnu (engl. *naïve*) i pripremljenu (engl. *primed*) adaptaciju [13–15]. Naivna adaptacija se odvija prilikom ulaska u stanicu strane molekule DNA s kojom se stanica dotad nije susrela. To je proces ugradnje prve razmaknice u lokus CRISPR porijeklom iz te strane molekule DNA, a za njega je od proteina Cas potreban samo proteinski kompleks Cas1-Cas2 [11,13]. Pripremljena adaptacija se odvija kada u stanicu

ulazi strana molekula DNA za koju već postoji odgovarajuća razmaknica u lokusu CRISPR, što onda pospješuje ugradnju nove razmaknice porijeklom iz te iste molekule DNA [14,15,96]. Kako je u ovom obliku adaptacije potrebno i prepoznati stranu molekulu DNA prema već ugrađenoj razmaknici, za ovaj su proces, uz proteinski kompleks Cas1-Cas2, potrebni i protein Cas3 i kompleks Cascade [15,97].



Slika 5. Tri faze djelovanja adaptivnog imunskog sustava CRISPR-Cas tipa I-E u bakteriji *E. coli* K-12. Obojane strelice označavaju gene *cas*, slovom L je označena vodeća regija (engl. *leader*), dok su u lokusu CRISPR crnim rombovima označeni ponavljajući sljedovi, a obojanim kvadratima razmaknice. Slika prikazuje tri faze obrane od stranih genetičkih elemenata putem sustava CRISPR-Cas koje su detaljno opisane u tekstu. Preuzeto i prilagođeno iz [10].

Tijekom faze ekspresije i sazrijevanja, lokus CRISPR se prepisuje u dugu molekulu pre-CRISPR RNA (pre-crRNA), koja se dalje obrađuje pomoću podjedinice CasE (Cas6e) proteinskog kompleksa Cascade u kratke, zrele molekule CRISPR RNA (crRNA), od kojih svaka sadrži sekvencu jedne razmaknice [2,16,98,99]. Nakon procesiranja, zrele molekule crRNA ostaje čvrsto vezana za podjedinicu CasE (Cas6e), čime se potiče vezanje ostalih podjedinica duž molekule crRNA i formiranje kompleksa Cascade [16,18,100–103]. Kako bi pružio pravovremenu zaštitu od strane DNA, nukleoproteinski kompleks crRNA-Cascade mora biti u stanju učinkovito pronalaziti ciljeve (stranu DNA) među ogromnom količinom DNA u stanici, dok u isto vrijeme mora izbjegavati ciljanje komplementarnih sekvenci u bakterijskom

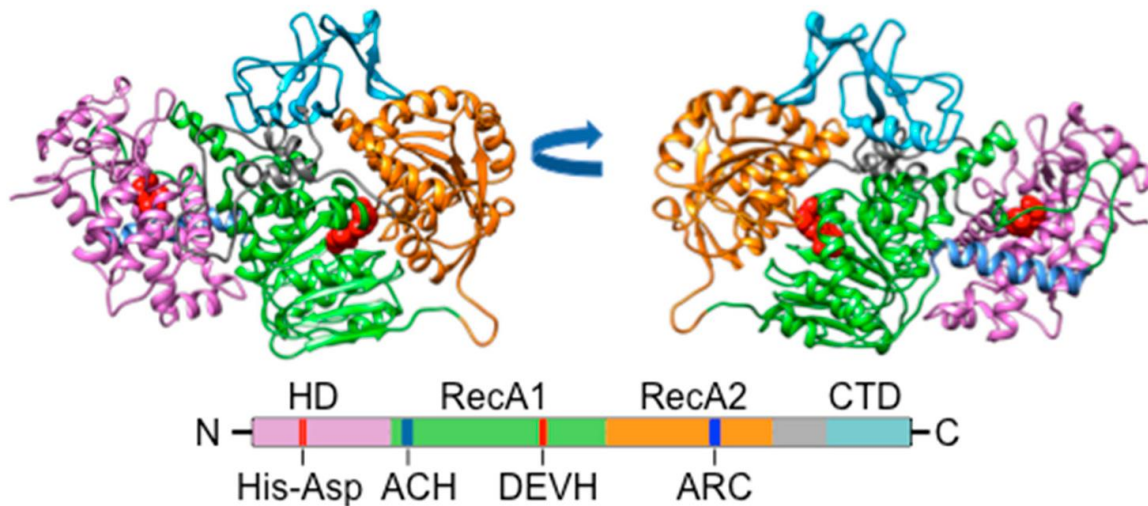
genomu (lokus CRISPR) [10]. Zbog toga kompleks crRNA-Cascade prvo pretražuje molekulu DNA za motive PAM (engl. *protospacer adjacent motif*), te tek nakon što podjedinica CasA (Cse1) prepozna motiv PAM, započinje odmatanje molekule DNA, što značajno smanjuje broj mjesta na koja će se kompleks vezati prilikom potrage za sekvencom komplementarnom razmaknici crRNA [19,104,105]. Motiv PAM također omogućuje razlikovanje strane molekule DNA od vlastite jer ga nema u lokusu CRISPR, pa se kompleks crRNA-Cascade ne može vezati na lanac DNA lokusa CRISPR koji je komplementaran razmaknici crRNA [104,106,107]. Iako kompleks Cascade iz bakterije *E. coli* ima široku specifičnost za motive PAM, ne može prepoznati motiv 5'-CCG-3' koji se nalazi na kraju svakog ponavljajućeg slijeda u lokusu CRISPR, što bakteriju štiti od autoimunosti tijekom faza interferencije i pripremljene adaptacije [108,109].

Nakon prepoznavanja motiva PAM, kompleks Cascade započinje odmatanje molekule DNA, te dolazi do komplementarnog sparivanja ciljnog lanca molekule DNA s molekulom crRNA, čime se nekomplementarni lanac molekule DNA istiskuje i stvara se struktura R-omče [19,20,110]. Struktura R-omče se stabilizira potpunim komplementarnim sparivanjem baza između crRNA i ciljnog lanca molekule DNA, što dovodi do konformacijskih promjena u kompleksu Cascade, koje služe kao signali za privlačenje nukleaze/helikaze Cas3 [110–113]. Nakon što se regrutira na ciljno mjesto, protein Cas3 procesivno odmata molekulu DNA svojom helikaznom aktivnošću, te na kraju cijepa tako dobivenu jednolančanu DNA (ssDNA) svojom nukleaznom aktivnošću [21–24,114,115].

2.5. Građa i uloga proteina Cas3

Protein Cas3 je bitna komponenta adaptivnog imunološkog sustava CRISPR-Cas i karakterističan je za sustave tipa I [4,9]. Prvi je put primijećen 2002. godine tijekom *in silico* analiza prokariotskih genoma koje su identificirale motive iz obitelji helikaza SF-2 (engl. *superfamily-2*) i povezale ih s drugim predloženim enzimima za procesiranje nukleinskih kiselina koji se nalaze uz lokus CRISPR [39,116]. Protein Cas3 se sastoji od HD-nukleazne domene spojene s dvije domene slične RecA (engl. *RecA-like*), karakteristične za obitelj helikaza SF-2, te pomoćne domene smještene na C-terminalnom kraju proteina (Slika 6) [21,24,117]. Za nukleaznu aktivnost proteina Cas3 nije potreban ATP, ali ovisi o prisutnosti iona magnezija, dok je helikazna aktivnost ovisna i o prisutnosti ATP-a i iona magnezija [21]. Kristalne strukture proteina Cas3 su pokazale da bi nukleazna aktivna mjesta mogla vezati i

atome željeza i mangana [22,23], dok je u istraživanjima *in vitro* nukleazna aktivnost potaknuta dodatkom iona mangana i kobalta, a inhibirana dodatkom iona željeza [20,118]. Također, pokazalo se da su ioni kobalta neophodni za ostvarivanje stabilne interakcije između proteina Cas3 i kompleksa Cascade [105,119].



Slika 6. Predviđena kristalna struktura proteina Cas3 iz bakterije *E. coli* u dvije orijentacije pomoću programa Phyre2 prema modelima riješenih struktura proteina Cas3 iz bakterija *Thermobaculum terrenum* (PDB: 4Q2C) i *Thermobifida fusca* (PDB: 4QQW, 4QQX i 4QQY). Ljubičastom bojom je prikazana N-terminalna HD-nukleazna domena, zelenom i narančastom bojom domene RecA1 i RecA2, a svijetloplavom bojom C-terminalna domena (CTD). Crvenim kuglicama su prikazani aktivno mjesto HD-nukleazne domene (His-Asp) i aminokiselinski ostaci domene RecA1 (DEVH) koji sudjeluju u hidrolizi ATP-a, dok su plavom bojom prikazani hidrofilna α -zavojnica (ACH) i regija bogata argininom (engl. *arginine rich channel*, ARC). Preuzeto i prilagođeno iz [117].

Da bi protein Cas3 mogao razgraditi stranu molekulu DNA u bakteriji *E. coli*, nužno je da se prvo proteinski kompleks Cascade veže na ciljnu molekulu DNA i da se zatim formira struktura R-omče [2,17,101]. Nakon stvaranja R-omče, podjedinica CasA ili Cse1 kompleksa Cascade privlači i veže protein Cas3, koji prvo cijepa istisnuti lanac molekule DNA u R-omči [24,104,120]. Prema jednom prijedlogu baziranom na krio-elektronskoj mikroskopiji, početno zarezivanje istisnutog lanca HD-nukleaznom aktivnošću dovodi do pozicioniranja ssDNA bliže domenama RecA, koje onda "hvataju" ssDNA i započinju translokaciju proteina Cas3 duž ssDNA ovisnu o ATP [20]. Mikroskopijom atomskih sila visoke brzine (engl. *high-speed atomic force microscopy*, hs-AFM) je pokazano da protein Cas3 ostaje čvrsto vezan za

kompleks Cascade te razgrađuje ciljnu molekulu dvolančane DNA (dsDNA) kombiniranim cijepanjem *cis* i *trans* [115]. Za stabilno "hvatanje" ssDNA mogla bi pomoći regija bogata argininom (engl. *arginine rich channel*, ARC), koja je evolucijski očuvana u brojnim vrstama [117]. Nakon cijepanja istisnutog lanca, protein Cas3 putuje duž molekule DNA u 3'→5' smjeru, prilikom čega odmata dvolančanu DNA helikaznom aktivnošću, dok nukleaznom aktivnošću kontinuirano cijepa ssDNA na kratke fragmente [21,105,121]. Nekoliko evolucijski očuvanih elemenata proteina Cas3, poput hidrofilne α -zavojnice (ACH) ili tirozinskih i triptofanskih bočnih ogranaka smještenih na granici RecA i HD-nukleazne domene, moglo bi biti uključeno u pozicioniranje ssDNA iz domena RecA u aktivno mjesto HD-nukleazne domene [117]. Analize pojedinačnih molekula (engl. *single-molecule experiments*) su pokazale da protein Cas3 može translocirati nekoliko tisuća nukleotida duž molekule DNA u odnosu na početno mjesto vezanja [105,122]. Velikoj raznolikosti u građi proteina Cas3 među sustavima tipa I doprinose brojni fuzijski oblici proteina Cas3 prisutni u drugim bakterijama. Primjerice, u bakterijama iz rodova *Pseudomonas* i *Yersinia* fuzijski protein Cas3 je spojen s adaptacijskim proteinom Cas2 [117]. S druge strane, u nekim su arhejama nukleazna i helikazna aktivnost proteina Cas3 podijeljene na dva proteina (Cas3'' i Cas3') koje kodiraju različiti geni [123,124], a u nekim cijanobakterijama je podjedinica Cas3'' spojena s proteinom Cas10d [125].

Kako je već spomenuto, u bakteriji *E. coli* gen *cas3* je djelomično negativno reguliran proteinom H-NS, pa je tako povećana transkripcija primijećena u stacionarnim stanicama Δhns [91]. Unatoč povećanoj transkripciji s promotora *Pcas3* u mutantu Δhns s uvedenim anti-lambda razmaknicama, stanice su otporne na infekciju fagom λvir samo na 30 °C, dok su ostale osjetljive na infekciju na 37 °C, osim ako je protein Cas3 bio prekomjerno eksprimiran s plazmida ili pomoću inducibilnih kromosomskih promotora [91]. Također, protein Cas3 može potaknuti nekontroliranu (engl. *runaway*) replikaciju plazmida ColE1 neovisno o prisutnosti ostalih komponenti sustava CRISPR-Cas, ali samo na 37 °C [126]. Ovi rezultati sugeriraju kako aktivnost proteina Cas3 ovisi o temperaturi okoliša, što ću pokušati razjasniti u svojoj doktorskoj disertaciji.

2.6. Ostali regulatori sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Escherichia coli*

U ovoj doktorskoj disertaciji sam detaljnije istražio utjecaj proteina StpA, proteaze Lon i šaperona HtpG na ekspresiju i aktivnost sustava CRISPR-Cas. Pretpostavio sam kako bi protein StpA mogao djelovati na razini transkripcije, proteaza Lon na razini post-translacije i

šaperon HtpG održavajući stabilne količine proteina Cas3. Kroz iduća tri poglavlja navedene su značajke ova tri proteina i njihova povezanost sa sustavom CRISPR-Cas.

2.6.1. Protein StpA

Protein StpA (engl. *suppressor of td phenotype A*) je slične veličine i aminokiselinskog sastava kao protein H-NS, s kojim se preklapa u regijama vezanja na molekulu DNA [27,127]. Protein StpA može djelovati kao transkripcijski represor, ali i kao RNA šaperon [128,129]. Proteini H-NS i StpA si međusobno inhibiraju transkripciju pa je gen *stpA* slabo eksprimiran u divljem tipu bakterije *E. coli*, dok mu je transkripcija inducirana samo u stanicama bez represora H-NS [27–29]. U takvom slučaju je pokazano da protein StpA može utišavati čak trećinu gena koje utišava i protein H-NS te tako djelomično zamjenjuje nedostatak proteina H-NS u stanici [29,130,131]. Inaktivacija oba gena *stpA* i *hns* negativno utječe na brzinu rasta i diobu stanica [29]. U bakterijama *E. coli* i *S. enterica*, proteini H-NS i StpA također inhibiraju ekspresiju aktivatora LeuO [28,132,133]. Ekspresija proteina StpA se može prirodno inducirati rastom u minimalnom mediju, koji ovisi o proteinu Lrp (engl. *leucine responsive regulatory protein*), te povećanjem osmolarnosti hranidbenog medija i temperature, dok mu nedostatak ugljika (engl. *carbon starvation*) utišava ekspresiju [134]. Zanimljivo je da protein Lrp utišava ekspresiju sustava CRISPR-Cas u bakteriji *Salmonella Typhi*, ali nema učinka u bakteriji *E. coli* [25,135]. U bakteriji *E. coli* prekomjerna ekspresija aktivatora LeuO s plazmida može ublažiti represiju transkripcije gena *cas* uzrokovanu proteinom H-NS, tako što protein LeuO sprječava vezanje proteina H-NS duž promotorske regije. Međutim, u stanicama s prekomjernom ekspresijom proteina LeuO, količina transkripata *casABCDE* bila je veća nego u mutantu Δhns , što je dovelo do prijedloga da protein StpA može utišati transkripciju gena *cas* u odsutnosti proteina H-NS [86]. Pokazalo se da *in vitro* protein StpA ima veći afinitet vezanja za promotor *Pcas8e* i vodeću regiju lokusa CRISPR od proteina H-NS, ali *in vivo* njegova inaktivacija nije inducirala transkripciju gena *cas*, suprotno inaktivaciji proteina H-NS [25,131]. Još jedna zanimljivost je što se u odsutnosti proteina H-NS, protein StpA brzo razgrađuje pomoću proteaze Lon [136].

2.6.2. Proteaza Lon

Proteaza Lon je ATP-ovisna proteaza koja je ime dobila po fenotipu mutanata u genu *lon* bakterije *E. coli* koji nakon UV zračenja stvaraju duge, nepodijeljene filamente [137–139].

Evolucijski je veoma očuvana u arhejama i bakterijama, te čak i u eukariotskim organizmima, gdje ju nalazimo u mitohondrijima i peroksisomima [138,140–142]. Proteaza Lon je oligomer građen od identičnih podjedinica, od kojih svaka ima i ATP-aznu i proteolitičku aktivnost [143]. Svaka podjedinica se sastoji od četiri domene, N-terminalne domene koja veže proteinske supstrate, ATP-azne domene zadužene za vezanje i hidrolizu ATP-a, senzorne domene koja razlikuje ATP i ADP, te C-terminalne domene u kojoj se nalazi proteolitičko aktivno mjesto [144]. Proteaza Lon spada u obitelj proteina AAA⁺ (engl. *ATPases Associated with a variety of cellular Activities*), odnosno ATP-aza povezanih sa staničnim aktivnostima, koje sudjeluju u raznolikim staničnim procesima, kao što su replikacija DNA, transkripcija i proteoliza [145,146]. Pokazala se neophodnom za održavanje stanične homeostaze posredovanjem u razgradnji abnormalnih i oštećenih polipeptida, ali i kratkoživućih regulatornih proteina [147,148]. Supstrati proteaze Lon u bakteriji *E. coli* uključuju regulator stanične diobe SulA, regulator sinteze bakterijske kapsule RcsA i regulatore SOS odgovora [149–151], dok u bakteriji *Caulobacter crescentus* proteaza Lon regulira metilaciju kromosomske DNA i staničnu diferencijaciju [152]. Također, proteaza Lon može u bakteriji *E. coli* regulirati transkripciju operona *bgl* i gena za rezistenciju na kisele uvjete (engl. *acid resistance genes*) razgradnjom njihovih transkripcijskih regulatora [153,154]. U patogenim bakterijama proteaza Lon može kontrolirati pravovremenu ekspresiju gena za virulenciju ili pomoći u rezistenciji na antibiotike [142,155]. U bakteriji *Pseudomonas aeruginosa*, proteaza Lon bi mogla započinjati regulatornu kaskadu razgradnjom RNA-vezujućeg proteina Hfq čime utječe na količine malih, nekodirajućih RNA koje reguliraju translaciju, a ovakav model povezao bi dva mehanizma post-transkripcijske regulacije gdje se proteolizom regulira translacija preko malih, regulatornih RNA [156]. Proteolitička i ATP-azna aktivnost proteaze Lon može se pojačati vezanjem ssDNA i dsDNA [157,158], a jedno objašnjenje kako pronalazi i cilja regulatorne proteine moglo bi biti što ima veći afinitet vezanja za promotorske regije DNA [159]. Osim proteolitičke uloge, proteaza Lon može djelovati i kao šaperon [160]. S obzirom na brojne regulatorne uloge u različitim bakterijama, uključujući bakteriju *E. coli*, pretpostavio sam kako bi proteaza Lon mogla imati ulogu i u regulaciji sustava CRISPR-Cas bilo razgradnjom proteina StpA [136], nekog drugog transkripcijskog regulatora ili komponente sustava CRISPR-Cas.

2.6.3. Šaperon HtpG

Protein HtpG (engl. *high-temperature protein G*) iz bakterije *E. coli* pripada obitelji evolucijski očuvanih, molekularnih šaperona Hsp90 ovisnih o ATP, a njegova se količina

povećava pri povišenoj temperaturi, infekciji fagom ili u prisustvu toksičnih tvari [161]. Proteini Hsp90 sudjeluju u smatanju i preoblikovanju proteina, a također djeluju i kao "holdaze", odnosno proteini koji se vežu na druge proteine i time sprečavaju njihovu agregaciju [162,163]. Proteini iz obitelji Hsp90 su dimeri, a svaka podjedinica se sastoji od tri domene, N-terminalne domene, središnje domene MD i C-terminalne domene [162]. N-terminalna domena veže ATP, i zajedno sa središnjom domenom MD sudjeluje u hidrolizi ATP-a, dok je u C-terminalnoj domeni dimerizacijska regija [164]. Za većinu interakcija sa supstratima zaduženi su bočni ogranci u središnjoj i C-terminalnoj domeni, međutim kod nekih specifičnih supstrata sudjeluje i N-terminalna domena [165]. Mutacije u N-terminalnoj domeni koje onemogućuju hidrolizu ATP-a mogu inaktivirati šaperonsku ulogu proteina HtpG [166], dok mutacije u središnjoj ili C-terminalnoj domeni mogu, neovisno o hidrolizi ATP-a, inaktivirati ulogu "holdaze", tako što onemogućuju interakciju i vezanje proteinskih supstrata [167]. Iako šaperon HtpG nije esencijalan u bakteriji *E. coli*, mutanti $\Delta htpG$ pokazuju sporiji rast i smanjenu vijabilnost pri visokim temperaturama [168,169], a bitan je i za stvaranje biofilma i pokretljivost [170,171]. U drugim bakterijama, šaperoni klase Hsp90 sudjeluju u brojnim procesima poput adaptacije na visoke i niske temperature, oksidativni stres ili fotosintezu u cijanobakteriji *Synechococcus elongatus*, sazrijevanja molekula tRNA u bakteriji *Shewanella oneidensis* ili održavanja virulencije u bakterijama *Salmonella typhimurium*, *Edwardsiella tarda* i *P. aeruginosa* [172–178]. Početna istraživanja interakcije između proteina HtpG i Cas3 u bakteriji *E. coli* otkrila su da mutant $\Delta htpG$ gubi suicidalnu aktivnost protiv profaga lambda i imunitet od lizogenizacije na 32 °C, koje inače pruža sustav CRISPR-Cas. Prekomjerna ekspresija bilo kojeg od ta dva proteina (HtpG ili Cas3) obnovila je aktivnost sustava CRISPR-Cas u zaštiti od lizogenizacije na 32 °C [179]. Osim toga, pokazalo se da šaperon HtpG povećava stabilnost i funkcionalne razine proteina Cas3, potrebne za učinkovitu interferenciju putem sustava CRISPR-Cas [179]. Također, prekomjerna ekspresija samo proteina Cas3 u dvostrukom mutantu $\Delta htpG \Delta hns$ s anti-lambda razmaknicama, omogućila je otpornost na infekciju fagom λvir na 30 °C, ali ne na 37 °C, gdje je otpornost na infekciju moguća samo prekomjernom ekspresijom proteina Cas3 u mutantima $\Delta hns htpG^+$ [91]. Ovi rezultati sugeriraju da je šaperon HtpG nužan za funkcioniranje proteina Cas3 na 37 °C, ali njegova točna uloga u ovom procesu trenutno nije poznata [91], a zanimljivo je da je ova potreba za proteinom HtpG u održavanju funkcionalne količine proteina Cas3 uočena samo u bakteriji *E. coli* [162].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Bakterijski sojevi i plazmidi

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

Oznaka soja	Relevantni genotip	Izvor ili metoda dobivanja soja
BL21-AI	<i>E. coli</i> B F ⁻ <i>ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻m_B⁻)</i> [<i>malB</i> ⁺] _{K-12} (λ ^S) <i>araB::T7RNAP-tetA</i>	Invitrogen
IIB1266	BL21-AI + λT3 + λc <i>cas3⁺cseI-cas6⁺</i> <i>ΔcasI::kan</i>	P1.IIB1040 x BL21-AI
NK001	F ⁻ , λ ⁻ , <i>rph-1 Δanticas::kan</i>	E. L. Bolt
BW25113 (IIB854)	F ⁻ <i>Δ(araD-araB)567 ΔlacZ4787(::rrnB-3) λ⁻,</i> <i>rph-1 Δ(rhaD-rhaB)568 hsdR514</i>	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 ili metoda dobivanja soja
BW39651 (IIB840)	+ λT3	K. Pougach
BW39121 (IIB855)	+ <i>Δhns::kan</i>	E. Semenova
JW0429-1 (MR023)	+ <i>Δlon725::kan</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
JW0462	+ <i>ΔhtpG::kan</i>	Q. Udi
JW2644-3	+ <i>ΔstpA750::kan</i>	<i>E. coli</i> Genetic Stock Center
EN004	+ <i>His6x-cas3::kan</i>	E. L. Bolt
BSN22 (IIB1023)	+ <i>Δhns::cat</i>	B. E. Uhlin
IIB969	+ λT3 <i>lacUV5-cas3 cat::araBp8-casA</i>	ref. [180]
IIB1039	+ λT3 + λc <i>ΔcasI::kan</i>	ref. [91]
IIB1040	+ λT3 + λc <i>ΔcasI::kan Δhns::cat</i>	ref. [91]
IIB1042	+ λT3 + λc <i>lacUV5-cas3 cat::araBp8-casA</i>	Prirodna ugradnja razmaknice u soj IIB969 nakon infekcije s λ _{vir} [181]
IIB1043	+ λT3 + λc <i>ΔcasI::FRT</i>	ref. [91]

Tablica 1. - nastavak

IIB1065	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ htpG::kan	P1.JW0462 x IIB1043
IIB1066	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ htpG::kan Δ hns::cat	P1.IIB1023 x IIB1065
IIB1088	+ His6x-cas3::kan araBp8-cas3	P1.EN004 x IIB854
IIB1092	+ Δ htpG::kan Δ hns::cat	P1.IIB1023 x JW0462
IIB1101	+ Δ htpG::FRT	Uklanjanje kazete za otpornost na kanamicin plazmidom pCP20 iz soja JW0462
IIB1102	+ Δ htpG::FRT Δ hns::cat	Uklanjanje kazete za otpornost na kanamicin plazmidom pCP20 iz soja IIB1092
IIB1103	+ His6x-cas3::kan araBp8-cas3 Δ hns::cat	P1.IIB1023 x IIB1088
IIB1104	+ His6x-cas3::kan araBp8-cas3 Δ htpG::FRT	P1.EN004 x IIB1101
IIB1105	+ His6x-cas3::kan araBp8-cas3 Δ htpG::FRT Δ hns::cat	P1.EN004 x IIB1102
IIB1297	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::cat	Uklanjanje kazete za otpornost na kanamicin plazmidom pCP20 iz soja IIB1040 [181]
IIB1301	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::cat Δ lon725::kan	P1. JW0429-1 x IIB1297
IIB1309	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::kan	P1.IIB855 x IIB1043
IIB1325	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::cat Δ stpA750::kan	P1.JW2644-3 x IIB1297
IIB1330	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ lon725::kan	P1. JW0429-1 x IIB1043
IIB1342	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::kan cas3-W406A	Zamjena gena cas3 u soju IIB1309 s alelom cas3 ^{W406A} plazmidom pKOV [182]
IIB1345	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::kan cas3-W230A	Zamjena gena cas3 u soju IIB1309 s alelom cas3 ^{W230A} plazmidom pKOV [182]
IIB1388	+ λ T3 Δ lon725::kan	P1.JW0429-1 x IIB840
IIB1389	+ λ T3 Δ lon725::kan Δ hns::cat	P1.IIB1023 x IIB1388
IIB1396	+ Δ lon725::kan Δ hns::cat	P1.IIB1023 x JW0429-1
IIB1434	+ λ T3 + λ c Δ casI::FRT Δ hns::cat Δ anticas::kan	P1.NK001 x IIB1297

Tablica 2. Popis plazmida korištenih u radu.

Naziv plazmida	Svrha	Izvor ili referenca
pBad-HisA	Prazni vektor, negativna kontrola za pAH4, pMR5, pMR9, pIIB37, pIIB39, pTK43 i pDM13; Amp ^r	Invitrogen
pMR18	Prazni vektor, negativna kontrola za pDM11 i pDM16; Str ^r	M. Radovčić
pBAD18	Prazni vektor, negativna kontrola za pBAD18-HtpG, pDM9 i pDM10; Amp ^r	L. M. Guzman
pACYC-Duet	Prazni vektor; Chl ^r	Novagen
pCP20	Uklanjanje kazete za otpornost na antibiotik kanamicin iz kromosoma bakterije <i>E. coli</i> , Amp ^R Chl ^R	ref. [183]
pKOV	Zamjena divljeg tipa gena <i>cas3</i> u kromosomu <i>E. coli</i> točkastim mutantima, Chl ^R	G. Church [184]
pKEDR13	Ekspresija proteina LeuO pod kontrolom promotora <i>lacI^q tac</i> u vektorskoj okosnici pACYC-neo; Km ^r	ref. [185]
pBAD18-HtpG	Ekspresija proteina HtpG pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBAD18; Amp ^r	Q. Udi
pAH4	Ekspresija proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	E. L. Bolt
pEB549	Ekspresija proteinskog kompleksa Cascade pod kontrolom promotora <i>T7lac</i> u vektorskoj okosnici pACYC-Duet; Chl ^r	E. L. Bolt
pTK43	Ekspresija gena R iz faga lambda pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA, izvor strane molekule DNA za pripremljenu adaptaciju; Amp ^r	T. Killelea
pMR5	Ekspresija proteina StpA pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	M. Radovčić

Tablica 2. - nastavak

pMR9	Ekspresija proteaze Lon pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	M. Radovčić
pW149A	Ekspresija točkastog mutanta W149A proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	E. L. Bolt
pW152A	Ekspresija točkastog mutanta W152A proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	E. L. Bolt
pIIB37	Ekspresija točkastog mutanta W230A proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	Ovaj rad
pIIB39	Ekspresija točkastog mutanta W406A proteina Cas3 pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	Ovaj rad
pDM9	Ekspresija točkastog mutanta E34A proteina HtpG pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBAD18; Amp ^r	Ovaj rad
pDM10	Ekspresija točkastog mutanta W467R proteina HtpG pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBAD18; Amp ^r	Ovaj rad
pDM11	Ekspresija proteina HtpG pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pMR18; Str ^r	Ovaj rad
pDM13	Ekspresija transkripta <i>antiCas</i> pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pBad-HisA; Amp ^r	Ovaj rad
pDM16	Ekspresija transkripta <i>antiCas</i> pod kontrolom promotora <i>araBAD</i> u vektorskoj okosnici pMR18; Str ^r	Ovaj rad

3.2. Početnice za PCR i RT-qPCR

Tablica 3. Popis početnica za lančanu reakciju polimerazom (PCR) i kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom (RT-qPCR) korištenih u radu.

Oznaka početnice	Sekvenca	Svrha
pBAD-F	5'-ATGCCATAGCATTTTTATCC-3'	Provjera rekombinantnih plazmida
pBAD-R	5'-GATTTAATCTGTATCAGG-3'	Provjera rekombinantnih plazmida
antiCas_NcoI_F	5'-GAGAGACCATGGTAGTTA TAATAA TTACCATG-3'	Kloniranje sekvence <i>antiCas</i> u pBad-HisA i pMR18
anticas-2	5'-GGGGTACCAGTATGAGGCGC TTGCACT TAAT-3'	Kloniranje sekvence <i>antiCas</i> u pBad-HisA i pMR18
htpG_pMR18_F	5'-GAGAGACCATGGGGATGAA AGGACAAGAAACTCG-3'	Kloniranje gena <i>htpG</i> u pMR18
htpG_pMR18_R	5'-GTGTGTGAATTCTCAGGAA ACCAGCTGG-3'	Kloniranje gena <i>htpG</i> u pMR18
HtpG_E34A_F	5'-TGCGTGCgctTATCTCTAACG-3'	Uvođenje točkaste mutacije E34A u protein HtpG
HtpG_E34A_R	5'-GGAAGATTTCTTTATTGGA ATAG-3'	Uvođenje točkaste mutacije E34A u protein HtpG
HtpG_W467R_F	5'-CGCATCGATGAGcggAGATG AACTATCTG-3'	Uvođenje točkaste mutacije W467R u protein HtpG
HtpG_W467R_R	5'-GTCGGAAAGCAGCAGAACT TC-3'	Uvođenje točkaste mutacije W467R u protein HtpG
W230A_Forward	5'-GCTTGCTGACgctTTAGGCTCC TGG-3'	Uvođenje točkaste mutacije W230A u protein Cas3
W230A_Reverse	5'-GAGCAAAAACCTGCTAAC-3'	Uvođenje točkaste mutacije W230A u protein Cas3
W406A_Forward	5'-GTGTTGTCAGcctTTGTCACAAA GCAATAAGAAAG-3'	Uvođenje točkaste mutacije W406A u protein Cas3
W406A_Reverse	5'-TGAACCCACGCTTCTTCT-3'	Uvođenje točkaste mutacije W406A u protein Cas3
FP-cas	5'-TAAAAAACAGGGAGGCTATT AGAATTAACCATGGGGGGTTC-3'	Ugradnja gena <i>cas3</i> s plazmida pIIB37 i pIIB39 u plazmid pKOV
RP-vector	5'-ATCACTGAGATCATGTTGTAG CGCCCTTATTTGGGATTTGCAGG GATG-3'	Ugradnja gena <i>cas3</i> s plazmida pIIB37 i pIIB39 u plazmid pKOV

Tablica 3. - nastavak

FP-promoter	5'-CTATTGCTGGTTTANTCGGTAC CCCAAGACATGTGTATATCACTG -3'	Ugradnja gena <i>cas3</i> s plazmida pIIB37 i pIIB39 u plazmid pKOV
RP-promoter	5'-GAACCCCCCATGGTTAATTCT AATAGCCTCCCTGTTTTTTTAG-3'	Ugradnja gena <i>cas3</i> s plazmida pIIB37 i pIIB39 u plazmid pKOV
pKOV-F	5'-GCAAATTCGACCCGGTCGTC-3'	Provjera uspješnosti ugradnje gena <i>cas3</i> u plazmid pKOV
pKOV-R	5'-GTTCTGACCGATAACATCAC AGA-3'	Provjera uspješnosti ugradnje gena <i>cas3</i> u plazmid pKOV
Up <i>cas3</i>	5'-CGATATTTATGAGCAGCATC-3'	Umnažanje kromosomskog gena <i>cas3</i> za sekvenciranje
Down <i>cas3</i>	5'-GATGTACATTGTGCACCTTC-3'	Umnažanje kromosomskog gena <i>cas3</i> za sekvenciranje
Cas3_700	5'-GGTTAGGCTCCTGGACTAC AAC-3'	Sekvenciranje gena <i>cas3</i>
qCas3_NTD_F	5'-GGAGTTGAGTGGACTTGT ATC-3'	Umnažanje sredine gena <i>cas3</i> za RT-qPCR
qCas3_NTD_R	5'-CTGGAAGAGCATCAACTA ACA-3'	Umnažanje sredine gena <i>cas3</i> za RT-qPCR
qCasA_F_2	5'-TCCTCACATTACCTCGTCTT-3'	Umnažanje gena <i>casA</i> za RT-qPCR
qCasA_R_2	5'-GAATAGACCACGGACAA ACC-3'	Umnažanje gena <i>casA</i> za RT-qPCR
qCas3-F	5'-ATCGCGTCAATGTACCCTTC-3'	Umnažanje gena <i>cas3</i> za RT-qPCR
qCas3-R	5'-TCCAGCCAAAGTAACCCATC-3'	Umnažanje gena <i>cas3</i> za RT-qPCR
qgroES-F	5'-CTGGATCGTCAAGCGTA AAG-3'	Umnažanje gena <i>groES</i> za RT- qPCR
qgroES-R	5'-CAAGGATACGGCCATTGC-3'	Umnažanje gena <i>groES</i> za RT- qPCR
CRISPR-R	5'-GAGATGCAGGCCATCGGA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR
CRISPR-Sp4	5'-GCGACCGCTCAGAAATTCC AGACCCGATCCAAA-3'	Provjera ugradnje nove razmaknice u lokus CRISPR

3.3. Hranjivi mediji

Tekući LB medij za uzgoj bakterijskih stanica:

- 10 g/L BD Bacto Tryptone
- 5 g/L BD Bacto Yeast extract
- 10 g/L NaCl
- Smjesu otopiti u dH₂O, podesiti pH na 7,0 i autoklavirati.

Dodaci u tekući LB medij po potrebi:

- BD Bacto Agar → 15 g/L za čvrsti medij, i 6 g/L za meki medij
- 1 mM IPTG
- 0,2 % (w/v) L-arabinoza
- 5 % (w/v) saharoza
- 0,2 % (w/v) maltoza
- Antibiotici za selekciju (koncentracija u hranjivom mediju):
 - Ampicilin → 100 µg/mL (matična otopina u vodi)
 - Kanamicin → 40 µg/mL (matična otopina u vodi)
 - Kloramfenikol → 15 µg/mL (matična otopina u 96 % EtOH)
 - Streptomycin → 50 µg/mL (matična otopina u vodi)
 - Tetraciklin → 10 µg/mL (matična otopina u 70 % EtOH)

3.4. Pufferi

MC puffer za transdukciju:

- 5 mM CaCl₂
- 100 mM MgSO₄
- Sterilna dH₂O

50 x TAE puffer za elektroforezu u agaroznom gelu:

- 2M Tris baza
- 5,71 % (v/v) octena kiselina
- 50 mM EDTA pH 8,0
- dH₂O

Fosfatni pufer za decimalna razrjeđenja bakterija:

- 33 mM Na₂HPO₄ x 2H₂O
- 33 mM KH₂PO₄
- Smjesu otopiti u dH₂O, podesiti pH na 7,0 s otopinom NaOH i autoklavirati.

Pufer za lizu bakterijskih stanica:

- 25 mM Tris-HCl, pH 8,0
- 300 mM NaCl
- 1 mM fenilmetilsulfonil fluorid (engl. *phenylmethylsulfonyl fluoride*, PMSF)
- dH₂O

Pufer za denaturaciju (*Laemmli sample buffer*):

- 187,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
- 6 % (w/v) SDS
- 5 % (v/v) β-merkaptotanol
- 20 % (v/v) glicerol
- 0,1 % (v/v) bromfenol plava (engl. *Bromphenol blue*, BFB)
- dH₂O

10 x elektrodni pufer za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu:

- 250 mM Tris
- 1,92 M Glicin
- 10 % (w/v) SDS
- Smjesu otopiti u dH₂O i podesiti pH na 8,3.

Otopina za bojanje poliakrilamidnih gelova:

- 0,1 % (w/v) *Coomasie Brilliant Blue* (CBB) R-250
- 45 % (v/v) etanol
- 10 % (v/v) Ledena octena kiselina
- dH₂O

Otopina za odbojavanje poliakrilamidnih gelova:

- 10 % (v/v) octena kiselina
- 20 % (v/v) metanol

Bradford matična otopina:

- 0,01 % (w/v) CBB G-250
- 31,35 % (v/v) etanol
- 58,6 % (v/v) fosforna kiselina (H₃PO₄)

Bradford radna otopina:

- 6 % (v/v) Bradford matična otopina
- 2,85 % (v/v) etanol
- 5,28 % (v/v) H₃PO₄

Pufer za prijenos:

- 29 mM Tris
- 192 mM glicin
- 10 % (v/v) metanol
- Nadopuniti s dH₂O i podesiti pH na 8,3.

1 x puferirana otopina fosfatnih soli (engl. *phosphate buffer saline*, PBS):

- 10 mM Na₂HPO₄
- 1,7 mM KH₂PO₄
- 2,7 mM KCl
- 130 mM NaCl
- Smjesu otopiti u dH₂O i podesiti pH na 7,4.

Pufer za blokiranje:

- 5 % (w/v) bezmasno mlijeko u prahu
- Otopiti u 1 x PBS puferu.

Pufer za ispiranje:

- 0,05 % (v/v) Tween 20
- 1 x PBS pufer

3.5. Metode rada s bakterijama

3.5.1. Uzgoj i pohrana bakterijskih sojeva

Bakterijski sojevi se čuvaju na temperaturi od $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ili $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u tekućem LB (*Lysogeny broth*) mediju kojem je dodano 50 % glicerola [186]. Na ovaj način se bakterijski sojevi mogu čuvati više godina bez gubitka vijabilnosti. Za eksperimentalni rad, ploče s bakterijskim kolonijama naraslim na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ preko noći se kratkoročno čuvaju na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Za svaki pokus uzima se pojedinačna kolonija koja se dodaje u tekući LB medij i uzgaja oko 18 h na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ (stacionarna kultura bakterija) u inkubatoru tresilici G25 (New Brunswick Scientific Co. Inc.) pri 300 rpm. Kad se koriste bakterije u eksponencijalnoj fazi rasta, stacionarna kultura se razrijedi oko 50 X u tekućem LB mediju i uzgaja do $\text{OD}_{600} = 0,5 - 0,6$ što se odredi pomoću spektrofotometrijskog uređaja Ultrospec 10 Classic (Amersham Biosciences). U tekući ili kruti LB medij se po potrebi dodaju antibiotici i induktori u finalnim koncentracijama navedenim u poglavlju 3.3.

Sve pokuse *in vivo* kojima sam istraživao mehanizme regulacije sustava CRISPR-Cas, radio sam sa sojevima bakterije *E. coli* K-12 BW25113 (Keio kolekcija sojeva bakterije *E. coli*) i *E. coli* BL21-AI (Invitrogen). Za konstrukciju novih bakterijskih sojeva koristio sam metodu transdukcije pomoću bakteriofaga P1 *vir* (laboratorijska kolekcija prof. Ivančić Baće) kojim sam unosio željene mutacije obilježene kazetom za otpornost na neki antibiotik, koja je ujedno služila za selekciju mutanata.

3.5.2. Konstrukcija sojeva P1 transdukcijom

Lizate faga P1 *vir* sam prethodno pripremio na odgovarajućim donorskim sojevima. Donorske stanice sam uzgajao u 10 mL tekućeg LB medija do rane eksponencijalne faze $\text{OD}_{600} \approx 0,3$. Dodao sam 60 μL 1 M CaCl_2 i 50 μL matične otopine bakteriofaga P1 *vir*, te uzorak inkubirao dok se ne primijeti liza bakterijskih stanica (oko 3 do 5 sati). Zatim sam dodao 500 μL kloroforma i lagano ga promiješao 5 min da se u potpunosti liziraju stanice donorskog soja. Ostatke staničnog lizata sam zatim centrifugirao u centrifugi SIGMA 3K30 (Sigma-Aldrich), 12 min na maksimalnoj brzini ($> 12\ 000\ \text{rcf}$) uz hlađenje ($+4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Virusne čestice prisutne u supernatantu sam odvojio od liziranih bakterijskih stanica zaostalih u talogu dekantiranjem u sterilnu epruvetu. Novoj matičnoj otopini bakteriofaga P1 *vir* sam dodao kloroform u količini koja odgovara 1/100 ukupnog volumena i pohranio ga na $+4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Prvo sam uzgajao svježiju prekonoćnu kulturu recipijentnog soja u 3 mL tekućeg LB medija do stacionarne faze rasta na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Istaložio sam po 1,5 mL stanica centrifugiranjem 2,5

minute pri 10 000 rcf u centrifugi 5415D (Eppendorf), supernatant odlio, a talog resuspendirao u 200 μ L MC pufera. Za infekciju sam stanicama dodao pripremljeni lizat bakteriofaga P1 *vir* u dvije koncentracije (100 ili 200 μ L) i smjesu inkubirao 30 minuta na 37 °C bez protresanja. Nakon toga sam dodao 200 μ L 1 M natrij citrata kako bih spriječio novu infekciju i posljedično lizu bakterijskih stanica, te sve prebacio u epruvetu s 3 mL mekog LB medija. Nakon miješanja, smjesu mekog LB medija i stanica prelio sam na krutu selektivnu LB podlogu i pustio da se skrutne. Podloge sam inkubirao 24 do 48 sati na 37 °C. Narasle transduktante sam pročistio na novu krutu LB podlogu s istim antibiotikom, kako bih bakterijske stanice pročistio od neadsorbiranih bakteriofaga i potvrdio otpornost na antibiotik.

3.5.3. Konstrukcija sojeva uklanjanjem antibiotske kazete

Bakterijski sojevi iz kolekcije Keio imaju uklonjene gene zamijenjene kanamicinskom kazetom gdje je gen za otpornost na kanamicin omeđen mjestima FRT (engl. *flippase recognition target*). Kako bih mogao u isti soj ubaciti drugu mutaciju obilježenu otpornošću na kanamicin, morao sam prvo ukloniti prvu kanamicinsku kazetu, odnosno napraviti neobilježenog (engl. *markerless*) mutanta. Za to služi plazmid pCP20 koji eksprimira enzim FLP-rekombinazu koja prepoznaje mjesta FRT, i mjesno-specifičnom rekombinacijom izrezuje DNA između njih [183]. Plazmid pCP20 nosi gen za otpornost na ampicilin, ima temperaturno osjetljivo izvorište replikacije (engl. *origin of replication, ori*) i ne može se replicirati na 37 °C. Prvo sam unio plazmid pCP20 u željeni soj kemijskom transformacijom (vidi poglavlje 3.5.6) uz par izmjena. Stanice sam nakon temperaturnog šoka oporavljao na 30 °C te inkubirao dva dana na 30 °C na krutim LB podlogama s ampicilinom. Gubitak plazmida sam potaknuo uzgajanjem transformanata u tekućem LB mediju bez antibiotika preko noći na 37 °C uz trešnju. Mali uzorak sam sterilnom ezom nanio na krutu LB podlogu bez antibiotika da bih dobio pojedinačne kolonije. Gubitak plazmida i kanamicinske kazete sam provjerio za dvadesetak pojedinačnih kolonija metodom *replica plating* nanoseći ih na podlogu s dodatkom ampicilina i podlogu s dodatkom kanamicina. One kolonije koje nisu narasle ni na podlozi s ampicilinom ni kanamicinom (osjetljive na oba antibiotika) sam sačuvao kao nove mutante.

3.5.4. Konstrukcija sojeva zamjenom gena

Zamjenu divljeg tipa gena *cas3* s točkastim alelima (engl. *gene replacement*) napravio sam korištenjem plazmida pKOV koji ima temperaturno osjetljivo ishodište replikacije (*ori*), gen za otpornost na antibiotik kloramfenikol i gen *sacB* [184]. Prvo sam napravio željeni točkasti mutant u početnom plazmidu (pAH4, Tablica 2) ciljanom mutagenезom (poglavlje

3.6.5.) i zatim mutirani gen ugradio u plazmid pKOV. U tu svrhu korištene su početnice navedene u Tablici 3 i komercijalni komplet NEBuilder HiFi DNA Assembly kit (New England BioLabs) prema uputama proizvođača. Dobivena povezana smjesa fragmenata DNA transformirana je u kemijski kompetentne stanice NEB 5- α iz komercijalnog kompleta prema uputama proizvođača i stanice su uzgajane na 30 °C kroz dva dana. Pojedinačne transformante sam testirao metodom lančane reakcije polimerazom (engl. *polymerase chain reaction*, PCR) koristeći početnice navedene u Tablici 3 (vidi poglavlje 3.6.3.) kako bih pronašao onaj vektor koji sadrži insert. Takav plazmid sam izolirao pomoću komercijalnog kompleta Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) prema uputama proizvođača te ga elektroporacijom (vidi poglavlje 3.5.7.) unio u soj bakterije *E. coli* s dvije anti-lambda razmaknice i deletiranim genom *hns* (soj IIB1309, Tablica 1). Nakon oporavka, transformante sam prvo inkubirao preko noći na sobnoj temperaturi, pa tek onda nasadio na selektivne krute LB podloge i uzgajao na 42 °C preko noći. Pri povišenoj temperaturi plazmid pKOV se ne može replicirati, i samo one bakterije koje su ugradile plazmid u genom mogu preživjeti u prisutnosti antibiotika. Idući dan sam nekoliko naraslih pojedinačnih kolonija nacijepio na krutu LB podlogu s 5 % saharoze bez antibiotika kako bih potaknuo izrezivanje plazmida iz genoma. Podloge sam inkubirao preko noći na 37 °C. Naime, stanice koje zadrže plazmid pKOV ne mogu preživjeti na podlozi sa saharozom jer enzim kodiran genom *sacB* pretvara saharozu u toksični metabolit. Dobivene pojedinačne bakterijske kolonije potom sam testirao na gubitak otpornosti na antibiotik kloramfenikol (poglavlje 3.5.5.) i infekciju fagom λ vir (poglavlje 3.5.8.). Onu koloniju koja je bila osjetljiva na kloramfenikol i infekciju fagom λ vir na 30 °C sam sačuvao i potvrdio mutaciju sekvenciranjem u servisu Macrogen (Nizozemska).

3.5.5. Provjera genotipa kromosomskih mutanata bakterije *E. coli*

Novim bakterijskim mutantima provjerio sam genotip testom razmaza (engl. *streak test*). U tu svrhu sam prvo nasadio pojedinačne kolonije u 3 mL tekućeg LB medija s dodatkom odgovarajućeg antibiotika i inkubirao preko noći na 37 °C uz trešnju. Pripremio sam nekoliko krutih podloga s dodatkom jednog antibiotika i bez antibiotika za kontrolu. Na poleđini svake podloge nacrtao sam polja koja sam označio imenima sojeva koji će se testirati. Na svaku podlogu sam nakapao nekoliko kapi prekonoćne bakterijske kulture i razmazao sterilnom ezom unutar označenog polja. Pustio sam podloge da se posuše i inkubirao na 37 °C preko noći. Genotip sojeva je bio ispravan ako su bakterijske stanice nakon inkubacije narasle samo na podlozi bez antibiotika i na podlozi s antibiotikom koji je odgovarao ubačenoj antibiotskoj kazeti. Testom razmaza sam dodatno provjerio genotip sojeva koristeći podloge bez antibiotika

koje bih ozračio ultraljubičastim (UV) svjetlom (obično u dozama od 30 J/m² i 60 J/m²). Ultraljubičasto zračenje uzrokuje oštećenja u molekuli DNA, pa je ovo dobra dodatna kontrola kako bih provjerio da nije došlo do mutacija u genima uključenim u procese homologne rekombinacije i popravka DNA.

Točkaste mutante sam provjerio na način da sam prvo gen *cas3* umnožio metodom PCR koristeći početnice navedene u Tablici 3 i potvrdio prisutnost mutacije sekvenciranjem u servisu Macrogen (Nizozemska).

Sojevima s ispravnim genotipom sam dao broj i pohranio ih na -80 °C.

3.5.6. Kemijska transformacija bakterijskih sojeva

Bakterijske stanice uzgojio sam do logaritamske faze rasta ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$) dodavanjem 40 μ L prekonocne kulture u 3 mL svježeg tekućeg LB medija i inkubirao u tresilici na 37 °C. Istaložio sam 1,5 mL stanica centrifugiranjem 2,5 minute pri 10 000 rcf na sobnoj temperaturi u centrifugi 5415D (Eppendorf). Uklonio sam supernatant, a talog sam resuspendirao u 200 μ L hladne otopine 50 mM CaCl₂. Stanice sam ponovo istaložio i talog resuspendirao u 50 μ L hladne otopine 50 mM CaCl₂ i inkubirao na ledu 5 minuta. Potom sam dodao 1 μ L plazmidne DNA i inkubirao još 10 minuta. Smjesu sam zatim izložio temperaturnom šoku u trajanju od 30 sekundi na 42 °C u termobloku Thermomixer comfort (Eppendorf), i 2 minute na ledu. Dodao sam 500 μ L tekućeg LB medija i inkubirao stanice sat vremena na 37 °C uz trešnju. Nakon oporavka stanice sam nasadio na krute selektivne LB podloge, koje sam inkubirao preko noći u inkubatoru na 37 °C.

3.5.7. Priprema elektrokompetentnih stanica i elektroporacija

Elektrokompetentne stanice sam pripremio uzgajanjem 20 mL bakterijske kulture do srednje logaritamske faze rasta ($OD_{600} \approx 0.6$). Stanice sam istaložio centrifugiranjem 6 minuta pri 4 000 rcf na 4 °C. Supernatant sam bacio, a talog stanica resuspendirao u 10 mL sterilnog, hladnog 10 %-tnog glicerola. Postupak taloženja i ispiranja stanica sam ponovio u 5 mL i 3 mL hladnog 10 %-tnog glicerola. Nakon zadnjeg taloženja, stanice sam otopio u 1 mL hladnog 10 %-tnog glicerola i alikvotirao u uzorke po 50 μ L. Alikvotu stanica sam zatim dodao 24 ng plazmida pTK43 u kivetu za elektroporaciju koja je prethodno ohlađena držanjem na ledu. Ostatak alikvota sam pohranio na -80 °C za ponavljanje pokusa. Kivetu sam smjestio u nosač elektroporatora MicroPulser (Bio-Rad), te izložio udaru struje napona 1,8 kV koji stvara pore u membrani bakterijskih stanica. Nakon elektroporacije, stanicama sam dodao 450 μ L tekućeg

LB medija i oporavljaio ih 1 sat na 37 °C uz trešnju pri 300 rpm. Nakon oporavka, pripremio sam seriju decimalnih razrjeđenja od 10⁻⁴ do 10⁰ u fosfatnom puferu i nakapao 10 mikrolitarske alikvote u duplikatu na krute LB podloge s dodatkom ampicilina. Podloge sam inkubirao preko noći na 30 °C i 37 °C. Usporedbom broja naraslih kolonija u odnosu na divlji tip odredio sam efikasnost transformacije ovisno o genotipu stanica. Broj transformanata odredio sam prema sljedećoj jednadžbi:

$$CFU/mL = \text{broj kolonija} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 100$$

3.5.8. Određivanje efikasnosti infekcije fagom λvir

Genetička analiza otpornosti bakterijskih sojeva na infekciju fagom λvir bila je ključni pokus kojim sam provjeravao uloge mogućih regulatora i točkastih mutacija na aktivnost sustava CRISPR-Cas. U tu svrhu sam uzgajao bakterijske stanice do stacionarne faze rasta u 3 mL tekućeg LB medija uz dodatak odgovarajućih antibiotika i induktora (konačna koncentracija 0,2 % L-arabinoza ili 1 mM IPTG) u tresilici na 37 °C. Idući dan sam u 3 mL mekog LB medija dodao iste induktore i 200 μ L prekonocne kulture, te smjesu izlio na krute LB podloge kako bih dobio bakterijsku livadu. Podloge su također sadržavale odgovarajuće induktore i antibiotike. Napravio sam decimalna razrjeđenja faga λvir (laboratorijska kolekcija prof. Ivančić Baće) u otopini 10 mM MgSO₄ u rasponu koncentracija od 10⁻³ do 10⁻⁶. Na skrtnuti meki agar nanio sam 10 mikrolitarske alikvote svakog decimalnog razrjeđenja virusa u dvije replike. Nakon što su se kapljice upile, podloge sam inkubirao preko noći na 30 °C i 37 °C. Idući dan sam prebrojao nastale plakove (mjesto liziranih bakterija) i odredio efikasnost infekcije računanjem broja nastalih virusnih čestica (engl. *plaque forming units*, PFU) faga λvir prema sljedećoj jednadžbi:

$$PFU/mL = \text{broj plakova} \times \text{faktor razrjeđenja} \times 100$$

3.6. Metode rada s DNA

3.6.1. Priprema plazmida

Plazmide sam koristio s ciljem istraživanja utjecaja prekomjerno eksprimiranih proteina. Neke plazmide sam dobio, a konstruirao sam plazmide pIIB37, pIIB39, pDM9, pDM10, pDM11, pDM13 i pDM16 (Tablica 2).

3.6.2. Lančana reakcija polimerazom (PCR)

Za konstrukciju rekombinantnih vektora pDM11 (*htpG*), pDM13 i pDM16 (oba *antiCas*) prvo sam metodom PCR umnožio ciljne gene s kromosoma bakterije *E. coli* koristeći početnice specifične za svaki gen (Tablica 3). Koristio sam DNA polimerazu visoke točnosti s lektorirajućom aktivnosti Q5 High-Fidelity DNA Polymerase (New England BioLabs), a reakcijsku smjesu sam pripremio prema uputama proizvođača. Koristio sam PCR programe prilagođene svakom genu navedene u Tablici 4.

Tablica 4. PCR programi za umnažanje željenih gena iz kromosoma bakterije *E. coli*. Denaturacija, sparivanje početnica i elongacija su provedeni u 30 ciklusa.

PCR korak	<i>htpG</i> (1875 nt)	<i>antiCas</i> (373 nt)
Početna denaturacija	98 °C / 30 s	98 °C / 30 s
Denaturacija	98 °C / 10 s	98 °C / 10 s
Sparivanje početnica	55 °C / 30 s	50 °C / 30 s
Elongacija	72 °C / 2 min	72 °C / 30 s
Završna elongacija	72 °C / 2 min	72 °C / 2 min

3.6.3. Agarozna gel elektroforeza

Nakon PCR reakcije, uzorke sam provjerio elektroforezom u agaroznom gelu. Pripremio sam 1 % agarozni gel u 15 mL 1 x TAE pufera, te sam u njega dodao 1,1 µL interkalirajuće boje SYBR Safe DNA Gel Stain (Invitrogen) radi kasnije vizualizacije vrpca na transiluminatoru. Pomiješao sam 4 µL PCR uzorka s 1 µL boje 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) i nanio na gel, zajedno s 2 µL markera veličina GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezu sam proveo u sustavu za elektroforezu OneRun Electrophoresis Cell (Embi Tec) u 1 x TAE puferu u trajanju od 15 minuta pri naponu od 100 V. Fragmente DNA sam vizualizirao na transiluminatoru i analizirao programom Kodak 1D Image Analysis Software v. 3.6.0.

3.6.4. Restriksijska razgradnja, ligacija molekula DNA i provjera ugradnje

Umnoženi fragment DNA sam pročistio koristeći komercijalni komplet GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific). Početnice su na krajevima sadržavale nukleotidne sljedove koje prepoznaju specifične restriksijske endonukleaze, te sam stoga istim restriksijskim enzimima pocijepao dobivene PCR produkte i vektore u koje sam te produkte htio ugraditi. Kombinacije restriksijskih enzima za svaki klonirani gen navedene su u Tablici

5, a sastav restrikcijskih smjesa sam priredio prema uputama proizvođača za enzime FastDigest Restriction Enzymes (Thermo Fisher Scientific), koji su omogućili brzu i istovremenu digestiju s oba enzima (engl. *double digest*). Uzorke sam inkubirao 15 minuta na 37 °C. Pocijepane uzorke vektora sam zatim dodatno provjerio elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, kako bih bio siguran da je restrikcija vektora bila uspješna. Na gel sam nanio 4 µL restrikcijske reakcije pomiješane s 1 µL boje 6X DNA Loading Dye (Thermo Fisher Scientific), zajedno s 2 µL markera veličina GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezu sam proveo kako je opisano u prethodnom odlomku. Cijepanje vektora je bilo potpuno i uspješno ako je na gelu prisutna samo jedna vrpca na veličini koja odgovara molekularnoj masi vektora. Nakon toga sam sve uzorke ponovo pročistio koristeći komercijalni komplet GeneJET PCR Purification Kit (Thermo Fisher Scientific) i odredio koncentracije DNA inserta i vektora spektrofotometrijski na uređaju NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare) mjerenjem apsorbanacije u 2 µl uzorka pri valnoj duljini od 260 nm.

Tablica 5. Pregled restrikcijskih enzima i vektora korištenih za pripravu rekombinantnih plazmida.

Rekombinantni plazmid	Veličina (kb)	Uklonirani gen	Restrikcijski enzimi	Vektor
pDM11	5,5	<i>htpG</i>	<i>EcoRI</i> i <i>NcoI</i>	pMR18
pDM13	4,5	<i>antiCas</i>	<i>NcoI</i> i <i>KpnI</i>	pBad-HisA
pDM16	4	<i>antiCas</i>	<i>NcoI</i> i <i>KpnI</i>	pMR18

Pročišćene PCR fragmente (inserte) povezo sam s pripadajućim vektorima djelovanjem enzima ligaze T4-DNA-Ligase (Thermo Fisher Scientific). Reakcijsku smjesu od 20 µL pripremio sam prema uputama proizvođača, u molarnom omjeru vektor:insert od 1:3 do 1:5, kako bih povećao efikasnost dobivanja željenog konstrukta. Uzorke sam inkubirao 20 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije, transformirao sam 50 µL komercijalnih, kemijski kompetentnih stanica NEB 5- α (New England BioLabs) s 2 µL ligacijske smjese prema uputama proizvođača. Bakterijskim stanicama sam dodao 1 ml SOC medija (New England BioLabs) te ih inkubirao sat vremena u tresilici pri 250 rpm na 37 °C oko 60 minuta. Stanice sam potom nasadio na krutu LB podlogu uz dodatak antibiotika ampicilina ili streptomycina, ovisno o plazmidnom vektoru. Podloge sam inkubirao preko noći na 37 °C.

Idući dan sam metodom PCR na bakterijskim kolonijama (engl. *colony PCR*) provjerio koje su kolonije primile plazmid sa željenim insertom. Prvo sam lizirao stanice (u maloj epruveti za PCR dodao sam 50 µL sterilne dH₂O i sterilnom čačalicom resuspendirao malo

uzorka pojedinačne kolonije), te ih u uređaju za PCR inkubirao 3 minute na 98 °C. Lizom oslobođena DNA bila je kalup za PCR reakciju koju sam pripremio prema uputama proizvođača za Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Za provjeru svakog rekombinantnog plazmida koristio sam par početnica pBAD-F/pBAD-R jer se vežu u oba ishodišna vektora, pBad-HisA i pMR18. Koristio sam PCR programe navedene u Tablici 6, ovisno o veličini umnažanog gena. Nakon PCR reakcije, uzorke sam provjerio elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, kako je opisano u poglavlju 3.6.3.

Tablica 6. PCR programi za provjeru transformanata metodom PCR na bakterijskim kolonijama. Denaturacija, sparivanje početnica i elongacija su provedeni u 30 ciklusa.

PCR korak	pDM11	pDM13	pDM16
Početa denaturacija	98 °C / 30 s	98 °C / 30 s	98 °C / 30 s
Denaturacija	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s	98 °C / 5 s
Sparivanje početnica	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s	55 °C / 5 s
Elongacija	72 °C / 30 s	72 °C / 15 s	72 °C / 15 s
Završna elongacija	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min	72 °C / 1 min

One kolonije u kojima sam potvrdio prisutnost rekombinantnog plazmida, uzgajao sam u 3 mL tekućeg LB medija preko noći na 37 °C. Iz prekonoćnih kultura izolirao sam plazmidnu DNA pomoću komercijalnog kompleta Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) prema uputama proizvođača. Koncentraciju DNA plazmida sam izmjerio spektrofotometrijski na uređaju NanoVue Plus Spectrophotometer (GE Healthcare), kako je opisano ranije u ovom poglavlju.

Rekombinantne plazmide sam dodatno provjerio cijepanjem izoliranih plazmida jednom od restrikcijskih endonukleaza korištenih tijekom kloniranja (Tablica 5) i provjerom veličine lineariziranog plazmida elektroforezom u 1 % agaroznom gelu kao što je već opisano. Rekombinantne plazmide koji su zadovoljili i ovu provjeru, poslao sam na sekvenciranje u servis Macrogen (Nizozemska).

3.6.5. Ciljana mutageneza plazmidne DNA

Ciljana mutageneza (engl. *site-directed mutagenesis*) korištena je za uvođenje točkastih mutacija u plazmidne vektore s ciljem zamjene aminokiselina u aktivnom mjestu enzima. Plazmidne vektore pIIB37, pIIB39, pDM9 i pDM10 konstruirao sam koristeći ovu metodu. Za ciljanu mutagenezu sam koristio mutagene početnice koje sadrže željenu zamjenu u nukleotidnom slijedu, a navedene su u Tablici 3. Koristeći komercijalni komplet Q5 Site-

Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs), prema uputama proizvođača sam pripremio reakcijsku smjesu za mutageni PCR, PCR program i potom reakciju kinaza-ligaza-*DpnI* (engl. *Kinase-Ligase-DpnI*, KLD), koja služi za cirkularizaciju PCR produkta i cijepanje DNA kalupa. Nakon provedene reakcije KLD, tom smjesom sam transformirao komercijalne, kemijski kompetentne stanice NEB 5- α (New England BioLabs) prema uputama proizvođača. Nakon ovog koraka, plazmide sam izolirao iz transformanata i provjerio ispravnost sekvenciranjem kako je opisano ranije u poglavlju 3.6.4. (nije bilo potrebno provjeravati prisustvo inserta).

3.6.6. Određivanje efikasnosti pripremljene adaptacije

Ugradnju novih razmaknica sam istraživao metodom PCR (poglavlje 3.6.2.), i agaroznom gel elektroforezom (poglavlje 3.6.3.), te računalnom obradom. Kalup molekule DNA za PCR dobio sam lizom prekonocno uzgojenih stanica na 37 °C, koje su bile transformirane s plazmidom pTK43 i/ili pDM16 (i kontrolnim plazmidima), koji je bio meta i izvor novih razmaknica. Za umnažanje sam koristio par početnica CRISPR-Sp4/CRISPR-R koje se vežu unutar četvrte razmaknice lokusa CRISPR i na 3' kraj gena *cas1*, pa se njima umnaža dio lokusa CRISPR u kojeg se ugrađuju nove razmaknice. Za PCR sam koristio enzim Phire Green Hot Start II PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific). Reakcijsku smjesu enzima, početnica i vode sam napravio po uputama proizvođača, od kojeg sam zatim podijelio alikvote od 9 μ L i njima dodao po 1 μ L kalupa. Koristio sam PCR program naveden u Tablici 7. Nakon PCR reakcije, u jažice sam nanio 5 μ L svakog uzorka, te sam ih provjerio gel elektroforezom u 2 % agaroznom gelu u trajanju od 45 minuta pri 50 V. Kemikalije za pripremu gela i uređaji korišteni za elektroforezu i snimanje gela su isti kao u poglavlju 3.6.3. Sojevi u kojima je došlo do ugradnje razmaknice su uz početnu vrpču, koja već ima jednu ugrađenu razmaknicu, imali dodatnu vrpču iznad početne, produljenu za otprilike 60 pb.

Tablica 7. PCR program za umnažanje lokusa CRISPR. Denaturacija, sparivanje početnica i elongacija su provedeni u 30 ciklusa.

PCR korak	Temperatura / Vrijeme
Početna denaturacija	98 °C / 30 s
Denaturacija	98 °C / 5 s
Sparivanje početnica	53 °C / 5 s
Elongacija	72 °C / 10 s
Završna elongacija	72 °C / 1 min

Kako bih odredio relativni intenzitet ugradnje razmaknica, koristio sam program Kodak 1D Image Analysis Software v. 3.6.0. Program je automatski pronašao početne vrpce s jednom ugrađenom razmaknicom jer su jakog intenziteta, dok sam vrpce s drugom, novougrađenom razmaknicom ručno označio. Također sam ručno označio i prazni prostor iznad početnih vrpce u uzorcima negativnih kontrola (prazni vektori), kako bih mogao oduzeti signal pozadine jer vrpce nisu imale oštre, jasne rubove. Jednom kad sam označio sve vrpce i odgovarajuća prazna polja u negativnim kontrolama, program je automatski odredio vrijednosti relativnih intenziteta za sva označena mjesta na gelu. Konačnu vrijednost relativnog intenziteta novougrađene razmaknice sam dobio tako da sam od vrijednosti pripadajućeg relativnog intenziteta oduzeo srednju vrijednost šuma svih negativnih kontrola.

3.7. Metode rada s RNA

3.7.1. Izolacija ukupne RNA

Ukupnu RNA sam izolirao iz bakterijskih stanica uzgojenih do logaritamske ili stacionarne faze rasta na temperaturama od 30 °C i 37 °C. Istaložio sam 1,5 mL stanica centrifugiranjem 5 minuta pri 6 000 rcf na 4 °C u centrifugi SIGMA 3K30 (Sigma-Aldrich). Supernatant sam uklonio, a talog stanica otopio u 500 µL ledeno hladne otopine 50 mM natrij acetata (pH 5,3) i 10 mM EDTA, te zatim dodao 50 µL 10 %-tnog SDS-a. Lizatu stanica sam potom dodao 500 µL hladnog reagensa Trizol LS (Invitrogen), inkubirao 5 minuta na sobnoj temperaturi, zatim dodao 200 µL hladnog kloroforma i inkubirao još 3 minute na sobnoj temperaturi. Lizat sam centrifugirao 15 minuta pri 12 000 rcf na 4 °C, kako bi se razdvojile faze. Gornju vodenu fazu (koja sadrži RNA) sam prebacio u novu mikroepruvetu i dodao 500 µL hladnog izopropanola, te inkubirao 10 minuta na sobnoj temperaturi. Izoliranu RNA sam istaložio centrifugiranjem 10 minuta pri 15 000 rcf na 4 °C. Pažljivo sam uklonio supernatant, a talog otopio u 200 µL 75 %-tnog etanola i dodatno promiješao na miješalici, te uzorak ponovo centrifugirao 5 minuta pri 7 500 rcf na 4 °C. Supernatant sam uklonio, a dobiveni talog pročišćene RNA sam ostavio sušiti na zraku kako bih uklonio sve tragove etanola. Suhi talog sam otopio u 50 µL sterilne DEPC dH₂O bez RNAza. Koncentraciju RNA sam odredio spektrofotometrijski pomoću uređaja NanoDrop TM 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific) nanošenjem 2 µL uzorka na pločicu i mjerenjem apsorbancije pri valnoj duljini od 260 nm. Kvalitetu RNA sam dodatno provjerio elektroforezom u 1 % agaroznom gelu, koju sam proveo na način opisan u poglavlju 3.6.3., te pohranio na -80 °C.

3.7.2. Određivanje količine transkripata metodom RT-qPCR

Za istraživanje mehanizama regulacije ekspresije gena *cas* na razini transkripcije koristio sam metodu kvantitativne lančane reakcije polimerazom (engl. *quantitative polymerase chain reaction*, RT-qPCR). Zaostalu DNA sam uklonio enzimom DNaza I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific). Reakcijsku smjesu sam pripremio prema uputama proizvođača i inkubirao 30 minuta na 37 °C. Nakon inkubacije, u uzorke sam dodao 50 mM EDTA i inkubirao 10 minuta na 65 °C kako bih inaktivirao DNazu. Pola volumena svake reakcijske smjese sam provjerio elektroforezom u 1 % agaroznom gelu (poglavlje 3.6.3.). Drugu polovicu uzorka sam razrijedio sterilnom DEPC dH₂O bez RNA-za do koncentracije 1 ng/μL.

Za reakciju umnažanja u jednom koraku (engl. *one step amplification reaction*) pomoću komercijalnog kompleta Luna Universal One-Step RT-qPCR Kit (New England Biolabs) koristio sam 2 μL uzoraka RNA razrijeđenih do koncentracije 1 ng/μL. Ostatak reakcijske smjese sam pripremio prema uputama proizvođača koristeći početnice navedene u Tablici 3. PCR reakcije sam proveo na uređajima 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems) i Mic Real Time PCR Cycler (Bio Molecular Systems) koristeći program naveden u Tablici 8. Dobivene rezultate sam analizirao koristeći programe 7500 Software v.2.0.6. (Applied Biosystems) i micPCR 2.10.1 (Bio Molecular Systems). Promjenu u transkripciji (engl. *fold change*) između istraživanih gena izračunao sam korištenjem relativne kvantifikacije s genom *groES* kao endogenom kontrolom i količinom transkripata gena *cas* iz soja bakterije *E. coli* BW25113 (divlji tip) kao kalibratorom. Gen *groES* sam koristio kao endogenu kontrolu jer je konstitutivno eksprimiran u svim istraživanim sojevima. Sve PCR reakcije su provedene u 6 replika, a kontrolne reakcije bez RNA su služile za praćenje općih razina kontaminacije.

Tablica 8. RT-qPCR program za mjerenje količine transkripata gena *cas*. Denaturacija i elongacija su provedeni u 40 ciklusa.

Korak	Temperatura / Vrijeme
Reverzna transkripcija	55 °C / 10 min
Početna denaturacija	95 °C / 1 min
Denaturacija	95 °C / 10 s
Elongacija	61 °C / 1 min

3.7.3. Priprema RNA za sekvenciranje ukupne RNA

Ukupnu RNA izolirao sam iz divljeg tipa *E. coli* i soja s deletiranim genom *hns* uzgojenih do stacionarne faze rasta u 3 mL tekućeg LB medija na 30 °C i 37 °C. Početni koraci

su isti kao u poglavlju 3.7.1. Ovdje sam gornju vodenu fazu nakon centrifugiranja izdvojio u novu mikropruvetu i pomiješao s jednakim volumenom 96 %-tnog etanola. Potom sam ukupnu RNA pročistio pomoću komercijalnog kompleta Direct-zol RNA Miniprep Plus Kits (Zymo Research) prema uputama proizvođača, čime sam uklonio i zaostalu DNA iz uzorka. Uzorcima sam izmjerio koncentraciju RNA spektrofotometrijski i provjerio kvalitetu elektroforezom u 1 % agaroznom gelu na način opisan u poglavlju 3.6.3.

Uzorke RNA sam poslao na sekvenciranje RNA (engl. *RNA sequencing*, RNAseq) u servis Macrogen (Južna Koreja). U servisu je prvo za svaki uzorak pripremljena biblioteka predložaka (engl. *template library*) za sekvenciranje. Kvaliteta podataka dobivenih sekvenciranjem provjerena je pomoću programa FastQC v0.11.7 (Babraham Bioinformatics) te su podaci zatim obrađeni programima Trimmomatic 0.38 (THE USADEL LAB) i Bowtie 1.1.2 (Johns Hopkins University) kako bi se dobivena očitavanja/sekvence (engl. *reads*) mapirala na referentni genom (kromosom bakterije *E. coli*). Ekspresija pojedinih gena određena je programom HTseq 0.10.0 [187], a razlika u ekspresiji gena između uzoraka dobivena je analizom diferencijalno eksprimiranih gena (engl. *Differentially Expressed Genes analysis*, DEG) koristeći paket edgeR. Sve navedene računalne analize napravio je servis Macrogen.

3.8. Metode rada s proteinima

3.8.1. Liza stanica i izolacija ukupnih proteina

Prekonoćnu kulturu stanica od 3 mL istaložio sam centrifugiranjem 5 minuta na 14 000 ref pri temperaturi od 4 °C u centrifugi Sigma 3K30 (Sigma-Aldrich). Supernatant sam uklonio, a talog stanica resuspendirao u 400 µL pufera za lizu. Stanice sam zatim lizirao sonikacijom pomoću uređaja High Intensity Ultrasonic Processor 50-Watt Mode (Bioblock Scientific) tijekom 6 ciklusa u trajanju od 2 sekunde, s 4 sekunde pauze na ledu između pulseva. Nakon sonikacije nisam odvajao supernatant od taloga, već sam u daljnjoj analizi koristio ukupni lizat.

3.8.2. Određivanje koncentracije proteina

Ukupnu koncentraciju proteina u lizatu odredio sam spektrofotometrijski metodom po Bradfordu [188], čiji je temelj vezanje boje *Coomassie Brilliant Blue* (CBB) na proteine. Iz matične Bradford otopine sam pripremio radnu Bradford otopinu. Uzorke za mjerenje sam pripremio dodavanjem 20 µL lizata u 1 mL radne Bradford otopine, nakon čega sam ih vorteksirao i inkubirao 5 minuta u mraku na sobnoj temperaturi. Uzorcima sam izmjerio

apsorbanciju (intenzitet plavog obojenja) pri valnoj duljini od 595 nm pomoću spektrofotometra Specord 50 Plus (Analytic Jena). Koncentracije uzoraka sam odredio pomoću baždarne krivulje pripremljene iz otopina serumskog albumina goveda (engl. *bovine serum albumin*, BSA) poznatih koncentracija (0,2-2,0 mg/mL) u puferu za lizu.

3.8.3. Provjera uspješnosti izolacije proteina metodom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata (SDS-PAGE)

Lizate proteina sam nakon mjerenja koncentracije denaturirao dodavanjem pufera za denaturaciju i inkubacijom 5 minuta na 95 °C. Kako bih potvrdio uspješnost izolacije ukupnih staničnih proteina, denaturirane uzorke lizata sam prije imunodetekcije provjerio metodom elektroforeze u poliakrilamidnom gelu u prisutnosti natrijevog dodecil sulfata (engl. *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*, SDS-PAGE) koristeći sustav Mini-PROTEAN 3 Cell (Bio-Rad). Ovom metodom sam izolirane proteine razdvojio prema molekulskoj masi koristeći gel sastavljen od dva dijela, 4 %-tnog gornjeg gela za sabijanje proteina i 10 %-tnog donjeg gela za razdvajanje. Sastav gelova naveden je u Tablici 9. Uzorke sam nanio na gel tako da svaka jažica sadrži 9 µg proteina, a za određivanje molekulske mase vrpce u prvu sam jažicu nanio 5 µL markera veličina Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific). Elektroforezu sam provodio u 1 x elektrodnom puferu za elektroforezu u poliakrilamidnom gelu na sobnoj temperaturi, prvo 15 minuta pri naponu od 100 V, pa zatim 45 minuta pri naponu od 180 V. Za metodu SDS-PAGE sam koristio i komercijalne gelove 10 % Mini-PROTEAN TGX Stain-Free Protein Gels (Bio-Rad), na kojima sam elektroforezu provodio otprilike 50 minuta pri 180 V. U oba slučaja, nakon završetka elektroforeze, gelove sam bojavao u otopini za bojanje poliakrilamidnih gelova sat vremena na tresilici. Boju koja se nije vezala za proteine u gelu sam isprao inkubacijom gelova u otopini za odbojavanje poliakrilamidnih gelova.

Tablica 9. Sastav otopina za pripremu 4-10 % gelova za metodu SDS-PAGE.

Otopine	10 % gel za razdvajanje	4 % gel za sabijanje
dH ₂ O	4,05 mL	3,05 mL
Tris-HCl	2,5 mL (1,5 M, pH 8,8)	1,25 mL (0,5 M, pH 6,8)
30 % akrilamid/bisakrilamid	3,3 mL	665 µL
10 % SDS	100 µL	50 µL
10 % APS	50 µL	35 µL
TEMED	5 µL	8 µL

3.8.4. Prijenos proteina na nitroceluloznu membranu (*Western blot*)

Prvo sam denaturirane uzorke lizata proteina razdvojio prema molekularnoj masi metodom SDS-PAGE, kako je opisano u poglavlju 3.8.3. Jedina razlika je što sam ovaj put uz već navedeni marker, nanio i 3 μ L markera veličina Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards (Bio-rad). Ovaj marker je smjesa deset plavo obojenih rekombinantnih proteina i vidljiv je na poliakrilamidnom gelu i nitroceluloznoj membrani bez dodatnog bojanja, te mi je stoga poslužio za provjeru uspješnosti prijenosa proteina na membranu.

Za prijenos proteina s gela na membranu koristio sam vertikalni sustav za elektroprijenos Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) i prijenos u puferu, pa sam zato prije završetka elektroforeze, membranu, spužvice i *Whatmann* papir namočio u puferu za prijenos. Nakon završetka elektroforeze, gel sam prenio na nitroceluloznu membranu ispod koje su se nalazili *Whatmann* papir i spužvica. Na gel sam stavio drugi *Whatmann* papir i spužvicu, te preklopio plastični okvir pazeći da između gela i membrane ne zaostanu mjehurići zraka koji bi spriječili prijenos proteina na membranu. Plastični okvir sam zatim namjestio u uređaj tako da je membrana okrenuta prema pozitivnoj elektrodi, kadicu sam nadopunio hladnim puferom za prijenos i kao dodatno hlađenje u kadicu sam postavio posudu s ledom. Prijenos proteina na membranu se odvijao 60 minuta pri naponu od 60 V na sobnoj temperaturi. Uspješnost prijenosa proteina na membranu potvrdio sam prisutnošću vrpce markera Precision Plus Protein All Blue Prestained Protein Standards (Bio-rad) na membrani.

3.8.5. Imunodetekcija proteina Cas3 i GAPDH

Nakon završetka prijenosa, membrane sam inkubirao u puferu za blokiranje sat vremena na sobnoj temperaturi uz trešnju. Nakon blokiranja, membrane sam isprao 3 puta po 5 minuta s puferom za ispiranje. Membrane sam zatim prerezao na dva dijela tako da se na gornjem dijelu nalazio protein Cas3 čija molekularna masa iznosi otprilike 100 kDa, dok se na donjem dijelu membrane nalazio protein gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza (engl. *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH) čija molekularna masa iznosi 36 kDa. Nakon razdvajanja membrane na dva dijela, svaki dio membrane sam tretirao zasebno. Za određivanje količine proteina Cas3 obilježenog histidinskim privjeskom, gornji dio membrane sam inkubirao u puferu s konjugiranim anti-His antitijelom (Tablica 10) protresanjem dva sata na sobnoj temperaturi, a zatim sam membranu isprao 3 puta po 5 minuta s puferom za ispiranje. Donji dio membrane inkubirao sam u puferu s primarnim anti-GAPDH antitijelom dva sata pri sobnoj temperaturi na tresilici, a potom preko noći na 4 °C. Idući dan sam membranu isprao 3 puta po

5 minuta s puferom za ispiranje, te ju potom inkubirao u puferu sa sekundarnim antitijelima (Tablica 10) protresanjem dva sata na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije u puferu sa sekundarnim antitijelima, membranu sam ponovo isprao 3 puta po 5 minuta s puferom za ispiranje. Za određivanje količine proteina Cas3 bez histidinskog privjeska, gornji dio membrane sam inkubirao u puferu s primarnim anti-Cas3 antitijelom (Tablica 10), te sam membranu dalje tretirao na isti način kao i za anti-GAPDH antitijelo.

Tablica 10. Popis antitijela korištenih za imunodetekciju proteina Cas3 i GAPDH. Sva antitijela su razrijeđena u puferu za ispiranje.

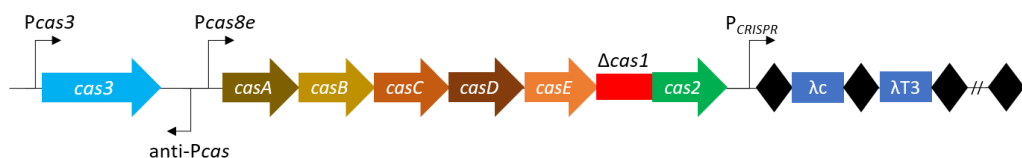
Antitijelo	Opis	Razrjeđenje
Anti-polyHistidine–Peroxidase Monoclonal antibody (Sigma-Aldrich)	anti-His konjugirano antitijelo za detekciju proteina Cas3	1:2000
Anti-Cas 3 antibody (Cusabio Technology)	kunićji anti-Cas3, primarno antitijelo	Od 1:500 do 1:10000
GAPDH antibody (GeneTex)	kunićji anti-GAPDH, primarno antitijelo	1:12000
Goat anti-Rabbit IgG (H&L), HRP conjugated (Agrisera)	anti-kunićji IgG-HRP, GAPDH sekundarno antitijelo	1:7500

Konačno, proteine Cas3 i GAPDH sam detektirao pomoću kemiluminescentnog reagensa za detekciju (ECL Western blot Substrate, Promega) prema uputama proizvođača. Signal sam detektirao pomoću uređaja C-DiGit Chemiluminescence Western Blot Scanner (LI-COR Biosciences) te sam dobivene proteinske vrpce analizirao programom Image Studio Lite 5.2 (LI-COR Biosciences). Intenzitet signala proteina Cas3 sam normalizirao prema signalu proteina GAPDH, a dobivene rezultate sam prikazao kao srednje vrijednosti relativnog intenziteta \pm standardna devijacija, dobivene u tri nezavisna pokusa.

4. REZULTATI

4.1. Utjecaj proteina StpA na promotor *Pcas8e*

Protein H-NS je globalni regulator koji utječe na ekspresiju oko 20 % gena u bakteriji *E. coli*, uključujući i negativnu regulaciju ekspresije svih gena *cas*. Naročito je važno njegovo vezanje za intergensku regiju IGLB između gena *cas3* i *casA*, gdje se nalazi promotor *Pcas8e*, čime inhibira ekspresiju gena za proteine Cas1, Cas2 i kompleks Cascade, koji sačinjavaju operon *casABCDEI2* (Slika 4) [25,91]. Dosadašnja istraživanja su pokazala kako protein StpA, paralog proteina H-NS, može djelomično nadomjestiti represorsku ulogu proteina H-NS u regulaciji gena. Naime, ChIP (kromatinska imunoprecipitacija) analizom je *in vitro* utvrđeno da se proteini H-NS i StpA vežu na ista mjesta u genomu divljeg tipa bakterije *E. coli*, iako je u sojevima s mutiranim genom *hns* vezanje proteina StpA smanjeno na 1/3 mjesta u odnosu na divlji tip [29,130,131,189]. Za protein StpA je pokazano *in vitro* da ima i veći afinitet vezanja za regiju IGLB od proteina H-NS [25]. Kako bih istražio mogući kompenzacijski utjecaj proteina StpA u stanicama koje nemaju protein H-NS, na regulaciju sustava CRISPR-Cas *in vivo*, aktivnost sustava CRISPR-Cas sam određivao prateći osjetljivost bakterija na infekciju fagom λ vir (mutantom faga λ koji ima samo litički ciklus). Za početni soj koristio sam mutanta bakterije *E. coli* K-12 BW25113 s deletiranim genima *hns* i *cas1*, te dodanim anti-lambda razmaknicama λ T3 i λ c u lokus CRISPR (soj IIB1040, Tablica 1, Slika 7). Mutacijom u genu *hns* aktivira se imunski sustav CRISPR-Cas, dok mutacija u genu *cas1* sprječava adaptaciju (ugradnja nove razmaknice), pa se prati samo proces interferencije (cijepanje strane DNA). Konkretno, bakterije koje imaju aktivan sustav CRISPR-Cas otporne su na infekciju fagom λ vir i nema pojave plakova (čistina), dok pojava plakova znači da sustav CRISPR-Cas nije aktivan i da su bakterije osjetljive. Razmaknica λ T3 je komplementarna genu R faga lambda [8], a razmaknica λ c genu *cII* faga λ vir [91].



Slika 7. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u sojevima bakterije *E. coli* IIB1039, IIB1040, IIB1066, IIB1266, IIB1297, IIB1301, IIB1309, IIB1325 i IIB1330. Sojevi imaju deleciju gena *cas1* i razmaknice λ T3 i λ c dodane u lokus CRISPR.

Bakterije sam inficirao s decimalnim razrjeđenjima faga λvir i nakon prekonocne inkubacije na dvije temperature odredio efikasnost infekcije računanjem broja nastalih virusnih čestica (PFU/mL). Stanice divljeg tipa (hns^+ , soj IIB1039, Tablica 1, Slika 7) nemaju aktivan sustav CRISPR-Cas i imaju plakove na obje temperature, odnosno osjetljive su na infekciju (Tablica 11). U skladu s prijašnjim rezultatima [91], na fag λvir otporan mutant Δhns (soj IIB1040) imao je otprilike šest redova veličine manje virusnih čestica pri temperaturi od 30 °C, u odnosu na 37 °C. Točan broj pojedinačnih plakova na 30 °C nije se mogao odrediti jer se pri toj temperaturi inkubacije nisu formirali pojedinačni plakovi.

Tablica 11. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteina StpA na zaštitu bakterija protiv infekcije fagom λvir pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Soj	PFU/mL (30 °C) (\pm st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (\pm st. dev.) ^a
IIB1039 ($\Delta cas1 hns^+ + \lambda T3 + \lambda c$)	1,53 x 10⁹ ($\pm 6,6 \times 10^8$)	3,35 x 10⁹ ($\pm 3 \times 10^9$)
IIB1040 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$)	~ 10 ^{3*}	1,79 x 10⁹ ($\pm 1,3 \times 10^9$)
IIB1040 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	~ 10 ^{3*}	4,42 x 10⁹ ($\pm 2 \times 10^9$)
IIB1040 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pMR5 (pStpA)	9,85 x 10⁸ ($\pm 4,4 \times 10^8$)	6,32 x 10⁹ ($\pm 3,1 \times 10^9$)
IIB1042 ($lacUV5-cas3 araBp8-casA + \lambda T3 + \lambda c$)	~ 10 ^{3*}	~ 10 ^{3*}
IIB1042 ($lacUV5-cas3 araBp8-casA + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	~ 10 ^{3*}	~ 10 ^{3*}
IIB1042 ($lacUV5-cas3 araBp8-casA + \lambda T3 + \lambda c$) + pMR5 (pStpA)	~ 10 ^{3*}	~ 10 ^{3*}
IIB1325 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta stpA + \lambda T3 + \lambda c$)	~ 10 ^{3*}	1,84 x 10⁹ ($\pm 9 \times 10^8$)

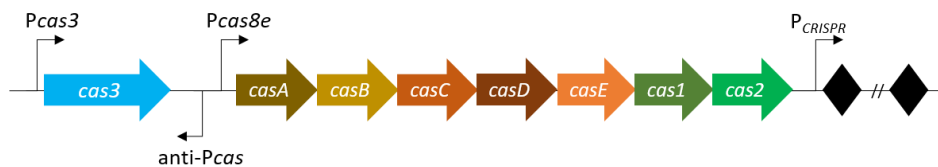
* Točan broj plakova u nekim slučajevima nije se mogao odrediti jer se nisu formirali pojedinačni plakovi.

^a) Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Nakon što sam potvrdio otpornost mutanta Δhns na infekciju fagom λvir na 30 °C, istražio sam hoće li prekomjerna ekspresija proteina StpA poništiti tu otpornost. Protein StpA ne eksprimira se u stanicama divljeg tipa jer je također inhibiran represorom H-NS [28,29], već samo u mutantu Δhns [27]. Kako bih povećao endogene količine proteina StpA, gen *stpA* je kloniran u plazmid pBad-HisA (pMR5, Tablica 2). Plazmid pBad-HisA je plazmid umjerenog broja kopija (engl. *medium copy number*) čime se sprječava prekomjerna ekspresija proteina StpA koja se pokazala letalnom, kao i u slučaju prekomjerne ekspresije proteina H-NS [29,190]. Kao negativnu kontrolu koristio sam prazni vektor pBad-HisA. Soj $\Delta hns \Delta cas1 + \lambda T3 + \lambda c$ (soj

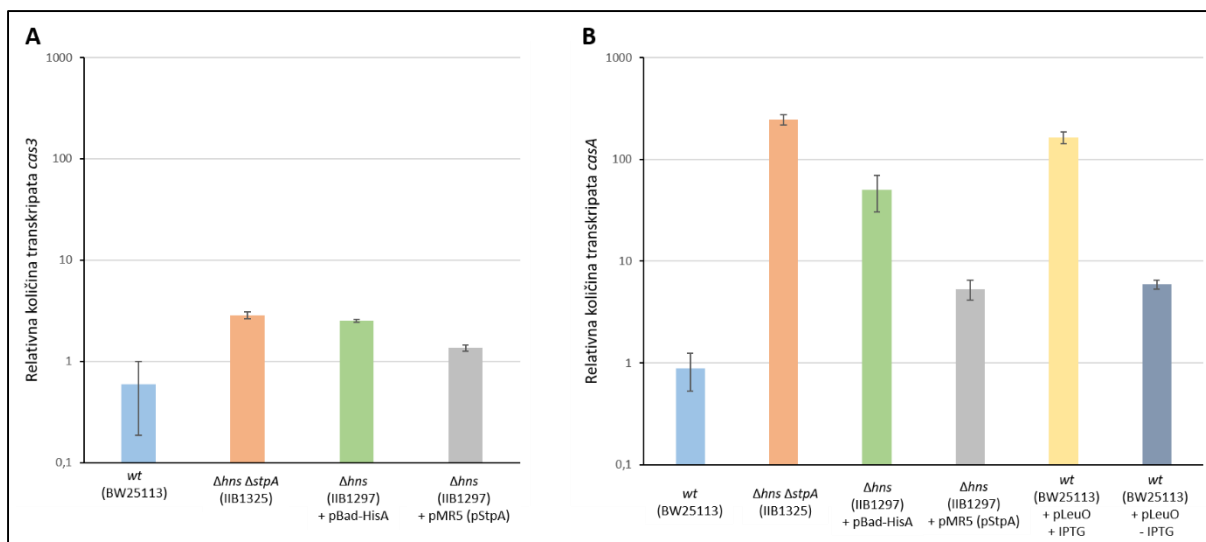
IIB1040) s ubačenim praznim vektorom je očekivano zadržao otpornost na infekciju fagom λ_{vir} pri temperaturi inkubacije od 30 °C. Isti soj s ubačenim plazmidom pMR5 (pStpA) i induciranom ekspresijom gena *stpA*, izgubio je otpornost na infekciju pri toj temperaturi, te je broj virusnih čestica bio sličan onom kod divljeg tipa i općenito na 37 °C kad je sustav CRISPR-Cas neaktivan (Tablica 11).

Ovaj rezultat je potvrdio pretpostavku da protein StpA može nadomjestiti nedostatak represora H-NS u mutantima Δhns vezanjem na promotor *Pcas8e* [29,130,131]. Kako bih istražio i potvrdio ovaj učinak na razini transkripcije, izolirao sam ukupnu RNA iz sojeva uzgojenih do logaritamske faze rasta pri 37 °C. Ukupnu RNA sam izolirao iz divljeg tipa bakterije *E. coli* (soj BW25113), mutanta Δhns (soj IIB1297) transformiranog s pBad-HisA ili pStpA, te dvostrukog mutanta $\Delta hns \Delta stpA$ (soj IIB1325). Ovi sojevi imaju iste mutacije u regiji CRISPR kao što je prikazano na slici 7 (deleciju gena *cas1*, te dvije anti-lambda razmaknice $\lambda T3$ i λc), osim divljeg tipa (Slika 8). Zbog jednostavnosti ću u nastavku teksta naglasiti samo najvažnije gene za ovo istraživanje, gene *hns* i *stpA*. Metodom RT-qPCR sam iz izolirane ukupne RNA odredio relativnu količinu transkripata *casA* i *cas3*, koristeći gen *groES* kao endogenu kontrolu. Gen *casA* je odabran kao reprezentativni gen operona *casABCDE12* jer se prvi prepisuje s promotora *Pcas8e*, a gen *cas3* kao negativna kontrola jer nisam očekivao utjecaj proteina StpA na promotor *Pcas3*.



Slika 8. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u sojevima bakterije *E. coli* BW25113, IIB855, IIB1396 i MR23. Ovi sojevi nemaju modifikacija gena *cas*, njihovih promotora ili lokusa CRISPR.

Ustanovio sam da je transkripcija gena *cas3* blago porasla (oko 2,5 puta) u mutantu Δhns s praznim vektorom pBad-HisA u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 9A). Nije primijećeno značajno povećanje transkripcije gena *cas3* u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$, dok je prekomjerna ekspresija proteina StpA u mutantu Δhns neznatno smanjila ekspresiju gena *cas3*.



Slika 9. Utjecaj proteina StpA na ekspresiju gena *cas3* i *casA*. **(A)** Količine transkripata *cas3* dobivene metodom RT-qPCR u sojevima bakterije *E. coli* BW25113 (divlji tip), IIB1325 ($\Delta hns \Delta stpA + \lambda T3 + \lambda c$), i IIB1297 ($\Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) transformiranom s pBad-HisA ili pStpA. **(B)** Količine transkripata *casA* dobivene metodom RT-qPCR u istim sojevima, te soju BW25113 (divlji tip) transformiranom s pLeuO (sa i bez dodatka induktora IPTG). Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike, a vrijednosti na y osi su prikazane na logaritamskoj skali.

S druge strane, količina transkripata *casA* značajno se mijenjala ovisno o genotipu sojeva, pa je tako transkripcija porasla oko 50 puta u mutantu Δhns s praznim vektorom pBad-HisA u odnosu na divlji tip, što je očekivano i nešto je više nego u prethodnim istraživanjima [86]. Povećanom ekspresijom proteina StpA s plazmida pStpA u mutantu Δhns , količine transkripata *casA* su se osjetno smanjile, ali su i dalje ostale oko 5 puta veće nego u divljem tipu (Slika 9B). U dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ količina transkripata *casA* porasla je za čak oko 250 puta u odnosu na divlji tip i oko 5 puta u odnosu na mutantu Δhns . Ovi rezultati su potvrdili da se protein StpA veže i regulira transkripciju s promotora *Pcas8e* i nadomješta nedostatak proteina H-NS, te da ne utječe na promotor *Pcas3*. Iz tog razloga sam se dalje usredotočio samo na analizu transkripata *casA*.

Osim inaktivacijom gena *hns*, drugi način kako se može inducirati ekspresija gena koji su pod kontrolom represora H-NS, je uklanjanje proteina H-NS s promotora koje kontrolira koristeći njegove antagoniste [94]. Najpoznatiji antagonist proteina H-NS je protein LeuO, transkripcijski aktivator koji blokira vezanje represora H-NS na specifične promotorske regije pod kontrolom ovog represora [191]. Očekivao sam da ću povećanom ekspresijom proteina LeuO potaknuti prepisivanje s promotora *Pcas8e* i dobiti isti učinak na prepisivanje gena *casA*

kao kad je deletiran gen *hns*, što je prethodno pokazano [86]. U tu svrhu sam u stanice divljeg tipa ubacio plazmid pKEDR13 (pLeuO), gdje je gen *leuO* pod kontrolom inducibilnog promotora *lacI^q tac* (Tablica 2), i ponovo izolirao ukupnu RNA i pratio količine transkripata *casA*. Kad ekspresija proteina LeuO nije bila inducirana dodatkom IPTG-a, transkripcija gena *casA* je porasla samo 5 puta u odnosu na divlji tip bez plazmida (Slika 9B). Nakon indukcije ekspresije gena *leuO*, količine transkripata *casA* snažno su porasle za oko 165 puta u odnosu na divlji tip, što je za oko 3 puta više u odnosu na mutanta Δhns , ali nešto manje u odnosu na prethodna istraživanja gdje je transkripcija gena *casA* bila povećana za 236 puta [86]. U mojem istraživanju prekomjerna ekspresija samo proteina LeuO ili samo delecija gena *hns* nije dovela do maksimalne aktivacije transkripcije s promotora *Pcas δe* . Potpuna derepresija promotora *Pcas δe* , odnosno ekspresija operona *casABCDE12*, moguća je tek nakon istodobne inaktivacije gena *hns* i *stpA*.

Unatoč maksimalnoj ekspresiji operona *casABCDE12* (Slika 9B), dvostruki mutant $\Delta hns \Delta stpA$ nije postao otporniji na infekciju fagom λvir na 37 °C. Naime, otpornost je ostala slična onoj mutanta Δhns , odnosno dvostruki mutant je otporan na infekciju fagom λvir na 30 °C, a osjetljiv na 37 °C (Tablica 11).

Konačno, kako bih dodatno potvrdio da protein StpA djeluje samo na promotor *Pcas δe* , koristio sam soj u kojem su nativni promotori *Pcas3* i *Pcas δe* zamijenjeni inducibilnim *PlacUV5*, odnosno *ParaBp8* (soj IIB1042, Tablica 1, Slika 10). Ovaj soj je *hns⁺* (nema mutacije u genu *hns*) jer prepisivanje gena *cas* više ne ovisi o proteinu H-NS, i sadrži iste dvije anti-lambda razmaknice u lokusu CRISPR kao prethodni sojevi. Pretpostavio sam da protein StpA neće moći utjecati na otpornost bakterija na infekciju fagom λvir jer se ne može vezati na inducibilne promotore. U prisutnosti oba induktora, soj IIB1042 je otporan na infekciju fagom λvir na 30 °C i 37 °C (Tablica 11), vjerojatno zbog većih količina svih komponenti sustava CRISPR-Cas eksprimiranih pomoću inducibilnih promotora. Međutim, ekspresija proteina StpA s plazmida u ovom soju nije poništila otpornost na infekciju fagom λvir na bilo kojoj od te dvije temperature (Tablica 11). Ovaj rezultat ukazuje da protein StpA ne može utjecati na ekspresiju gena *cas* kad su pod kontrolom inducibilnih promotora, odnosno kad nema veznog mjesta za protein StpA.

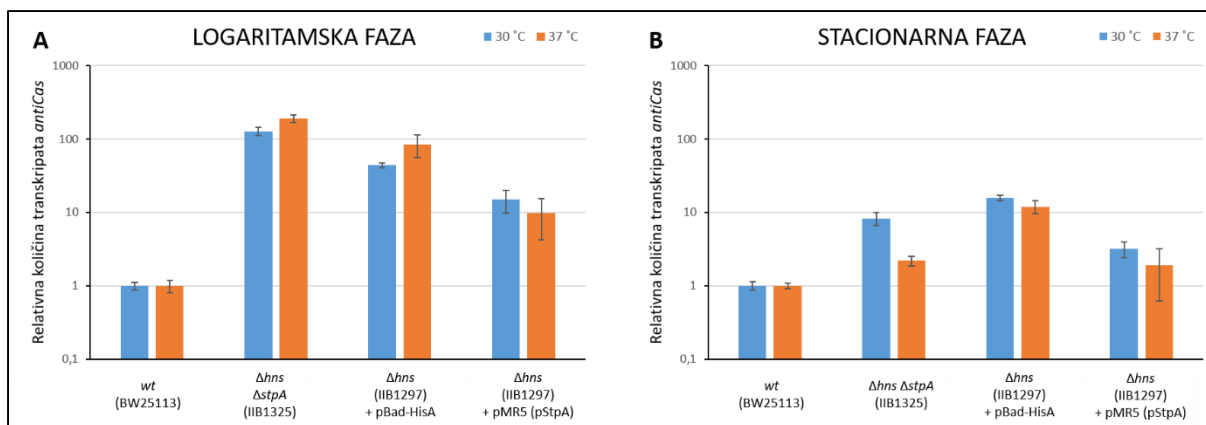


Slika 10. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u soju bakterije *E. coli* IIB1042. Soj ima inducibilne promotore za gen *cas3* i operon *casABCDE12*, te razmaknice $\lambda T3$ i λc dodane u lokus CRISPR.

4.2. Utjecaj proteina StpA na promotor anti-*Pcas*

U intergenskoj regiji IGLB se osim promotora *Pcas8e*, nalazi i divergentno orijentirani promotor anti-*Pcas* (Slika 4) [8,25]. Za promotor anti-*Pcas* je pokazano da je aktivan *in vivo* i *in vitro*, a metodom *Northern blot* je otkriven transkript duljine oko 200 nt samo u stanicama bez represora H-NS, što znači kako je reguliran proteinom H-NS [25]. Kako su moji rezultati pokazali da protein StpA utječe na aktivnost promotora *Pcas8e*, pretpostavio sam da bi protein StpA mogao utjecati i na aktivnost promotora anti-*Pcas*. O količinama transkripta *antiCas* *in vivo* nisam imao podatke iz literature, pa sam prvo istražio kako se prepisuje u raznim sojevima uzgojenim na dvije temperature i faze rasta. Ukupnu RNA sam izolirao iz istih sojeva kao za prethodne pokuse, stanica bakterije *E. coli* divljeg tipa (soj BW25113), mutanta Δhns (soj IIB1297) transformiranog s pBad-HisA ili pStpA, te dvostrukog mutanta $\Delta hns \Delta stpA$ (IIB1325), uzgojenih do logaritamske ili stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C.

Uočio sam da temperatura rasta nije utjecala na količine transkripata *antiCas*, jer su bile podjednake na obje temperature. U sojevima uzgojenim do logaritamske faze rasta, relativna količina transkripata *antiCas* bila je najviša u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$, oko 120 puta veća u odnosu na stanice divljeg tipa (Slika 11A). U mutantu Δhns s pBad-HisA količina transkripata *antiCas* bila je povećana za oko 50 puta, dok se uslijed ekspresije proteina StpA s plazmida u mutantu Δhns značajno smanjila, na otprilike 10 puta u odnosu na divlji tip. Dobiveni rezultati se podudaraju s rezultatima dobivenim za gen *casA*, odnosno promotor *Pcas8e*, pa mogu zaključiti da protein StpA istovremeno može inhibirati i promotor anti-*Pcas*.



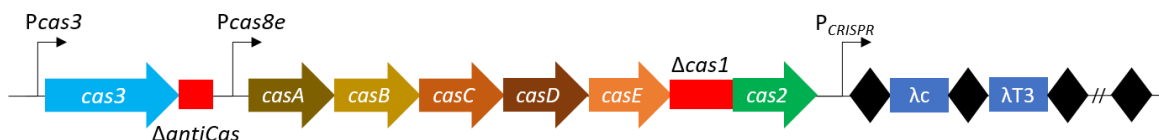
Slika 11. Utjecaj proteina StpA na aktivnost promotora anti-*Pcas* u stanicama uzgojenim do (A) log faze i (B) stacionarne faze rasta. Količina transkripata *antiCas* dobivena metodom RT-qPCR u sojevima bakterije *E. coli* BW25113 (divlji tip), IIB1325 ($\Delta hns \Delta stpA + \lambda T3 + \lambda c$), i IIB1297 ($\Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) transformiranom s pBad-HisA ili pStpA. Sojevi su uzgajani na 30 °C (plavi stupci) i 37 °C (crveni stupci). Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike, a vrijednosti na y osi su prikazane na logaritamskoj skali.

Za razliku od logaritamske faze, količine transkripata *antiCas* u svim sojevima uzgojenim do stacionarne faze rasta bile su slične i povećane za maksimalno oko 12-15 puta u odnosu na kontrolne stanice divljeg tipa (Slika 11B). Učinak proteina StpA na količine transkripata *antiCas* nije se razlikovao ovisno o tome je li protein StpA bio prisutan u suvišku ili uklonjen u mutantu Δhns . U oba slučaja, količine transkripata *antiCas* porasle su za oko 4-8 puta u odnosu na stanice divljeg tipa. Jedino je došlo do nešto veće transkripcije u mutantu Δhns s praznim vektorom što se ne može smatrati značajnom razlikom. Ovi rezultati sugeriraju da je u stanicama u stacionarnoj fazi rasta ekspresija s promotora anti-*Pcas* značajno smanjena i ne ovisi o proteinu StpA. Količine transkripata *casABCDE* u stacionarnim stanicama nisam određivao metodom RT-qPCR, ali sam metodom RNAseq dobio podatke o količini transkripata u stacionarnim stanicama Δhns u odnosu na divlji tip. Ovom metodom nisu dobivene količine transkripata za gene *casA*, *casB* i *casC* (vidi u raspravi poglavlje 5.2.), ali jesu za gene *casD* i *casE*. Za ova dva gena količine transkripata u stanicama Δhns su se povećale za oko 73, odnosno 59 puta u odnosu na divlji tip na 30 °C, što je slično količinama koje sam dobio u stanicama u logaritamskoj fazi rasta. To ukazuje da je transkripcija s promotora *Pcas δe* podjednaka u stanicama u logaritamskoj i stacionarnoj fazi rasta.

4.3. Utjecaj transkripta *antiCas* na transkripciju i translaciju gena *cas3*

Za transkript s promotora *anti-Pcas* pokazano je da ima potencijal da zauzme zanimljivu sekundarnu strukturu koja je tipična za mnoge nekodirajuće regulatorne RNA. Iz tog razloga je predloženo da potencijalno može inhibirati aktivnost sustava CRISPR-Cas na način da ometa terminaciju transkripcije ili translaciju gena *cas3* [25]. Kako bih istražio mogući utjecaj transkripta *antiCas* na aktivnost sustava CRISPR-Cas, kodirajuću regiju *antiCas* sam klonirao u ekspresijske vektore pBad-HisA (pDM13) i pMR18 (pDM16, Tablica 2). Plazmid pMR18 kompatibilan je s plazmidom pBad-HisA jer ima različito ishodište replikacije i otpornost na antibiotik i može se koristiti kad je potrebna koekspresija gena s dva različita plazmida. Želio sam istražiti hoće li povećana količina transkripta *antiCas* utjecati na aktivnost sustava CRISPR-Cas tako što će smanjiti aktivnost proteina Cas3 i time učiniti stanice osjetljivim na infekciju fagom λvir , i to dodatno potvrditi metodama RT-qPCR i *Western blot*.

U tu svrhu koristio sam mutanta Δhns s dodatnom delecijom gena *cas1*, te dvije anti-lambda razmaknice $\lambda T3$ i λc (soj IIB1297, Slika 7) koji sam transformirao s plazmidom pDM13 (*antiCas*). Kao negativnu kontrolu sam koristio prazni vektor pBad-HisA. Očekivano, mutant Δhns s praznim vektorom otporan je na infekciju fagom λvir na 30 °C, a osjetljiv na 37 °C (Tablica 12). Nasuprot tomu, isti soj s pojačanom ekspresijom transkripta *antiCas* s plazmida izgubio je otpornost na infekciju fagom λvir na 30 °C, odnosno pojavili su se plakovi u oko 10 puta manjem broju nego na 37 °C. Ovi rezultati pokazuju kako transkript *antiCas* u suvišku može inhibirati obranu od infekcije fagom λvir . Također, koristio sam soj $\Delta anticas$ (soj IIB1434, Tablica 1, Slika 12) u kojem je deletirana kromosomska regija *antiCas*, nizvodno od gena *cas3*. U taj soj sam još dodao anti-lambda razmaknice i mutaciju Δhns . Htio sam provjeriti može li transkript *antiCas* u suvišku i u ovom soju utjecati na otpornost na infekciju fagom λvir na 30 °C (odnosno treba li kromosomski gen ili ne). I u ovom soju je ekspresija transkripta *antiCas* s plazmida također dovela do pojave plakova na 30 °C sa sličnim brojem virusnih čestica (Tablica 12).



Slika 12. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u soju bakterije *E. coli* IIB1434. Soj ima deleciju gena *cas1* i dijela sekvence *antiCas* nizvodno od gena *cas3* te razmaknice $\lambda T3$ i λc dodane u lokus CRISPR.

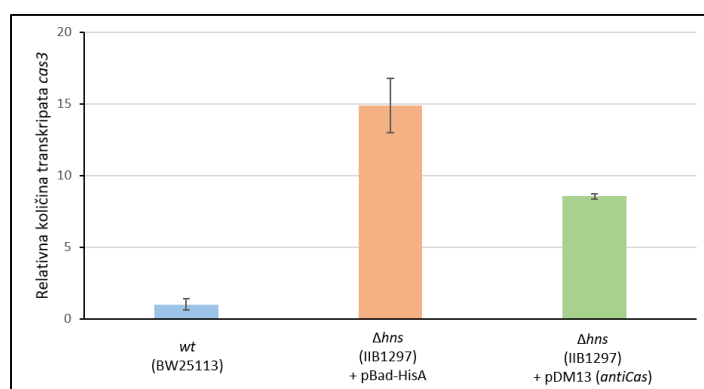
Tablica 12. Utjecaj prekomjerne ekspresije transkripta *antiCas* na zaštitu bakterija protiv infekcije fagom λ vir pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Soj	PFU/mL (30 °C) (\pm st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (\pm st. dev.) ^a
IIB1297 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	$\sim 10^3$ *	$1,16 \times 10^9$ ($\pm 1,6 \times 10^8$)
IIB1297 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pDM13 (<i>antiCas</i>)	$1,72 \times 10^8$ ($\pm 6,6 \times 10^7$)	$1,7 \times 10^9$ ($\pm 5,5 \times 10^8$)
IIB1434 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta antiCas + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	$\sim 10^3$ *	$1,73 \times 10^{10}$ ($\pm 0,5 \times 10^{10}$)
IIB1434 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta antiCas + \lambda T3 + \lambda c$) + pDM13 (<i>antiCas</i>)	$2,9 \times 10^{10}$ ($\pm 1,6 \times 10^{10}$)	$2,73 \times 10^{10}$ ($\pm 1,9 \times 10^{10}$)

* Točan broj plakova u nekim slučajevima nije se mogao odrediti jer se nisu formirali pojedinačni plakovi.

^{a)} Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Kako bih provjerio utječe li prekomjerna ekspresija transkripta *antiCas* na transkripciju gena *cas3*, ukupnu RNA sam izolirao iz divljeg tipa bakterije *E. coli* (soj BW25113) i istog mutanta Δhns (soj IIB1297) s praznim vektorom pBad-HisA ili plazmidom pDM13 (*pantiCas*) uzgojenih do logaritamske faze rasta na 37 °C. Koristio sam početnice koje su se vezale za srednji dio gena *cas3*. Transkripcija gena *cas3* u mutantu Δhns je porasla za otprilike 15 puta u odnosu na divlji tip. U mutantu Δhns u kojem je inducirana ekspresija transkripta *antiCas* s plazmida, količine transkripata *cas3* bile su oko 8 puta veće u odnosu na divlji tip, što je gotovo upola manje nego u mutantu Δhns s kontrolnim plazmidom (Slika 13).



Slika 13. Transkript *antiCas* utječe na transkripciju gena *cas3*. Količina transkripata *cas3* dobivena metodom RT-qPCR u sojevima bakterije *E. coli* BW25113 (divlji tip) i IIB1297 ($\Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) transformiranom s pBad-HisA ili pDM13 (*antiCas*). Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Osim inhibiranja transkripcije gena *cas3*, transkript *antiCas* mogao bi ometati translaciju ili bi potencijalno mogao stupiti u interakciju s proteinom Cas3, čime bi inhibirao njegovu aktivnost [25]. Iz tog razloga sam metodom *Western blot* istražio utječe li prekomjerna ekspresija transkripta *antiCas* na količinu proteina Cas3. Očekivao sam da bi u slučaju da transkript *antiCas* inhibira translaciju gena *cas3*, došlo do smanjenja količine proteina, što bi rezultiralo slabijim signalom nakon vizualizacije vrpce.

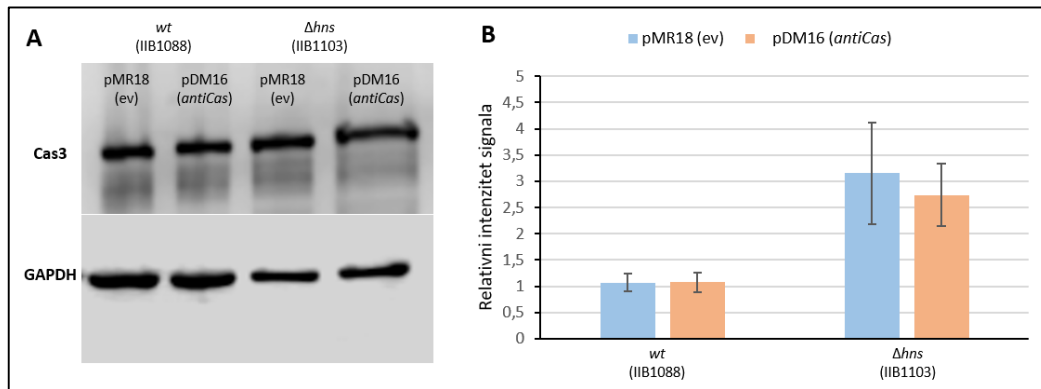
Za ovo istraživanje sam koristio sojeve IIB1088 (divlji tip za gen *hns*) i IIB1103 (mutant Δhns) u kojima je gen *cas3* obilježen histidinskim privjeskom (Tablica 1, Slika 14). Oba soja su imala gen *cas3* stavljen pod inducibilni promotor pBad s kromosoma, ali nisu imali nativnu sekvencu nakon stop kodona gena *cas3* jer se u konstrukt odmah nizvodno od gena *cas3* nalazi gen za otpornost na antibiotik. U ovim sojevima mutacija Δhns nije potrebna za indukciju gena *cas3* i ne može se prepisati transkript *antiCas*. Transkript *antiCas* može se inducirati samo s plazmida pDM16 koji sam unio transformacijom u oba soja, a kao negativnu kontrolu sam koristio prazni vektor pMR18 (Tablica 2).



Slika 14. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u sojevima bakterije *E. coli* IIB1088, IIB1103, IIB1104 i IIB1105. Sojevi imaju gen *cas3* obilježen histidinskim privjeskom (His6x) na 5' kraju i inducibilni promotor za gen *cas3*.

Stanice sam uzgojio do stacionarne faze rasta na 30 °C, uz dodatak L-arabinoze (0,2 % v/v) za indukciju ekspresije gena *cas3* s bakterijskog kromosoma i transkripta *antiCas* s plazmida. Uspješnost izolacije proteina sam provjerio metodom SDS-PAGE (rezultati nisu prikazani). Protein GAPDH sam koristio kao kontrolu nanošenja uzorka (engl. *loading control*) i za normalizaciju intenziteta signala kemiluminiscencije jer je konstitutivno eksprimiran u svim sojevima, dok je kao referentni soj za usporedbu intenziteta signala poslužio divlji tip (soj IIB1088) s praznim vektorom pMR18. Korištenjem anti-His i anti-GAPDH antitijela (vidi poglavlje 3.8.5.) proteini Cas3 i GAPDH uspješno su detektirani na membrani, a rezultat je prikazan na slici 15A. Mutacija Δhns je dovela do povećane količine proteina Cas3 za oko 3 puta u odnosu na divlji tip (Slika 15B), što je u skladu s rezultatima dobivenim u istraživanju utjecaja šaperona HtpG (vidi poglavlje 4.8., Slika 22C). Međutim, ekspresija transkripta

antiCas s plazmida ni u divljem tipu niti mutantu Δhns nije imala učinka na količine proteina Cas3 u odnosu na iste sojeve s praznim vektorom (Slika 15B).

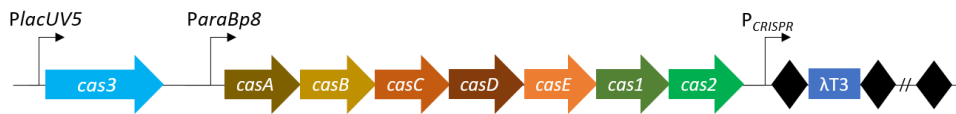


Slika 15. (A) Imunodetekcija proteina Cas3 i GAPDH metodom *Western blot* u izolatu ukupnih proteina iz sojeva IIB1088 (*araBp8-cas3 wt*) i IIB1103 (*araBp8-cas3 Δhns*) transformiranih s praznim vektorom pMR18 (ev) ili plazmidom pDM16 (*antiCas*), uzgojenih na 30 °C. Membrana je nakon prijenosa prerezana na dva dijela koji su potom inkubirani u različitim antitijelima. **(B)** Grafički prikaz normaliziranih intenziteta signala vrpce proteina Cas3 iz istih sojeva s praznim vektorom pMR18 (ev, plavi stupac) ili plazmidom pDM16 (*antiCas*, crveni stupac). Vrijednosti intenziteta signala vrpce proteina Cas3 za svaki soj normalizirane su prema odgovarajućim vrijednostima intenziteta signala vrpce kontrolnog proteina GAPDH, a kao referentni soj za usporedbu intenziteta vrpce poslužio je divlji tip (soj IIB1088) transformiran s praznim vektorom pMR18. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

4.4. Utjecaj transkripta *antiCas* na pripremljenu adaptaciju

Za pripremljenu adaptaciju (obnavljanje imuniteta pri ponovnom susretom s istom stranom DNA) u bakteriji *E. coli* potrebni su protein Cas1, Cas2, Cas3, kompleks Cascade i već prisutna razmaknica u lokusu CRISPR koja potječe iz strane molekule DNA [15]. Kako sam pokazao da povećane količine transkripta *antiCas* mogu inhibirati sustav CRISPR-Cas u zaštiti od infekcije fagom λvir , odlučio sam istražiti može li transkript *antiCas* utjecati i na pripremljenu adaptaciju (ugradnju novih razmaknica u lokus CRISPR iz iste strane DNA). Pretpostavio sam, u slučaju da transkript *antiCas* smanjuje aktivnost proteina Cas3, da bi se trebao uočiti efekt i na ugradnju razmaknica u pripremljenoj adaptaciji. Koristio sam soj bakterije *E. coli* K-12 BW25113 prilagođen za pripremljenu adaptaciju [180]. U njemu je gen *cas3* stavljen pod inducibilni promotor *lacUV5*, operon *casABCDE12* pod inducibilni promotor

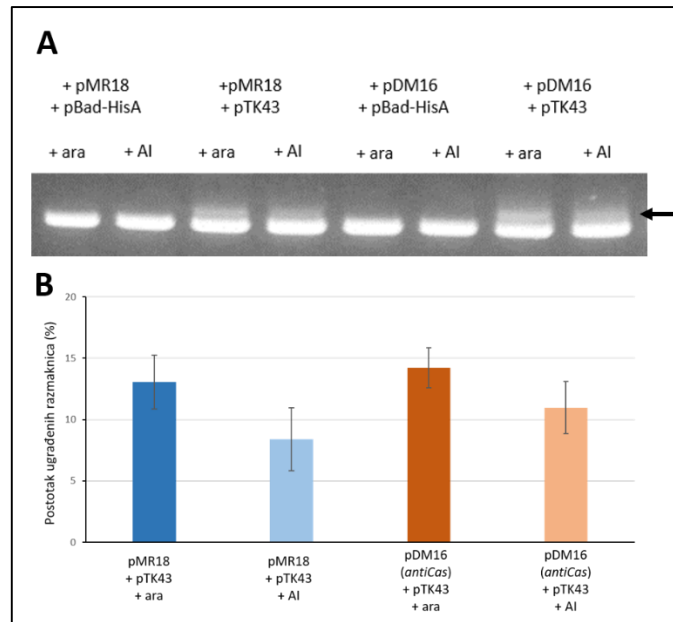
araBp8 i anti-lambda razmaknica λ T3 je dodana u lokus CRISPR (soj IIB969, Tablica 1, Slika 16). Inducibilni promotori omogućuju ekspresiju svih gena *cas* potrebnih za pripremljenu adaptaciju. Kao izvor novih razmaknica poslužio mi je plazmid pTK43 jer sadrži gen R faga lambda koji je komplementaran razmaknici λ T3 (Tablica 2). Kao negativnu kontrolu sam koristio prazni vektor pBad-HisA koji ne sadrži sekvencu komplementarnu razmaknici λ T3. Za ekspresiju transkripta *antiCas* koristio sam plazmid pDM16 (*pantiCas*, Tablica 2), a kao negativnu kontrolu prazni vektor pMR18.



Slika 16. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u soju bakterije *E. coli* IIB969. Soj ima inducibilne promotore za gen *cas3* i operon *casABCDE12*, te razmaknicu λ T3 dodanu u lokus CRISPR.

Stanice sam uzgajao uz dodatak L-arabinoze (konačna koncentracija 0,2 %) za indukciju operona *casABCDE12* s kromosoma i transkripta *antiCas* s plazmida pDM16. Kako je iz literature poznato da pojačana aktivnost proteina Cas3 može smanjiti efikasnost pripremljene adaptacije [192,193], za svaki pokus sam napravio replike sa i bez dodatka IPTG-a (konačna koncentracija 1 mM) koji inducira ekspresiju gena *cas3* s kromosoma. Ugradnju razmaknica sam pratio metodom PCR umnažanjem lokusa CRISPR (vidi poglavlje 3.6.6.). Uzorci u kojima nije došlo do ugradnje nove razmaknice pri elektroforetskoj analizi imaju samo jednu, početnu vrpču, koja predstavlja već prisutnu razmaknicu. Uzorci u kojima je došlo do ugradnje imaju osim početne vrpce i dodatnu vrpču iznad početne, produljenu za otprilike 60 pb, koja odgovara novoj razmaknici.

U soju IIB969 s negativnom kontrolom pBad-HisA sa i bez *pantiCas* nema ugradnje novih razmaknica, što je očekivano (Slika 17A). Ugradnja nove razmaknice vidljiva je u soju IIB969 s plazmidom pTK43. Efikasnost ugradnje nove razmaknice iznosi oko 13 % kad je inducirana samo ekspresija kompleksa Cascade (+ ara), a pada na oko 8 % kad se inducira i ekspresija proteina Cas3 (+ AI) (Slika 17B). Istovremena ekspresija transkripta *antiCas* i kompleksa Cascade blago je pojačala efikasnost ugradnje nove razmaknice na otprilike 14 %. Kod istovremene ekspresije transkripta *antiCas*, kompleksa Cascade i proteina Cas3, efikasnost ugradnje nove razmaknice porasla je na oko 11 %.



Slika 17. Utjecaj transkripta *antiCas* na pripremljenu adaptaciju. **(A)** Produkti reakcije PCR u 2 % agaroznom gelu soja IIB969 (*lacUV5-cas3 araBp8-casA + λT3*) transformiranog s praznim vektorom pBad-HisA ili pTK43 (meta razmaknice λT3), a potom s praznim vektorom pMR18 ili pDM16 (*pantiCas*). Uzorcima je za indukciju dodavana samo arabinoza (+ ara) ili kombinacija arabinoze i IPTG-a (+ Al). Crna strelica pokazuje na produljene vrpce umnoženog lokusa CRISPR. **(B)** Relativni intenzitet pripremljene adaptacije u soju IIB969 transformiranom s pTK43, a potom s pMR18 ili pDM16. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

4.5. Utjecaj proteaze Lon na aktivnost sustava CRISPR-Cas

Moguću ulogu proteaze Lon u regulaciji sustava CRISPR-Cas na post-translacijskoj razini istraživao sam na sličan način kao za protein StpA. Prvo sam istražio može li pojačana ekspresija proteaze Lon utjecati na obranu bakterija od infekcije fagom *λvir* u ovisnosti i neovisno o sustavu CRISPR-Cas. U tu svrhu koristio sam soj IIB1039, koji ima mutaciju u genu *casI*, te dvije anti-lambda razmaknice λT3 i λc u lokusu CRISPR (Slika 7). Ovaj soj ima aktiviran gen *hns* i možemo ga smatrati divljim tipom, jer u njemu protein H-NS inhibira djelovanje sustava CRISPR-Cas. Kao kontrolu sam koristio soj divljeg tipa bakterije *E. coli* BW25113, bez anti-lambda razmaknice (Slika 8). Gen *lon* kloniran je u plazmid pBad-HisA (pMR9, Tablica 2), a prazni vektor pBad-HisA sam koristio kao negativnu kontrolu.

Prema očekivanjima, ekspresija proteaze Lon s plazmida pMR9 (pLon) nije omogućila zaštitu od infekcije fagom *λvir* u soju divljeg tipa, te je broj virusnih čestica na obje temperature bio podjednak negativnoj kontroli, te iznosio oko 4×10^9 (Tablica 13).

Tablica 13. Utjecaj prekomjerne ekspresije proteaze Lon i mutacije u genu *lon* na otpornost stanica na infekciju fagom *λvir* pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Soj	PFU/mL (30 °C) (± st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (± st. dev.) ^a
BW25113 (<i>wt</i>) + pBad-HisA	3,1 x 10⁹ (± 1,8 x 10 ⁹)	4,65 x 10⁹ (± 1,3 x 10 ⁹)
BW25113 (<i>wt</i>) + pMR9 (pLon)	4 x 10⁹ (± 1,9 x 10 ⁹)	4,75 x 10⁹ (± 2,7 x 10 ⁹)
IIB1039 ($\Delta cas1 hns^+ + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	6,09 x 10⁸ (± 6,7 x 10 ⁷)	1,03 x 10⁹ (± 2,6 x 10 ⁸)
IIB1039 ($\Delta cas1 hns^+ + \lambda T3 + \lambda c$) + pMR9 (pLon)	6,44 x 10⁸ (± 1,2 x 10 ⁸)	1,08 x 10⁹ (± 2,3 x 10 ⁸)
IIB855 (Δhns) + pBad-HisA	1,66 x 10⁹ (± 6,3 x 10 ⁸)	4,37 x 10⁹ (± 1,9 x 10 ⁹)
IIB855 (Δhns) + pMR9 (pLon)	~ 10^{3*}	4,84 x 10⁹ (± 2 x 10 ⁹)
IIB1297 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pBad-HisA	~ 10^{3*}	9,53 x 10⁸ (± 3,2 x 10 ⁸)
IIB1297 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) + pMR9 (pLon)	~ 10^{3*}	~ 10^{3*α}
IIB1301 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta lon + \lambda T3 + \lambda c$)	~ 10^{3*}	1,95 x 10⁸ (± 1,1 x 10 ⁸)
IIB1396 ($\Delta hns \Delta lon$)	~ 10^{3*}	5,88 x 10⁸ (± 3 x 10 ⁸)

* Točan broj plakova u nekim slučajevima nije se mogao odrediti jer se nisu formirali pojedinačni plakovi.

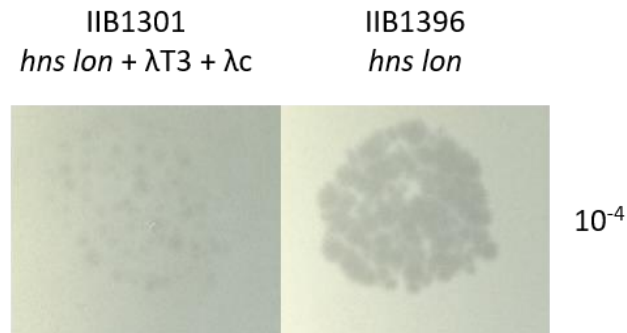
^α) Ovaj rezultat nije se ponovio u sojevima sa sličnom genetičkom pozadinom.

^a) Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Na isti način sam istražio kako utječe prekomjerna ekspresija proteaze Lon na zaštitu od infekcije fagom *λvir* u mutantu Δhns sa i bez anti-lambda razmaknica. Sukladno dosadašnjim rezultatima, mutant Δhns s dvije anti-lambda razmaknice (soj IIB1297, Slika 7) i praznim vektorom bio je imun, odnosno imao je oko šest redova veličine manje virusnih čestica na 30 °C, u odnosu na 37 °C (Tablica 13). Ekspresijom proteaze Lon s plazmida, soj je postao otporan na infekciju fagom *λvir* i na 37 °C jer se smanjio broj virusnih čestica (Tablica 13). Međutim, ovaj rezultat se nije u potpunosti ponovio u sličnim mutantima Δhns s razmaknicama, koji su bili osjetljivi na infekciju na 37 °C, ali su nastali plakovi bili manji i slabo vidljivi (slično kao na slici 18). Neočekivano, prekomjerna ekspresija proteaze Lon omogućila je otpornost na infekciju na 30 °C i u stanicama Δhns bez razmaknica (soj IIB855, Slika 8) (Tablica 13).

Zatim sam napravio sojeve u kojima sam uklonio gen *lon* zajedno s genom *hns*, sa i bez razmaknica (sojevi IIB1301 i IIB1396, Tablica 1, Slike 7 i 8). Unatoč inaktivaciji gena *lon*, dvostruki mutant $\Delta hns \Delta lon$ s dvije anti-lambda razmaknice ostao je otporan na infekciju fagom na 30 °C, i osjetljiv na 37 °C (Tablica 13). Štoviše, i kontrolni mutant $\Delta hns \Delta lon$ bez razmaknica otporan je na infekciju fagom *λvir* na 30 °C i osjetljiv na 37 °C (Tablica 13). Također je tijekom

ovih eksperimenata uočeno da su virusni plakovi nastali na 37 °C u soju $\Delta hns \Delta lon$ s razmaknicama bili manji, mutni i slabo vidljivi u odnosu na soj bez razmaknica (Slika 18).



Slika 18. Promjena morfologije plakova u mutantu Δlon u ovisnosti o aktivnosti sustava CRISPR-Cas. Dvostruki mutant $\Delta hns \Delta lon$ ima mutne i slabo vidljive virusne plakove samo kad je aktivan sustav CRISPR-Cas (lijevo). Plakovi nastali nakon infekcije fagom λvir pri virusnom razrjeđenju 10^{-4} i temperaturi inkubacije od 37 °C u sojevima IIB1301 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta lon + \lambda T3 + \lambda c$) i IIB1396 ($\Delta hns \Delta lon$).

4.6. Utjecaj proteaze Lon na efikasnost transformacije bakterijskih stanica

Jedan od mogućih razloga neobičnog učinka proteaze Lon na izgled i pojavu plakova faga lambda je da proteaza Lon direktno utječe na sam ciklus faga lambda i njegovu mogućnost da stvori virusne čestice [194]. Stoga sam utjecaj delecije gena *lon* na aktivnost sustava CRISPR-Cas pratio preko efikasnosti transformacije s plazmidom pTK43 (koji sam koristio u pripremljenoj adaptaciji). U sojevima u kojima je sustav CRISPR-Cas aktivan, očekivao sam da bi trebalo doći do interferencije, odnosno degradacije plazmida pTK43, a time i manje efikasnosti transformacije.

Kako je detaljno opisano u poglavlju 3.5.7., stanice sam nakon elektroporacije i oporavka nasadio na selektivne podloge te potom inkubirao preko noći na 30 °C i 37 °C. Analizu sam proveo na mutantu Δlon (sojevi IIB1330 i MR23, Slike 7 i 8) i dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta lon$ sa i bez razmaknica (sojevi IIB1301 i IIB1396, Slike 7 i 8). Usporedbom broja naraslih transformanata mogao sam zaključiti kako temperatura inkubacije nije utjecala na efikasnost transformacije (Tablica 14). Efikasnost transformacije značajno je pala u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta lon$ bez razmaknica (soj IIB1396), za oko 100 puta u odnosu na divlji tip. Prisutnost razmaknice u lokusu CRISPR dodatno je smanjila efikasnost transformacije, na ukupno oko

1000 puta manje. Sama mutacija Δlon dovela je do smanjenja efikasnosti transformacije za oko 10 puta, a uz razmaknice oko 100 puta (Tablica 14). Dobiveni rezultati potvrđuju da mutacija Δlon negativno utječe na efikasnost transformacije neovisno o sustavu CRISPR-Cas, a efekt se pojačava dodatkom mutacije u genu *hns*, i još više pojačava dodatkom razmaknica (sustav CRISPR-Cas). Efikasnost transformacije nije sasvim nestala u niti jednom mutantu. Razlog bi mogao biti da u razmaknici $\lambda T3$ motiv PAM nije pravilan što onemogućava potpunu interferenciju.

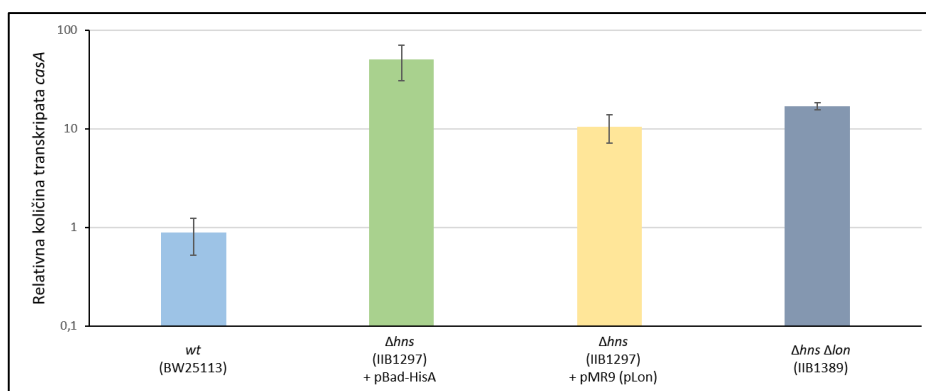
Tablica 14. Utjecaj proteaze Lon i prisutnosti razmaknice $\lambda T3$ u lokusu CRISPR na efikasnost transformacije sojeva s plazmidom pTK43. CFU/mL = broj naraslih stanica po mL uzorka.

Soj	CFU/mL (30 °C) (\pm st. dev.) ^a	CFU/mL (37 °C) (\pm st. dev.) ^a
BW25113 (<i>wt</i>)	3,67 x 10⁶ (\pm 1,8 x 10 ⁶)	3,57 x 10⁶ (\pm 1,9 x 10 ⁶)
IIB1301 ($\Delta hns \Delta lon + \lambda T3 + \lambda c$)	1,68 x 10³ (\pm 5,4 x 10 ²)	5,08 x 10³ (\pm 1,5 x 10 ³)
IIB1396 ($\Delta hns \Delta lon$)	3,9 x 10⁴ (\pm 2,5 x 10 ⁴)	3,91 x 10⁴ (\pm 2,5 x 10 ⁴)
IIB1330 ($\Delta lon + \lambda T3 + \lambda c$)	1,34 x 10⁴ (\pm 6,9 x 10 ³)	4,04 x 10⁴ (\pm 1,7 x 10 ⁴)
MR23 (Δlon)	4,33 x 10⁵ (\pm 1,9 x 10 ⁵)	5,61 x 10⁵ (\pm 4,1 x 10 ⁴)

^a) Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike. U svakoj reakciji je za elektroporaciju korišteno 24 ng plazmida pTK43.

4.7. Utjecaj proteaze Lon na promotor *Pcas8e*

Utjecaj proteaze Lon na količinu transkripata *casA* istražio sam u tri bakterijska soja kao do sad: divlji tip (soj BW25113), mutant Δhns (soj IIB1297) s praznim vektorom pBad-HisA ili plazmidom pLon, te dvostruki mutant $\Delta hns \Delta lon$ (soj IIB1389, Tablica 1). Stanice sam uzgojio do logaritamske faze rasta pri temperaturi inkubacije od 37 °C i izolirao ukupnu RNA. Posve suprotno očekivanjima, prekomjernom ekspresijom proteaze Lon u mutantu Δhns količina transkripata *casA* nije porasla, već se smanjila 5 puta u odnosu na mutanta Δhns s praznim vektorom, i porasla za samo oko 10 puta u odnosu na divlji tip (Slika 19). U dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta lon$, transkripcija gena *casA* se također smanjila u odnosu na mutanta Δhns , i porasla je oko 17 puta u odnosu na divlji tip. Zaključno, količina transkripata gena *casA* u mutantu Δhns smanjila se u oba slučaja, i kad je proteaza Lon bila u suvišku i kad je gen *lon* deletiran.



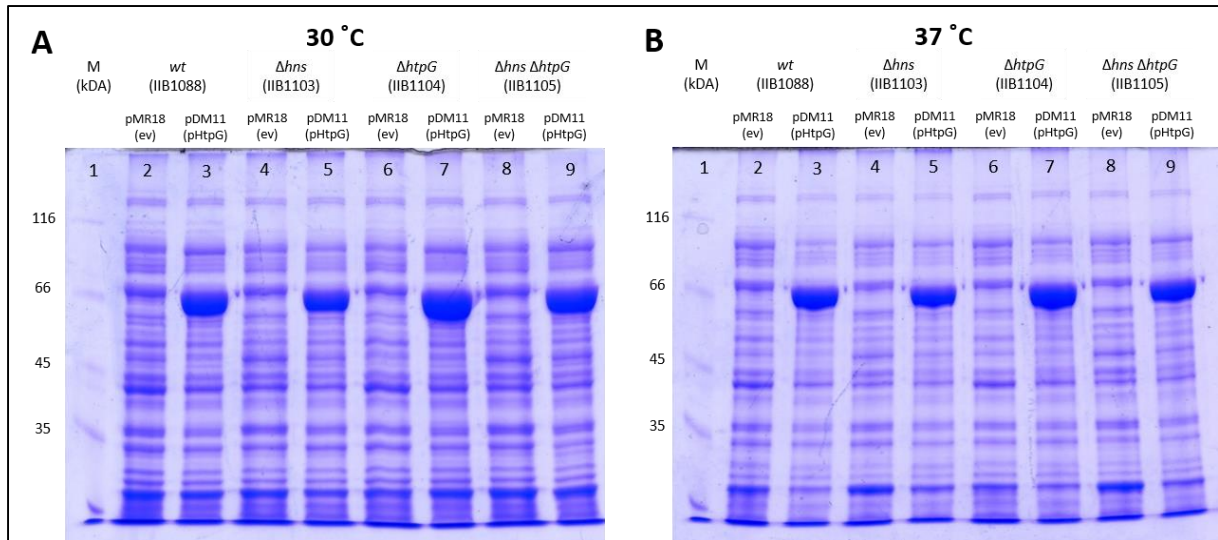
Slika 19. Utjecaj suviška ili nedostatka proteaze Lon na transkripciju gena *casA* s promotora *Pcas8e*. Količina transkripata *casA* dobivena metodom RT-qPCR u sojevima bakterije *E. coli* BW25113 (divlji tip), IIB1389 ($\Delta hns \Delta lon + \lambda T3$), i IIB1297 ($\Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) transformiranom s pBad-HisA ili pLon. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike, a vrijednosti na y osi su prikazane na logaritamskoj skali.

4.8. Utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3

Šaperon HtpG pripada obitelji evolucijski očuvanih, molekularnih šaperona Hsp90 ovisnih o ATP, a sudjeluje u smatanju i preoblikovanju drugih proteina [161,163]. Prijašnja su istraživanja pokazala kako u bakteriji *E. coli* šaperon HtpG modulira aktivnost sustava CRISPR-Cas tako što povećava funkcionalne količine proteina Cas3 i neophodan je za zaštitu stanica od infekcije fagom λvir na 37 °C [91,179]. Da bih istražio na koji način šaperon HtpG utječe na količine proteina Cas3 na dvije temperature, koristio sam četiri različita soja bakterije *E. coli* K-12 BW25113: soj divljeg tipa za gene *hns* i *htpG* (*hns*⁺ *htpG*⁺, soj IIB1088), soj s deletiranim genom *hns* (soj IIB1103), soj s deletiranim genom *htpG* (soj IIB1104) i dvostruki mutant $\Delta hns \Delta htpG$ (soj IIB1105). Dio ovih sojeva sam koristio kad sam određivao ulogu transkripta *antiCas*. Dakle, svi sojevi su imali gen *cas3* koji je bio obilježen histidinskim privjeskom i stavljen pod inducibilni promotor pBad da ne bi bilo razlike u transkripciji gena *cas3* među ovim sojevima (Slika 14). Količinu proteina Cas3 odredio sam imunodetekcijskom metodom *Western blot*, koristeći anti-His antitijelo. Gen *htpG* je kloniran u plazmid pMR18 i također je pod kontrolom promotora pBad (pDM11, Tablica 2), a kao negativnu kontrolu sam koristio prazni vektor pMR18.

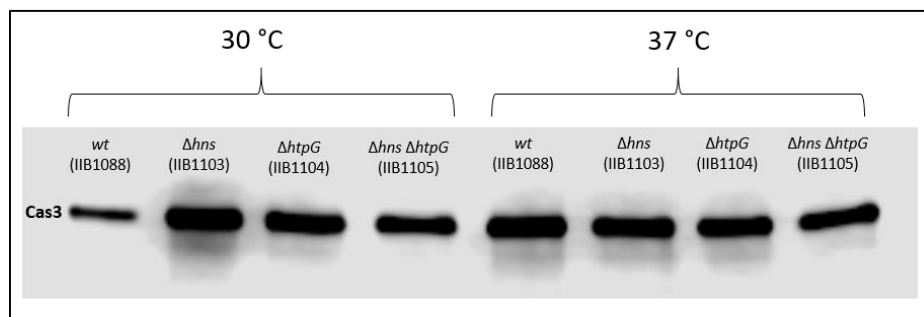
Za izolaciju proteina, stanice sam uzgojio do stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C uz dodatak L-arabinoze (konačna koncentracija 0,2 %) da bih inducirao ekspresiju gena *cas3* s bakterijskog kromosoma i gena *htpG* s plazmida pDM11 (pHtpG). Uspješnost izolacije proteina

sam provjerio metodom SDS-PAGE (Slika 20). Na obje temperature uočljiva je vrpca pojačanog intenziteta na veličini oko 66 kDa u sojevima s plazmidom pHtpG (jažice 3, 5, 7 i 9), dok je nema u sojevima s praznim vektorom pMR18 (jažice 2, 4, 6 i 8). Molekulska veličina ove vrpce odgovara šaperonu HtpG (71 kDa), dok jačina intenziteta u odnosu na prazni vektor potvrđuje pojačanu ekspresiju s plazmida pHtpG.

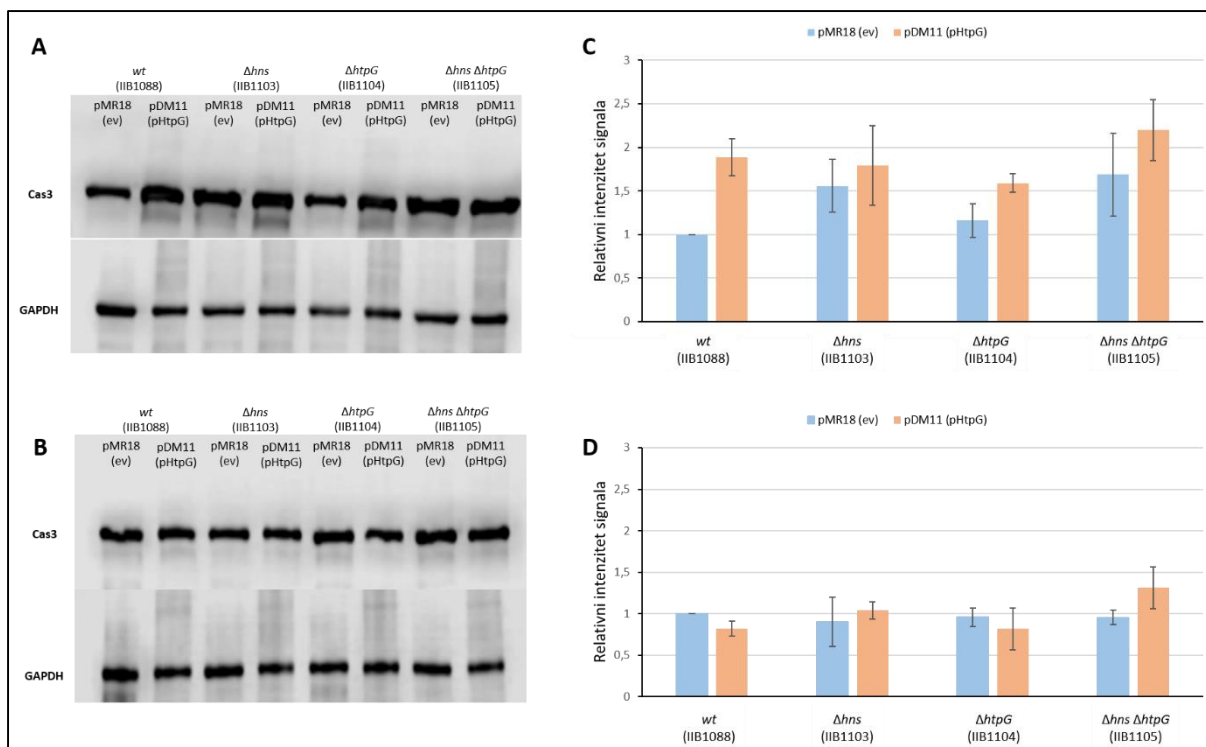


Slika 20. Analiza ekstrakata ukupnih proteina metodom SDS-PAGE. U prvu jažicu (M) nanesen je marker veličina Unstained Protein Molecular Weight Marker (Thermo Fisher Scientific), u jažice 2, 4, 6 i 8 nanesen su proteinski ekstrakti sojeva IIB1088 (*araBp8-cas3 wt*), IIB1103 (*araBp8-cas3 Δhns*), IIB1104 (*araBp8-cas3 ΔhtpG*) i IIB1105 (*araBp8-cas3 Δhns ΔhtpG*) transformiranih s praznim vektorom pMR18 (ev), a u jažice 3, 5, 7 i 9 ekstrakti iz istih sojeva s plazmidom pDM11 (pHtpG). Sojevi su uzgajani do stacionarne faze rasta na (A) 30 °C i (B) 37 °C.

Proteini Cas3 i GAPDH uspješno su detektirani na membrani metodom *Western blot* na isti način kako je opisano ranije (vidi poglavlje 4.3.), a rezultat je prikazan na slici 22A i 22B. Protein Cas3 detektiran je na obje temperature u sličnim količinama u sva četiri soja (Slika 21).



Slika 21. Imunodetekcija proteina Cas3 metodom *Western blot* u izolatu ukupnih proteina iz sojeva IIB1088 (*araBp8-cas3 wt*), IIB1103 (*araBp8-cas3 Δhns*), IIB1104 (*araBp8-cas3 ΔhtpG*) i IIB1105 (*araBp8-cas3 Δhns ΔhtpG*) uzgojenih na 30 °C i 37 °C.



Slika 22. Imunodetekcija proteina Cas3 i GAPDH metodom *Western blot* u izolatu ukupnih proteina iz sojeva IIB1088 (*araBp8-cas3 wt*), IIB1103 (*araBp8-cas3 Δhns*), IIB1104 (*araBp8-cas3 $\Delta htpG$*) i IIB1105 (*araBp8-cas3 $\Delta hns \Delta htpG$*) transformiranih s praznim vektorom pMR18 (ev) ili plazmidom pDM11 (pHtpG), uzgojenih na 30 °C (A) i 37 °C (B). Membrana je nakon prijenosa prerezana na dva dijela koji su potom inkubirani u različitim antitijelima. Grafički prikaz normaliziranih intenziteta kemiluminiscencije za protein Cas3 iz istih sojeva s praznim vektorom pMR18 (ev, plavi stupac) ili plazmidom pDM11 (pHtpG, crveni stupac), uzgojenih na 30 °C (C) i 37 °C (D). Vrijednosti intenziteta signala vrpce proteina Cas3 za svaki soj normalizirane su prema odgovarajućim vrijednostima intenziteta signala vrpce kontrolnog proteina GAPDH, a kao referentni soj za usporedbu intenziteta vrpce poslužio je divlji tip (soj IIB1088) s praznim vektorom pMR18. Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Ekspresijom šaperona HtpG s plazmida uočen je trend porasta količine proteina Cas3 u divljem tipu i mutantu $\Delta htpG$ na 30 °C, ali nije u sojevima s mutacijom Δhns i $\Delta hns \Delta htpG$ (Slika 22A). Kad sam izračunao intenzitete signala kemiluminiscencije i njih normalizirao na intenzitete proteina GAPDH (Slika 22C), u soju divljeg tipa došlo je do povećanja količine proteina Cas3 za oko 2 puta, dok je porast u mutantu $\Delta htpG$ bitno manji i razlikuje se od prethodnih istraživanja [179]. Neočekivano, sama mutacija u genu *hns* podigla je količinu proteina Cas3 u kontrolnim uzorcima, odnosno sojevima s praznim vektorom, na razinu sličnu efektu koji je dala ekspresija šaperona HtpG u divljem tipu stanica. Iz tog razloga se utjecaj

ekspresije šaperona HtpG na količine proteina Cas3 u sojevima s mutacijom Δhns uopće ne uočava. Kod sojeva uzgojenih na 37 °C količine proteina Cas3 su približno jednake u svim sojevima, neovisno o genotipu ili ekspresiji šaperona HtpG s plazmida (Slika 22D).

Kako je mutacija u genu *hns* podigla količinu proteina Cas3 na 30 °C čak i u sojevima s inducibilnim promotorom (Slika 22C), pokušao sam potvrditi ovaj učinak mutacije Δhns na količine proteina Cas3 kad je on eksprimiran s nativnog promotora. Za ovo istraživanje koristio sam soj divljeg tipa bakterije *E. coli* K-12 BW25113 i mutanta Δhns (soj IIB1297, Slika 7), u kojima protein Cas3 nema histidinski privjesak. Za detekciju sam naručio anti-Cas3 primarno antitijelo proizvođača Cusabio Technology, i isprobao različita vremena inkubacije, količine ukupnih proteina, razrjeđenja antitijela, te uređaje za detekciju (Tablica 10). Nažalost, nakon optimizacije detekcije signala ni u jednom pokušaju nije bilo vidljivih vrpce koje bi odgovarale proteinu Cas3, što sugerira kako su endogene količine proteina Cas3 eksprimirane s nativnog promotora preniske za detekciju ovom metodom (rezultati nisu prikazani).

4.9. Utjecaj enzimatskih aktivnosti šaperona HtpG na aktivnost proteina Cas3 u zaštiti od infekcije fagom λvir

Budući da točan način interakcije šaperona HtpG s proteinom Cas3 trenutno nije poznat, odlučio sam istražiti hoće li inaktiviranje neke od funkcija šaperona HtpG imati utjecaja na aktivnost sustava CRISPR-Cas. Iz literature sam izabrao dvije točkaste mutacije u šaperonu HtpG za koje je pokazano da imaju utjecaja na hidrolizu ATP-a (zamjena glutamata u alanin, E34A) i vezanje proteinskih supstrata (zamjena triptofana u arginin, W467R) [166,167]. Pretpostavio sam da bi jedna od ovih aktivnosti mogla biti važna u interakciji s proteinom Cas3.

Da bih istražio učinak ovih mutacija na efikasnost infekcije fagom λvir , koristio sam gore spomenuti soj IIB1066. Koristeći metodu ciljane mutageneze (vidi poglavlje 3.6.5.), napravio sam točkaste mutante *htpG*^{E34A} i *htpG*^{W467R} u plazmidu pBAD18-HtpG (plazmidi pDM9 i pDM10, Tablica 2). Komplementacijom kromosomske mutacije $\Delta htpG$ s točkastim mutantima šaperona HtpG s plazmida mogao sam istražiti njihov utjecaj na aktivnost sustava CRISPR-Cas. Kao pozitivnu kontrolu sam koristio plazmid pBAD18-HtpG koji sadrži divlji tip gena *htpG*, a kao negativnu kontrolu prazni vektor pBAD18.

Soj IIB1066 s praznim vektorom osjetljiv je na infekciju fagom λvir na obje temperature inkubacije, 30 °C i 37 °C (Tablica 15). Isti soj s induciranom ekspresijom divljeg tipa šaperona

HtpG s plazmida otporan je na infekciju samo na 30 °C, što je u skladu s prijašnjim istraživanjima [91]. Ekspresija bilo kojeg od dva točkasta mutanta šaperona HtpG u ovome soju uspostavila je otpornost na infekciju fagom λ vir na 30 °C, ali nije na 37 °C (Tablica 15).

Tablica 15. Utjecaj točkastih mutacija šaperona HtpG na zaštitu bakterija protiv infekcije fagom λ vir pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Soj	PFU/mL (30 °C) (\pm st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (\pm st. dev.) ^a
IIB1066 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta htpG + \lambda T3 + \lambda c$) + pBAD18	1,31 x 10⁸ ($\pm 4,8 \times 10^7$)	1,6 x 10⁹ ($\pm 8,1 \times 10^8$)
IIB1066 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta htpG + \lambda T3 + \lambda c$) + pBAD18-HtpG	~ 10³*	1,1 x 10⁹ ($\pm 5 \times 10^8$)
IIB1066 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta htpG + \lambda T3 + \lambda c$) + pDM9 (HtpG ^{E34A})	~ 10³*	1,57 x 10⁹ ($\pm 6,5 \times 10^8$)
IIB1066 ($\Delta cas1 \Delta hns \Delta htpG + \lambda T3 + \lambda c$) + pDM10 (HtpG ^{W467R})	~ 10³*	1,53 x 10⁹ ($\pm 4,8 \times 10^8$)

* Točan broj plakova u nekim slučajevima nije se mogao odrediti jer se nisu formirali pojedinačni plakovi.

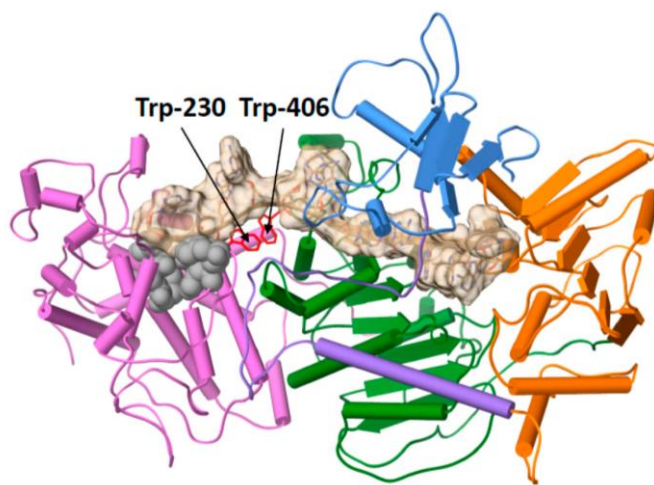
^a) Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

4.10. Utjecaj promjene konformacije na aktivnost proteina Cas3

U poglavlju 4.8. pokazao sam da su intenziteti signala za protein Cas3 bili slični na obje temperature u sva četiri mutanta (Slika 21), što je upućivalo da razlog neaktivnosti sustava CRISPR-Cas na 37 °C nije smanjenje količine proteina Cas3, već smanjenje aktivnosti uslijed moguće promjene konformacije.

Kako bi se istražila ova pretpostavka, istraživanja su napravljena u suradnji nekoliko laboratorija. Prvo je analizirano može li temperatura inducirati promjene u sekundarnoj strukturi proteina Cas3. To je istraženo mjerenjem promjene eliptičnosti metodom cirkularnog dikroizma (engl. *circular dichroism*, CD) na valnoj duljini od 222 nm prilikom zagrijavanja pročišćenog proteina Cas3 od 20 °C do 55 °C (rezultati nisu prikazani). Ta istraživanja napravile su kolegica dr. sc. Dora Markulin u suradnji s dr. sc. Marijom Matković s Instituta Ruđer Bošković, a dijelovi ovih istraživanja napravljeni su u sklopu diplomskih radova diplomantica Anje Čulo i Marte Pandžić. Na temelju tri neovisna mjerenja pokazale su da sigmoidalne krivulje dobivene pomoću Boltzmanove funkcije imaju točku infleksije na ~ 35 °C. Ta temperatura bila je u skladu s temperaturom kad su se prvi put uočili plakovi na bakterijskoj livadi soja IIB1040 ($\Delta cas1 \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$, Slika 7), pri kojoj vjerojatno dolazi

do gubitka aktivnosti proteina Cas3. Analizom rezultata CD pomoću servera DichroWeb i BeStSel uočena je značajna promjena u sadržaju α -zavojnica i β -ploča [182]. U suradnji s prof. dr. sc. Branimirom Bertošom s Kemijskog odsjeka PMF-a (Sveučilište u Zagrebu), napravljena je 3D struktura proteina Cas3 iz bakterije *E. coli* (Slika 23) na temelju poznate kristalne strukture proteina Cas3 iz bakterije *T. fusca* [22] i predložene su tri α -zavojnice za detaljnije istraživanje. Odabrani su triptofani W230 i W406 za koje je uočeno da su evolucijski očuvani, i triptofani W149 i W152 koji se nalaze na istoj α -zavojnici i manje su očuvani (Slika 24). Mjesno specifičnom mutagenezom napravljeni su točkasti mutanti, u kojima je triptofan zamijenjen alaninom u genu *cas3* na plazmidu ($\text{Cas3}^{\text{W149A}}$, $\text{Cas3}^{\text{W152A}}$, $\text{Cas3}^{\text{W230A}}$ i $\text{Cas3}^{\text{W406A}}$). U suradnji s prof. dr. sc. Boltom sa Sveučilišta u Nottinghamu (Ujedinjeno Kraljevstvo), isti točkasti mutanti proteina Cas3 su pročišćeni i biokemijski karakterizirani. Kolegica Zoe Jelić Matošević iz grupe prof. dr. sc. Bertoše napravila je simulacije molekularne dinamike mutanata, a ja sam istražio utječu li točkaste mutacije u Trp-149, Trp-152, Trp-230 i Trp-406 na aktivnost proteina Cas3, odnosno na zaštitu od infekcije fagom λ vir.



Slika 23. Struktura proteina Cas3 napravljena na temelju poznate kristalne strukture bakterije *T. fusca*. Označeni su evolucijski očuvani Trp-230 i Trp-406, a smeđom bojom je označeno kretanje molekule ssDNA. Označene su domene proteina Cas3: HD-nukleazna (roza), RecA1 i RecA2 helikazne (zelena i narančasta), zavojnica koja spaja domene (ljubičasta) i C-terminalna domena (plava). Sive kuglice označavaju aminokiseline u aktivnom mjestu HD-nukleazne domene. Preuzeto i prilagođeno iz [182].

W149 W152

Tfu	ALPSLGYPNGGLV	TGLVAQMLGGHGT	FHPHP-SFQSRNPLAEFGFSSPHWEKQ-RHALLHAVFDAT-GR
Tter	VLA-DVFGLSGRS	ARWVAFAVGGHHGFVPSYD-EV--RRDLDQQAVGWMWDAA-REVLCCRLADAL-GL	
Eco	FDAA-PHPY-ESWFPWV	EAVTGHGGFILHSQDQKSRWEMPASLASYAAQDKQAREEWIS-VLEALFLT	
Pozicija u sekvenci	140	150	160 W230 170 180 190 200
Tfu	PT--PPDMLDGP	TASVVCGLVILAD	WLVSQEDFLLERLTSLPADGGSASALRAHFETSLRRIP---SLLDA
Tter	PGSSRPTVES	TPDAFMLAGLVSA	DWIGSNEEYFPYAAQSALQVPQ-LDAEAYLERAMRQAERAMASLGW
Eco	PAGLSINDIP	DCSSLLAGFCSLA	DWLGSWTTNTLFLNED-APSDINALRTYFQDRQQDASRVLELSGL
Pozicija u sekvenci	210	220	230 240 250 260 270
Tfu	RPGRFLALPT	MATADQMHTRL	KEYARYRVENTDLPRS-----STLALLHSMAWLNPDYAPADLPGVSKV
Tter	MSGCYFALP	TMATSNQMFGR	VDYLRHRYPEDVVVNLVHGHSDL SALLQELRQK--GEEIFQLQGVYDE
Eco	ADSVIFALP	TQATANAMLT	RMEASASHLFSSPNLI--LAHGNSRFNHLFQSIKSRA-----
Pozicija u sekvenci	340	350 W406	360 370 380 390
Tfu	LSNLGHR-DP	FAATDWLMG-R	KRGLLAPWAVGTIDQALMAVLRKHNALRLFGLAGKVVVVDEAHAVDPY
Tter	ALGDEQL-G	AVVAGQWFT	R-GKRALLPPYGVGTVDQALLAVLQVKHVFVRLFALSTKTVIVDEVHAYDYY
Eco	ITEQGQEEA	WVQCQWLSQ	SNKKVFLGQIGVCTIDQVLSVLPVKHRFIRGLGIGRSVLIIVDEVHAYDYY
Pozicija u sekvenci	400	410	420 430 440 450

Slika 24. Sravnjivanje sekvenci proteina Cas3 između bakterija *T. fusca* (Tfu), *T. terrenum* (Tter) i *E. coli* (Eco) otkrilo je dva evolucijski očuvana triptofana W230 i W406, dok triptofani W149 i W152 nisu toliko očuvani. Preuzeto i prilagođeno iz [182].

Prvo sam koristio soj bakterije *E. coli* BL21-AI s deletiranim genom *cas1* i dvije anti-lambda razmaknice λ T3 i λ c (soj IIB1266, Tablica 1, Slika 7). Soj IIB1266 ima divlji tip gena *cas3* u kromosomu, ali i aktivan gen *hns*, pa je transkripcija svih gena *cas* inhibirana djelovanjem proteina H-NS, te je stoga soj osjetljiv na infekciju na 30 °C. To znači da sam sustav CRISPR-Cas u ovom soju morao aktivirati prekomjernom ekspresijom svih potrebnih komponenti s plazmida, uključujući i protein Cas3. Za točkaste mutante Cas3^{W149A}, Cas3^{W152A}, Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A} koristio sam plazmide pW149A, pW152A, pIIB37 i pIIB39 (Tablica 2), a za ekspresiju proteinskog kompleksa Cascade koristio sam plazmid pEB549 (Tablica 2). Kao pozitivnu kontrolu sam koristio plazmid pAH4 koji nosi divlji tip gena *cas3*, a prazni vektor pBad-HisA kao negativnu kontrolu.

U skladu s očekivanjima, soj IIB1266 s praznim vektorom pBad-HisA, u kojem je eksprimiran samo proteinski kompleks Cascade, osjetljiv je na infekciju fagom λ vir na 30 °C i razvio je oko 10⁸ virusnih čestica (Tablica 16). Ovo je ujedno i dokaz kako se kromosomski gen *cas3* u ovom soju ne prepisuje u količinama dovoljnim za obranu od infekcije. Kad se uz proteinski kompleks Cascade potakne i ekspresija divljeg tipa proteina Cas3 ili točkastih mutanata Cas3^{W149A} i Cas3^{W152A}, uspostavljena je otpornost na infekciju na 30 °C, te je nastalo oko 3-4 reda veličine manje virusnih čestica u odnosu na negativnu kontrolu. Soj IIB1266 s induciranom ekspresijom točkastog mutanta Cas3^{W230A} ili Cas3^{W406A} imao je otprilike tri reda veličine veći broj plakova na 30 °C u odnosu na divlji tip proteina Cas3, te samo oko 10 puta manje od negativne kontrole. Ovi rezultati ukazuju na smanjenu aktivnost točkastih mutanata Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A} na 30 °C. Nijedna kombinacija plazmida nije omogućila otpornost na

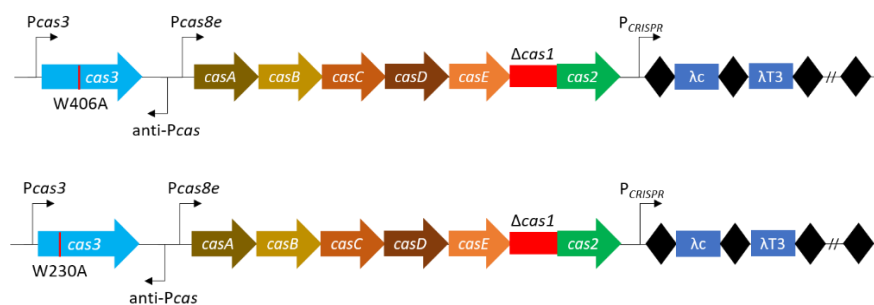
infekciju fagom *λvir* na 37 °C, te je broj nastalih plakova podjednak (oko 10⁹) u svim slučajevima.

Tablica 16. Utjecaj točkastih mutacija Cas3^{W149A}, Cas3^{W152A}, Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A} na plazmidu na zaštitu bakterija protiv infekcije fagom *λvir* pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

Soj	PFU/mL (30 °C) (± st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (± st. dev.) ^a
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pBAD-HisA	7,61 x 10⁸ (± 3,1 x 10 ⁸)	1,71 x 10⁹ (± 5 x 10 ⁸)
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pAH4 (Cas3 ^{wt})	3,4 x 10⁴ (± 4,7 x 10 ⁴)	1,25 x 10⁹ (± 2,5 x 10 ⁸)
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pW149A (Cas3 ^{W149A})	4 x 10⁵ (± 4,2 x 10 ⁵)	8,92 x 10⁸ (± 3,3 x 10 ⁸)
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pW152A (Cas3 ^{W152A})	6 x 10⁵ (± 3,7 x 10 ⁵)	2,47 x 10⁹ (± 1,4 x 10 ⁹)
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pIIB37 (Cas3 ^{W230A})	2,27 x 10⁷ (± 2,2 x 10 ⁷)	3,26 x 10⁹ (± 6,2 x 10 ⁸)
IIB1266 + pEB549 (pCascade) + pIIB39 (Cas3 ^{W406A})	1,63 x 10⁷ (± 1,1 x 10 ⁷)	1,94 x 10⁹ (± 2 x 10 ⁹)

^{a)} Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Pošto su rezultati određivanja efikasnosti infekcije fagom *λvir* u sojevima bakterije *E. coli* BL21-AI s dva plazmida znali biti nepouzdana, a bakterijski soj BL21-AI nije najbolji za usporedbu sa sojem K-12 u kojem su rađena ostala genetička istraživanja, odlučio sam dodatno provjeriti utjecaj ovih mutacija na aktivnost proteina Cas3. Napravio sam mutante u kojima su iste točkaste mutacije unesene u gen *cas3* na bakterijskom kromosomu (vidi poglavlje 3.5.4.). Napravio sam sva četiri točkasta mutanta, ali sam za daljnju analizu odabrao samo mutante *cas3*^{W230A} i *cas3*^{W406A} (sojevi IIB1345 i IIB1342, Tablica 1, Slika 25), na temelju biokemijskih istraživanja *in vitro* i simulacije *in silico*, opisanih kasnije u ovom poglavlju.



Slika 25. Genska organizacija sustava CRISPR-Cas u sojevima bakterije *E. coli* IIB1342 i IIB1345. Oba soja imaju deleciju gena *cas1* i točkastu mutaciju u genu *cas3* (*cas3*^{W406A} ili *cas3*^{W230A}), te razmaknice *λT3* i *λc* dodane u lokus CRISPR.

Početni (roditeljski) soj IIB1309 (Tablica 1, Slika 7) je nakon infekcije fagom *λvir* imao otprilike šest redova veličine manje virusnih čestica na 30 °C, u odnosu na 37 °C, što je u skladu s prijašnjim rezultatima za mutanta *Δhns* (Tablica 17). Međutim, kad su se u ovaj soj uvele točkaste mutacije Cas3^{W230A} ili Cas3^{W406A}, izgubila se otpornost na infekciju fagom *λvir* na 30 °C, te je broj virusnih čestica u oba točkasta mutanta porastao za čak pet redova veličine u odnosu na soj s divljim tipom proteina Cas3. Efekt točkastih mutacija na aktivnost proteina Cas3 još je izraženiji u ovome soju nego u prethodnom pokusu s plazmidima, vjerojatno zbog toga što je u ovome soju protein Cas3 prisutan u fiziološkim količinama, a ne u suvišku, gdje su prekomjerne količine proteina Cas3 potencijalno mogle ublažiti negativni učinak mutacija. Na 37 °C sva tri soja su osjetljiva na infekciju, te je broj nastalih plakova između njih podjednak (oko 10⁹). Ovi rezultati su u skladu s rezultatima dobivenim za soj IIB1266 i točkaste mutante proteina Cas3 na plazmidu.

Tablica 17. Utjecaj kromosomskih točkastih mutacija Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A} na zaštitu bakterija protiv infekcije fagom *λvir* pri temperaturama inkubacije od 30 °C i 37 °C.

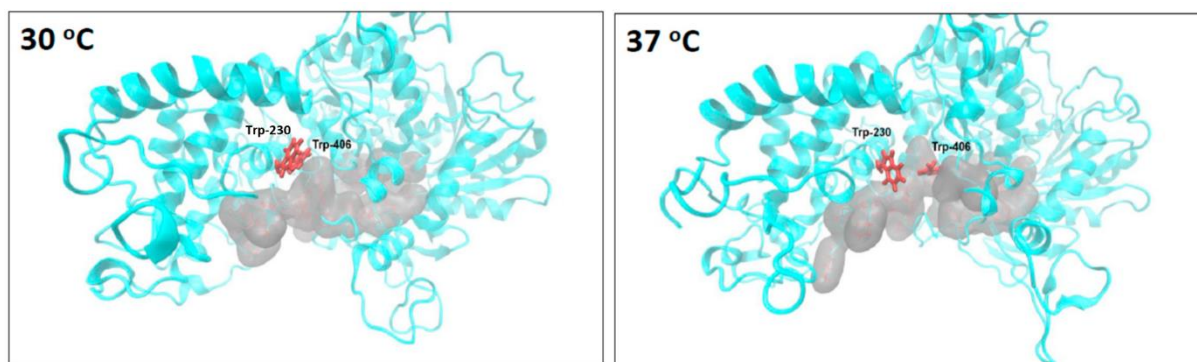
Soj	PFU/mL (30 °C) (± st. dev.) ^a	PFU/mL (37 °C) (± st. dev.) ^a
IIB1309 (<i>Δcas1 Δhns cas3^{wt}</i> + <i>λT3</i> + <i>λc</i>)	~ 10 ³ *	3,85 x 10 ⁹ (± 1,6 x 10 ⁹)
IIB1342 (<i>Δcas1 Δhns cas3^{W406A}</i> + <i>λT3</i> + <i>λc</i>)	5,98 x 10 ⁸ (± 5,9 x 10 ⁸)	3,02 x 10 ⁹ (± 1,7 x 10 ⁹)
IIB1345 (<i>Δcas1 Δhns cas3^{W230A}</i> + <i>λT3</i> + <i>λc</i>)	2,59 x 10 ⁸ (± 2,1 x 10 ⁷)	3,69 x 10 ⁹ (± 9,7 x 10 ⁸)

* Točan broj plakova u nekim slučajevima nije se mogao odrediti jer se nisu formirali pojedinačni plakovi.

^{a)} Prikazana je srednja vrijednost i standardna devijacija dobivena iz tri replike.

Učinak točkastih mutacija Cas3^{W149A}, Cas3^{W152A}, Cas3^{W230A} i Cas3^{W406A} na aktivnost proteina Cas3 istražila je kolegica dr. sc. Liu He iz grupe prof. dr. sc. Bolta [182]. Ona je pokazala da porastom temperature na 37 °C nukleazna aktivnost divljeg tipa proteina Cas3 značajno pada. Nukleazna aktivnost točkastih mutanata Cas3^{W149A}, Cas3^{W152A} i Cas3^{W230A} je na obje temperature znatno niža od divljeg tipa. Iznenadujuće, mutant Cas3^{W406A} imao je nukleaznu aktivnost sličnu divljem tipu na 30 °C, dok je na 37 °C jača nukleaza (hiperaktivan) u odnosu na divlji tip (rezultati nisu prikazani). Ovi rezultati su pokazali kako točkasta mutacija u Trp-406 može nadjačati negativan učinak temperature na nukleaznu aktivnost proteina Cas3, što sugerira kako bi u divljem tipu proteina Cas3 Trp-406 mogao regulirati nukleaznu aktivnost ovisno o temperaturi. Za razliku od nukleazne aktivnosti, temperatura nije imala učinak na ATP-aznu aktivnost proteina Cas3.

Kolegica Zoe Jelić Matošević napravila je simulacije molekularne dinamike na 30 °C i 37 °C, prema metodama opisanim u [182]. U simulaciji molekularne dinamike na 30 °C, ona je pokazala da se Trp-406 nalazi blizu Trp-230, a oba se nalaze pokraj tunela kroz koji prolazi ssDNA (engl. *ssDNA binding tunnel*), a koji povezuje helikaznu domenu s aktivnim mjestom nukleazne domene (Slika 26). Međutim, povišenjem temperature na 37 °C, Trp-406 se udaljava od Trp-230 i pozicionira unutar tunela, što bi potencijalno moglo ograničiti pristup ssDNA aktivnom mjestu nukleazne domene. Ovaj model pruža objašnjenje zašto protein Cas3 pokazuje smanjenu nukleaznu aktivnost na 37 °C u usporedbi s 30 °C. Također, hiperaktivna nukleazna aktivnost točkastog mutanta Cas3^{W406A} na 37 °C objašnjiva je time što bi zamjena Trp-406 s alaninom omogućila slobodan prolaz ssDNA do aktivnog mjesta nukleazne domene. Zanimljivo, unatoč pojačanoj nukleaznoj aktivnosti *in vitro*, točkasti mutant Cas3^{W406A} ne može stanicama omogućiti zaštitu od infekcije fagom *λvir in vivo* jer je izgubio komunikaciju s kompleksom Cascade (rezultati nisu prikazani), što ću prodiskutirati u raspravi (Tablice 16 i 17).



Slika 26. Povišena temperatura uzrokuje promjene u položaju Trp-230 i Trp-406 (označeni crvenom bojom), što rezultira pomakom Trp-406 i blokadom tunela kroz koji prolazi ssDNA (prikazan sivom bojom), što potencijalno može ograničiti pristup ssDNA aktivnom mjestu nukleazne domene. Preuzeto i prilagođeno iz [182].

4.11. Utjecaj delecije gena *hns* na transkriptom bakterije *E. coli*

Kako sam već naveo, sustav CRISPR-Cas je u bakteriji *E. coli* reguliran proteinom H-NS [25]. Budući da je protein H-NS globalni transkripcijski regulator u bakteriji *E. coli* [88], istražio sam kako delecija gena *hns* utječe na ekspresiju svih gena u genomu bakterije *E. coli* koji su pod njegovom regulacijom koristeći metodu RNAseq. Ova metoda omogućuje kvantifikaciju i analizu diferencijalno eksprimiranih gena iz uzorka ukupne RNA [195]. Kao

divlji tip za ovo istraživanje koristio sam soj bakterije *E. coli* K-12 BW25113 s uklonjenim genom *casI* i dvije anti-lambda razmaknice (soj IIB1039, Tablica 1, Slika 7). Za usporedbu sam koristio mutanta Δhns s istom genetičkom pozadinom kao i soj IIB1040 (Tablica 1, Slika 7). Ukupnu RNA sam izolirao iz ova dva soja uzgojena do stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C u tri biološke replike, čime sam istovremeno pratio i utjecaj promjena u temperaturi inkubacije na transkripciju gena. Izoliranu RNA sam poslao u suhom ledu u servis MacroGen (Južna Koreja), gdje su provjerili kvalitetu RNA, napravili biblioteku, sekvencirali i obradili podatke. Kao rezultat sam dobio Excel tablice s količinama transkripata za svaki gen u svakoj replici, te normalizirane rezultate u ovisnosti o temperaturi i genotipu (rezultati nisu prikazani).

Analizom podataka između mutanta Δhns i divljeg tipa utvrđeno je čak 1166 gena sa značajnim promjenama u ekspresiji na 30 °C, te 976 gena na 37 °C. Na 30 °C najveći porast transkripcije u mutantu Δhns ima gen *csgA* (9822 puta), a najveći pad gen *hmp* (64 puta) (Tablica 18). Najveći porast transkripcije u mutantu Δhns na 37 °C ima gen *yaiP* (2141 puta), a najveći pad gen *glcE* (19 puta). Među genima *cas*, u mutantu Δhns je na obje temperature porasla transkripcija gena *cas3*, *casD* i *casE*, dok je transkripcija gena *cas2* nepromijenjena. Geni *casA*, *casB* i *casC* nisu pronađeni tijekom računalne analize usporedbe ekspresije gena u sojevima Δhns u odnosu na divlji tip na dvije temperature, dok je gen *casI* bio deletiran i nije se mogao analizirati. Pregledom baza podataka EcoCyc i UniProt za nekoliko je gena pretpostavljeno da bi mogli biti u interakciji s komponentama sustava CRISPR-Cas, te su oni dalje analizirani, ali to nije bila tema ove doktorske disertacije.

Tablica 18. Promjene u transkripciji gena između sojeva IIB1040 ($\Delta casI \Delta hns + \lambda T3 + \lambda c$) i IIB1039 ($\Delta casI + \lambda T3 + \lambda c$) na 30 °C i 37 °C, dobiveni metodom sekvenciranja RNA.

Gen	Promjena u transkripciji gena ($\Delta hns / wt$)	
	30 °C	37 °C
<i>csgA</i>	+ 9822,7	+ 27,7
<i>hmp</i>	- 64,7	- 2,1
<i>yaiP</i>	+ 32,1	+ 2141,9
<i>glcE</i>	- 15,6	- 19,6
<i>cas2</i>	- 1,4	- 1,3
<i>cas3</i>	+ 15,3	+ 14,7
<i>casD</i>	+ 73,7	+ 37,7
<i>casE</i>	+ 59,6	+ 31,9

5. RASPRAVA

Cilj ove doktorske disertacije bio je istražiti nepoznate mehanizme regulacije aktivnosti sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* na razini transkripcije i post-translacije. Na razini transkripcije istražio sam ulogu proteina StpA kao dodatnog represora promotora *Pcas8e* koji kontrolira ekspresiju operona *casABCDE12* i utjecaj transkripta *antiCas*, koji je pod kontrolom promotora *anti-Pcas*, na transkripciju gena *cas3*. Pokazao sam da protein StpA sudjeluje u regulaciji promotora *Pcas8e* kad nema represora H-NS [181], i da transkript *antiCas* može utjecati na aktivnost produkta gena *cas3*. Na razini post-translacije istražio sam utjecaj proteaze Lon kao indirektnog regulatora transkripcije. Također sam istražio utjecaj šaperona HtpG na količine proteina Cas3 i istražio kako temperatura utječe na aktivnost proteina Cas3. U istraživanjima sam koristio genetičku analizu kako bih pomoću različitih mutanata otkrio potrebne gene i uvjete u zaštiti bakterija sustavom CRISPR-Cas od infekcije fagom *λvir*. Metodom RT-qPCR određivao sam količine transkripata gena *cas*, a metodom *Western blot* na razini proteina određivao količine proteina Cas3. Uz pomoć suradnika napravljene su biofizičke i biokemijske analize na temelju kojih smo predložili molekularni model regulacije nukleazne aktivnosti proteina Cas3 uslijed promjene konformacije [182].

5.1. Utjecaj proteina StpA na regulaciju promotora *Pcas8e*

Za efikasnu obranu stanica od stranih genetičkih elemenata pomoću sustava CRISPR-Cas, potrebni su produkti gena *cas* i razmaknica u lokusu CRISPR koja je komplementarna sekvenci te strane molekule DNA [1–3]. U bakteriji *E. coli* sustav CRISPR-Cas pripada klasi 1, sustavu tipa I-E i reguliran je pomoću tri promotora: *Pcas3*, *Pcas8e* i P_{CRISPR} [7,8,25]. Četvrti promotor *anti-Pcas* je nepoznate aktivnosti i uloge, a nalazi se u intergenskoj regiji IGLB na suprotnom lancu DNA u odnosu na promotor *Pcas8e* (Slika 4). Ekspresija komponenti sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* je utišana aktivnošću represora H-NS, zbog čega u standardnim laboratorijskim uvjetima uzgoja sustav CRISPR-Cas nije aktivan [8,25,86]. Represor H-NS snažno utišava ekspresiju s promotora *Pcas8e* (kontrolira operon *casABCDE12*) i *anti-Pcas*, dok transkripcija lokusa CRISPR i gena *cas3* samo djelomično ovisi o proteinu H-NS (Slika 4) [25,87,91]. Osim negativne regulacije represorom H-NS, promotor *Pcas8e* je pozitivno reguliran proteinom LeuO (poznati antagonist represora H-NS) [94]. Naime, protein LeuO je aktivator transkripcije i njegovom prekomjernom ekspresijom dolazi do ekspresije gena *cas* [86]. Postoji i regulacija ovog sustava pomoću cAMP receptorskog proteina CRP, ali ću to

ovdje izostaviti jer je nisam istraživao [92]. Drugim riječima, da bi se sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* aktivirao potrebno je ili ukloniti represor (soj Δhns), ili prekomjerno eksprimirati aktivator LeuO (dodati na plazmidu) ili napraviti soj s inducibilnim promotorima ispred gena *cas* na kromosomu [2,10,86]. Prethodna istraživanja su pokazala kako je u stanicama s prekomjernom ekspresijom aktivatora LeuO količina transkripata *casABCDE* bila značajno veća nego u mutantu Δhns , što je dovelo do prijedloga da paralog proteina H-NS, protein StpA, također ima ulogu regulacije transkripcije s promotora *Pcas δ e* u odsutnosti proteina H-NS [86]. Zanimljivo, istraživanja su pokazala da protein StpA čak ima veći afinitet vezanja *in vitro* za regiju IGLB, u kojoj se nalaze promotori *Pcas δ e* i anti-*Pcas*, od proteina H-NS [25], ali utjecaj proteina StpA na aktivnost sustava CRISPR-Cas nije bio istražen do ove doktorske disertacije. Proteini H-NS i StpA jedan drugom inhibiraju transkripciju, pa je gen *stpA* utišan u stanicama s aktivnim proteinom H-NS, odnosno stanicama divljeg tipa [27–29]. Inaktivacija samo gena *stpA* zbog toga ne dovodi do povećanja ekspresije gena *cas* u mutantu $\Delta stpA$ [25]. Iz ovih razloga sam ulogu proteina StpA kao dodatnog represora operona *casABCDE12* i promotora anti-*Pcas* istražio u mutantu Δhns .

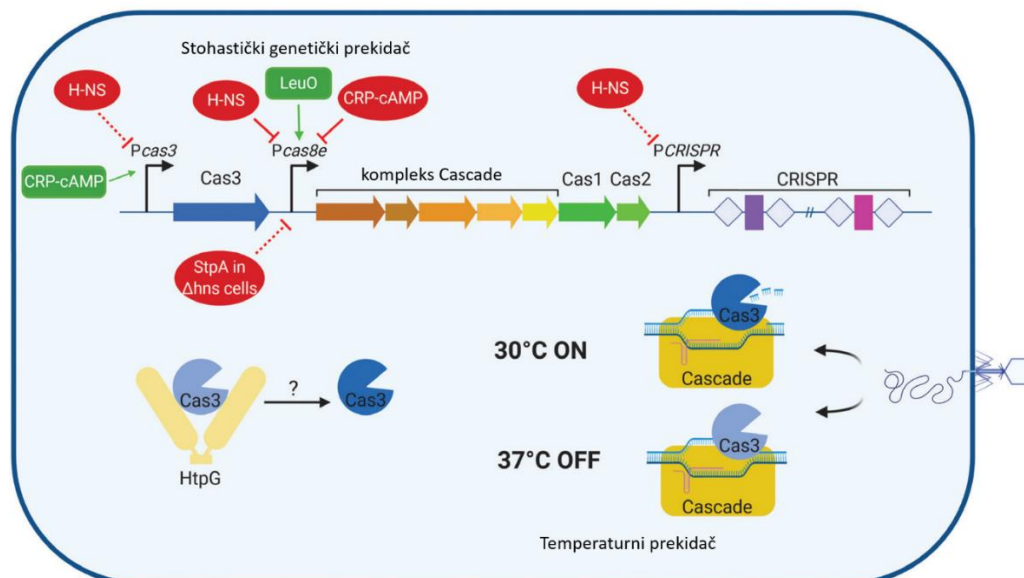
Utjecaj proteina StpA na regulaciju promotora *Pcas δ e* pratio sam direktno mjerenjem količine transkripata *casA* (ili *cse1*, prvog gena u operonu *cas*) i indirektno određivanjem zaštite stanica od infekcije fagom λvir u mutantu Δhns sa i bez gena *stpA*. Kao kontrole, određivao sam količine transkripata gena *cas3*, za koji nije očekivano da je pod kontrolom proteina StpA. Također sam sustav CRISPR-Cas inducirao aktivatorom LeuO, te koristio soj s inducibilnim promotorima ispred gena *cas3* i operona *cas*. U skladu s prijašnjim rezultatima [91], mutant Δhns s dvije anti-lambda razmaknice bio je otporan na infekciju fagom λvir na 30 °C, a osjetljiv na 37 °C (Tablica 11). Ekspresija proteina StpA s plazmida u istom mutantu značajno je smanjila (približno na razinu kontrolnog soja) otpornost na infekciju fagom λvir na 30 °C (Tablica 11), i smanjila je transkripciju s promotora *Pcas δ e* (Slika 9B). Nasuprot tomu, istovremena delecija gena *stpA* u mutantu Δhns dovela je do maksimalne ekspresije transkripata *casA* (povećanje od oko 250 puta, Slika 9B). Induciranom ekspresijom aktivatora LeuO u stanicama divljeg tipa [86], količine transkripata *casA* su bile nešto niže u odnosu na dvostruki mutant $\Delta hns \Delta stpA$ (povećanje za oko 150 puta, Slika 9B), ali više u odnosu na jednostrukog mutanta Δhns (povećanje za oko 50 puta, Slika 9B) što je povećalo otpornost stanica na infekciju fagom λvir na 30 °C. Protein StpA nije imao učinak na transkripciju s promotora *Pcas3* (Slika 9A), što je u skladu s činjenicom da protein H-NS tek djelomično regulira ekspresiju gena *cas3* [91]. Također, protein StpA nije značajno smanjio otpornost stanica na infekciju

fagom λvir u soju u kojem su nativni promotori *Pcas3* i *Pcas8e* zamijenjeni inducibilnim, jer ovi promotori ne ovise o represoru StpA (Tablica 11). Na temelju svih ovih rezultata sam zaključio kako protein StpA djeluje na razini transkripcije kao dodatni represor promotora *Pcas8e* u nedostatku proteina H-NS jer je njegovom povećanom ekspresijom došlo do gubitka otpornosti na infekciju fagom, a delecijom do maksimalne derepresije promotora *Pcas8e*. Unatoč opaženim razlikama u ekspresiji gena *cas* između mutanta Δhns , $\Delta hns \Delta stpA$ i divljeg tipa s induciranom ekspresijom aktivatora LeuO (Slika 9B), zaštita od infekcije fagom λvir u sva tri soja bila je podjednaka, odnosno sojevi su otporni na infekciju na 30 °C, ali ne i na 37 °C (Tablica 11) [86]. Jedno objašnjenje bi moglo biti da je proteinski kompleks Cascade u svim sojevima prisutan u dovoljnim količinama, ili da zaštita stanica od infekcije fagom na 37 °C ne ovisi o količini kompleksa Cascade. Za kompleks Cascade je pokazano da je sposoban brzo pretraživati molekule DNA u nukleoidu i citoplazmi, pa je moguće da je svega nekoliko molekula dovoljno za efikasnu interferenciju [196]. Ovi rezultati su u skladu s istraživanjem Majsec i suradnika, koji su pokazali da je ključni protein za otpornost stanica na infekciju fagom na 37 °C protein Cas3 [91], čija ekspresija nije povećana u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ (Slika 9A). Ovaj efekt temperature na aktivnost proteina Cas3 ću detaljnije raspraviti u poglavlju 5.6.

Kako represor H-NS regulira sintezu proteina StpA i LeuO, u mutantu Δhns su povećane količine proteina StpA i LeuO [27]. Protein LeuO je stabilan u mutantu Δhns i dodatno pojačava vlastitu ekspresiju [191], dok je protein StpA nestabilan zbog brze razgradnje proteazom Lon [136]. Nadalje, ekspresija gena *stpA* niža je na 30 °C, nego na 37 °C [29], što ukazuje da u mutantu Δhns aktivacija gena *cas* pomoću proteina LeuO ima jači učinak od represivnog djelovanja proteina StpA. To bi moglo objasniti povećanu transkripciju gena *cas* i obranu od infekcije na 30 °C unatoč djelomičnom utišavanju promotora *Pcas8e* od strane proteina StpA. Također, to bi objasnilo zašto unatoč povećanoj ekspresiji proteina StpA s plazmida u mutantu Δhns nije došlo do potpune represije promotora *Pcas8e* i da protein StpA samo djelomično reprimira promotor *Pcas8e* (Slika 9B).

Zbog dualne regulacije promotora *Pcas8e* antagonističkim proteinima predloženo je da su geni za sustav CRISPR-Cas regulirani stohastičkim genetičkim prekidačem (Slika 27) [87,197]. U takvom modelu, kompeticija regulatora LeuO i H-NS za pristup istim veznim mjestima na promotoru *Pcas8e* dovodi do promjena u regulaciji ekspresije gena *cas* [197]. Represor H-NS je u prednosti, budući da je prisutan u stalnim količinama tijekom svih faza

rasta [197], dok je ekspresija aktivatora LeuO promjenjiva i ovisi o prisutnosti fizioloških signala kao što su gvanozin tetrafosfat (ppGpp), nedostatak određenih aminokiselina ili stacionarna faza rasta [95,198,199]. Primjerice, indukcija strogog odgovora (engl. *stringent response*) uslijed nedostatka aminokiselina, inducirala je aktivator LeuO, ali nije povećala transkripciju s promotora *Pcas8e* ili količinu zrelih crRNA [86]. Kako su signali koji mijenjaju količine regulatora H-NS i LeuO stohastički, ishod njihove kompeticije različit je za svaku stanicu u bakterijskoj populaciji i neće se inducirati svi geni. Stoga fiziološki uvjeti pri kojima spontano dolazi do indukcije sustava CRISPR-Cas aktivacijom proteina LeuO još uvijek nisu poznati. Drugi transkripcijski faktori koji bi također mogli utjecati na kompeticiju ovih regulatora za promotor *Pcas8e* ovisno o okolišnim uvjetima i fazi rasta, su primjerice proteini StpA i CRP u bakteriji *E. coli* (Slika 9B) [92], ili protein LRP u bakteriji *S. Typhi* [135]. Osim toga, fagi mogu prilikom infekcije eksprimirati proteine slične proteinu H-NS (engl. *H-NS like proteins*) ili anti-CRISPR proteine Acr kako bi utišali prepisivanje gena *cas* ili inhibirali nukleaznu aktivnost sustava CRISPR-Cas [200,201].



Slika 27. Sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* je pod dualnom regulacijom. Kompeticija antagonističkih regulatora H-NS i LeuO za vezanje na promotor *Pcas8e* djeluje kao genetički prekidač koji regulira ekspresiju komponenti sustava CRISPR-Cas, dok je aktivnost sustava regulirana temperaturom inkubacije. Prikazana je i uloga dodatnih regulatora StpA, CRP-cAMP i HtpG. Preuzeto i prilagođeno iz [87].

5.2. Aktivnost promotora anti-*Pcas*

U intergenskoj regiji IGLB se osim promotora *Pcas8e*, nalazi i divergentno orijentirani promotor anti-*Pcas* [25]. Za razliku od promotora *Pcas8e*, u literaturi ne postoje podaci o jačini transkripcije s promotora anti-*Pcas* ili njegovom utjecaju na aktivnost sustava CRISPR-Cas. Za oba promotora pokazano je da su pod kontrolom proteina H-NS, oba su ovisna o faktoru σ^{70} i aktivna *in vivo* i *in vitro* [25]. Zbog toga sam utjecaj proteina StpA na promotor anti-*Pcas* istražio u istim sojevima kao za promotor *Pcas8e*, ali uzgojenim na dvije temperature (30 °C i 37 °C), do logaritamske i stacionarne faze rasta. Količine transkripata *antiCas* nisu ovisile o temperaturi, ali su se značajno mijenjale ovisno o fazi rasta (Slika 11). U stanicama uzgojenim do logaritamske faze rasta, transkripcija s promotora anti-*Pcas* je bila najviša u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta stpA$ (povećana oko 120 puta u odnosu na soj divljeg tipa), te nešto niža u mutantu Δhns s praznim vektorom (povećana oko 50 puta) (Slika 11A). Ekspresijom proteina StpA s plazmida u mutantu Δhns količine transkripata *antiCas* su osjetno pale (na razinu koja je otprilike 10 puta veća u odnosu na soj divljeg tipa, Slika 11A). Ovi rezultati se podudaraju s rezultatima dobivenim za količine transkripata *casA*, iz čega sam zaključio kako u nedostatku proteina H-NS, protein StpA djeluje i kao dodatni represor promotora anti-*Pcas*. S druge strane, u svim sojevima uzgojenim do stacionarne faze količine transkripata *antiCas* su značajno niže nego u stanicama uzgojenim do logaritamske faze (Slika 11B). Za stacionarnu fazu rasta nemam za usporedbu rezultate za količinu transkripata gena *casA* dobivene pomoću metode RT-qPCR. Međutim, metodom RNAseq dobio sam količine transkripata gena *casD* i *casE* (također pod kontrolom promotora *Pcas8e*, ali nizvodno od gena *casA*) u mutantu Δhns u odnosu na divlji tip (Tablica 18). Zanimljivo, usporedna analiza transkripata u sojevima Δhns u odnosu na divlji tip dobivena metodom RNAseq nije bila napravljena za one gene za koje je u bilo kojem uzorku izmjerena količina transkripata bila 0, i zato nije bilo podataka za gene *casA*, *casB* i *casC* (transkripti nisu detektirani u stanicama divljeg tipa), dok za gene *casD* i *casE* jest. Podaci za transkripte *casA*, *casB* i *casC* postoje samo za mutant Δhns . Dakle, u stacionarnoj fazi rasta izmjerene količine transkripata *antiCas* metodom RT-qPCR u mutantu Δhns su osjetno niže (povećane su samo za oko 15 puta u odnosu na divlji tip, Slika 11B) u usporedbi s količinama transkripata *casD* i *casE* koje su ostale povišene oko 60-70 puta (Tablica 18), dok su količine transkripata *casA* povećane preko 100 puta prema podacima RNAseq (rezultati nisu prikazani). Mogući razlog za ovu razliku u transkripciji s dva promotora u stacionarnim stanicama je nestabilnost i brža razgradnja kratkih transkripata *antiCas* u odnosu na transkripte *casA*, *casD* i *casE*. Primjerice, u bakteriji *E. coli* postoji enzim PNPaza koji razgrađuje kratke molekule

RNA specifično u stacionarnoj fazi, dok nema učinka na stanice u eksponencijalnoj fazi [202,203]. Koristeći metodu mikročipova, za gene *casD* i *casE* je još uočeno da su pojačano eksprimirani u stacionarnoj fazi rasta divljeg tipa nakon toplinskog šoka te da se unutar kodirajućeg dijela gena *casC* nalazi promotor kojeg prepoznaje faktor σ^{32} [204]. Dodatni σ^{32} promotor pronađen je i unutar kodirajućeg dijela gena *casI*, a potiče ekspresiju gena *casI* i *cas2* [204]. Moguće je da se parcijalnom ekspresijom gena *cas* omogućava stalna spremnost na ugradnju razmaknica, iako se ona u pravilu događa samo u stanicama koje se repliciraju [205]. Također je moguće da proteini Cas1 i Cas2 vežu stranu DNA i "čekaju" na ugradnju sve dok se stanica ne počne dijeliti ili sudjeluju u nekom drugom staničnom procesu koji tek treba istražiti.

Transkripcija s promotora anti-*Pcas* u stacionarnim stanicama nije ovisila o proteinu StpA što se može objasniti manjom ekspresijom proteina StpA. Naime, u bakterijama *E. coli* i *Shigella flexneri*, protein StpA se eksprimira samo u ranoj logaritamskoj fazi i količine su mu značajno smanjene u stacionarnoj fazi [134,197,206]. Zbog toga je moguće da je u stacionarnoj fazi promotor anti-*Pcas* pod kontrolom nekog drugog regulatora, ili da je afinitet RNA polimeraze smanjen za promotor anti-*Pcas*.

5.3. Utjecaj transkripta *antiCas* na aktivnost sustava CRISPR-Cas

Slijedeće sam istraživao može li transkript *antiCas* utjecati na aktivnost proteina Cas3, a time i na sustav CRISPR-Cas na način da inhibira njegovu aktivnost, ili može utjecati na transkript gena *cas3* i time inhibirati terminaciju transkripcije i/ili translaciju. Iako sam pokazao da se u mutantu Δhns količina transkripata *antiCas* povisila više od 50 puta u stanicama uzgojenim do logaritamske faze rasta i oko 10 puta u stacionarnim (Slika 11), mutant Δhns je svejedno ostao otporan na infekciju fagom λvir na 30 °C (Tablica 11). Međutim, povećana ekspresija transkripta *antiCas* s plazmida u mutantu Δhns dokinula je zaštitu od infekcije fagom λvir na 30 °C (Tablica 12), što pokazuje kako transkript *antiCas* može inhibirati aktivnost sustava CRISPR-Cas, ali samo kad je prisutan u suvišku. Kako se u pokusima određivanja zaštite od faga λvir koriste stanice uzgojene do stacionarne faze rasta gdje je smanjena količina transkripata *antiCas* (Slika 11B), to bi moglo objasniti zašto se sačuvala otpornost mutanta Δhns na infekciju na 30 °C i zašto su za ukidanje zaštite potrebne povišene količine transkripta *antiCas* s plazmida (Tablica 12).

Ovaj rezultat je ukazao na mogućnost da je došlo ili do smanjene transkripcije ili translacije gena *cas3* što sam detaljnije istražio. Ekspresija gena *cas3* uz suvišak transkripta

antiCas smanjila se za oko dva puta u odnosu na mutanta Δhns s praznim vektorom (Slika 13), u kojem je bila nešto veća (povećana oko 15 puta u odnosu na divlji tip) nego što su ranije primijetili Majsec i suradnici [91]. Međutim, oni su u svojem istraživanju koristili početnice koje se vežu za zadnji dio gena *cas3* koji se preklapa s transkriptom *antiCas*, dok sam ja koristio početnice koje se vežu za srednji dio gena *cas3*. To može objasniti razlike u dobivenim rezultatima, i ukazuje na mogućnost da je u prethodnim istraživanjima transkript *antiCas* stupio u interakciju sa zadnjim dijelom gena *cas3* i smanjio mu transkripciju. Budući da su količine transkripata *antiCas* s plazmida porasle za preko 100 puta (rezultat nije prikazan), pad transkripcije gena *cas3* za manje od 2 puta se ne čini pretjerano značajan i ne može objasniti gubitak aktivnosti sustava CRISPR-Cas. U skladu s tim, ekspresija transkripta *antiCas* s plazmida nije značajno utjecala niti na količine proteina Cas3 (Slika 15). Možda bi se razlika uočila da su sojevi bili uzgojeni do logaritamske faze rasta kad su količine proteina Cas3 manje ili da sam koristio direktne metode istraživanja umjesto metoda *in vivo*. Za direktne analize, trebalo bi protein Cas3 pročistiti, a transkripte *cas3* i *antiCas* sintetizirati *in vitro*. Interakcije Cas3-RNA ili RNA-RNA mogle bi se dokazati pomoću metode EMSA (engl. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*), u kojoj se elektroforezom na gelu mogu uočiti upravo protein-RNA [207] i RNA-RNA interakcije [208].

Budući da transkript *antiCas* nije utjecao ni na transkripciju niti na translaciju, pretpostavio sam da vjerojatno djeluje na aktivnost proteina Cas3. Da bih to provjerio, istraživao sam utjecaj transkripta *antiCas* na ugradnju razmaknica putem pripremljene adaptacije. Za pripremljenu adaptaciju su osim proteina Cas1 i Cas2, potrebni i proteinski kompleks Cascade, protein Cas3 i već prisutna razmaknica u lokusu CRISPR protiv strane molekule DNA [15]. Očekivao sam da bi transkript *antiCas* mogao utjecati na ugradnju razmaknica, ukoliko utječe na aktivnost proteina Cas3. Ekspresija samo kompleksa Cascade dala je efikasniju ugradnju razmaknica (za oko 13 %), nego kad je istovremeno inducirana i ekspresija proteina Cas3 (oko 8 %) (Slika 17). Vjerojatno je bazalna ekspresija s promotora *lacUV5* omogućila sintezu dovoljnih količina proteina Cas3 [209]. Ovaj rezultat je u skladu s prijašnjim istraživanjima koja su pokazala kako pojačana aktivnost proteina Cas3 može smanjiti efikasnost pripremljene adaptacije [192,193]. Kad se uz kompleks Cascade i protein Cas3 inducirala i ekspresija transkripta *antiCas*, efikasnost ugradnje nove razmaknice se pojačala (s oko 8 % na oko 11 %) (Slika 17). Kako je ovaj rezultat sličan onom kad su prisutne manje količine proteina Cas3, a pokazao sam da količine proteina Cas3 nisu promijenjene (Slika 15), to ukazuje na mogućnost da je transkript *antiCas* inhibirao nukleaznu aktivnost proteina Cas3

na nepoznat način, što bi se moglo detaljnije istražiti *in vitro*. Sličan rezultat sam uočio kad su istovremeno eksprimirani samo kompleks Cascade i transkript *antiCas*, ali je porast efikasnosti ugradnje nove razmaknice bio manje izražen (s oko 13 % na oko 14 %) (Slika 17). Kako su količine proteina Cas3 u ovom slučaju niske jer njegova ekspresija nije bila inducirana, dodatna inhibicija njegove aktivnosti pomoću transkripta *antiCas* nema značajnog učinka.

5.4. Utjecaj proteaze Lon na aktivnost sustava CRISPR-Cas

Na razini post-translacijske regulacije sustava CRISPR-Cas, prvo sam istražio ulogu proteaze Lon. Proteaza Lon spada u grupu AAA+ proteaza, odnosno ATPaza povezanih sa staničnim aktivnostima, i odgovorna je za cijepanje krivo smotanih proteina ovisno o ATP-u, ali i razgradnju nekih regulatornih proteina, poput proteina StpA [136,149]. Stoga sam pretpostavio kako bi proteaza Lon mogla indirektno regulirati aktivnost sustava CRISPR-Cas razgradnjom proteina StpA ili nekog drugog transkripcijskog regulatora. Ukoliko bi proteaza Lon razgrađivala protein StpA, tada bi transkripcija gena *casA* u mutantu Δhns trebala biti povećana i zaštita od infekcije fagom λvir bi trebala biti slična mutantu $\Delta hns \Delta stpA$. Ukoliko bi supstrati proteaze Lon bili proteini koji utječu na sam fag, onda bi njezin učinak mogao biti neovisan o sustavu CRISPR-Cas.

Uočio sam da sama ekspresija proteaze Lon s plazmida u sojevima divljeg tipa nije omogućila zaštitu od infekcije (Tablica 13), što je u skladu s očekivanjima, jer je u divljem tipu bakterije *E. coli* aktivan protein H-NS koji je primarni represor sustava CRISPR-Cas i nije supstrat proteaze Lon [8,25,86]. Neočekivano, prekomjerna ekspresija ili pak nedostatak proteaze Lon u mutantu Δhns zaštitila je stanice od infekcije fagom λvir na 30 °C ovisno i neovisno o sustavu CRISPR-Cas. Zaštita na 37 °C bila je manje izražena (Tablica 13, Slika 18), a smanjila se i količina transkripata *casA* (Slika 19). Smanjena transkripcija gena *casA* u dvostrukom mutantu $\Delta hns \Delta lon$ mogla bi se objasniti nakupljanjem represora StpA. Ostaje nejasno zašto je prekomjerna ekspresija proteaze Lon dovela do smanjenja, umjesto povećanja transkripcije.

Poznato je da proteaza Lon degradira proteine N, Xis i cII faga λvir , čime može utjecati na njegovu replikaciju [194,210]. Stoga je moguće da u suvišku proteaze Lon, fag lambda ne može stvoriti dovoljan broj novih virusnih čestica čime bi se mogla objasniti otpornost stanica na infekciju fagom λvir neovisno o ekspresiji gena *cas*. S druge strane, mutant Δhns s razmaknicama standardno je otporan na 30 °C [91], te na to suvišak ili manjak proteaze Lon

nema utjecaja. Iz ovih sam razloga istražio utjecaj gena *lon* na efikasnost transformacije s plazmidom pTK43. Međutim, ni tada rezultati nisu ispali jednoznačni. Delecija gena *lon* smanjila je efikasnost transformacije ovisno i neovisno o sustavu CRISPR-Cas (Tablica 14). Budući da proteaza Lon razgrađuje protein CspD koji je inhibitor replikacije DNA [211], moguće je da delecijom gena *lon* dolazi do nakupljanja proteina CspD i poremećaja u replikaciji DNA, što smanjuje efikasnost transformacije. Sam sustav CRISPR-Cas samo je blago smanjio efikasnost transformacije (Tablica 14), vjerojatno zato što razmaknica λ T3 (komplementarna genu R na plazmidu pTK43) ima nepravilan motiv PAM, što posljedično smanjuje interferenciju. Kako bi se dobio bolji uvid u utjecaj delecije gena *lon* na aktivnost sustava CRISPR-Cas, bilo bi zanimljivo ovaj pokus ponoviti u sojevima s razmaknicom za gen R koja bi imala pravilan motiv PAM ili napraviti plazmid koji sadrži gen *cII* faga λ vir, a koji je meta razmaknice λ c s pravilnim motivom PAM. Vjerojatno rezultati ni tada ne bi bili jednoznačni obzirom da proteaza Lon očito ima učinak na više proteina. Uzimajući sve navedeno u obzir, može se zaključiti kako pojačana ekspresija ili inaktivacija proteaze Lon u mutantu Δ *hns* aktivira zaštitu stanica od infekcije fagom λ vir neovisno o sustavu CRISPR-Cas, i smanjuje transkripciju s promotora *Pcas8e*. Učinak proteaze Lon na otpornost bakterija na infekciju fagom λ vir ovisi o mutaciji Δ *hns* i temperaturi još nepoznatim mehanizmom.

5.5. Utjecaj šaperona HtpG na aktivnost sustava CRISPR-Cas

Drugi protein koji može regulirati sustav CRISPR-Cas na razini post-translacije je šaperon HtpG. Početno istraživanje kojim su povezani šaperon HtpG i sustav CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* proveli su Yosef i suradnici [179]. Oni su pokazali da je delecija gena *htpG* u mutantu Δ *hns* poništila zaštitu stanica od lizogenizacije fagom λ cI857-*bla* na 32 °C, koju inače pruža sustav CRISPR-Cas. Prekomjerna ekspresija šaperona HtpG ili proteina Cas3 u dvostrukom mutantu Δ *hns* Δ *htpG* povratila je aktivnost sustava CRISPR-Cas u zaštiti od lizogenizacije. Daljnjim analizama pokazali su da šaperon HtpG djeluje isključivo na protein Cas3 tako što povećava njegovu stabilnost i količine funkcionalnog proteina [179]. Nakon toga, Majsec i suradnici su pokazali kako je prekomjerna ekspresija proteina Cas3 u dvostrukom mutantu Δ *hns* Δ *htpG* s anti-lambda razmaknicama omogućila otpornost na infekciju fagom λ vir na 30 °C, ali ne na 37 °C. Zaštita od infekcije na 37 °C moguća je samo prekomjernom ekspresijom proteina Cas3 u mutantu Δ *hns* *htpG*⁺, što sugerira da je šaperon HtpG nužan za funkcioniranje proteina Cas3 na 37 °C, ali njegova točna uloga u ovom procesu nije bila poznata

[91]. S obzirom da su Yosef i suradnici mjerili količine proteina Cas3 samo u mutantu $\Delta htpG$ [179], odlučio sam istražiti kako šaperon HtpG eksprimiran u suvišku utječe na količine proteina Cas3 u divljem tipu i ovisno o mutacijama $\Delta htpG$ i Δhns , na 30 °C i 37 °C.

Zanimljivo, uočio sam da su količine proteina Cas3 podjednake u sva četiri soja uzgojena na obje temperature (uz određene oscilacije rezultata) neovisno o genotipu (Slika 21), a razlike u količinama proteina Cas3 u ovisnosti o ekspresiji šaperona HtpG se vide samo u sojevima uzgojenim na 30 °C (Slika 22C). Ekspresijom šaperona HtpG s plazmida u mutantu $\Delta htpG$ na 30 °C uočio sam samo blagi porast količine proteina Cas3 (Slika 22C). Ovaj rezultat se ne podudara s onim Yosefa i suradnika [179], koji su u mutantu $\Delta htpG$ s prekomjernom ekspresijom šaperona HtpG primijetili povećanje količine proteina Cas3 za otprilike 3 puta, ali bez navođenja temperature na kojoj je napravljen pokus (vjerojatno 37 °C). Također, nisu imali kontrolu divljeg tipa, što je onemogućilo usporedbu količine proteina Cas3 u mutantu $\Delta htpG$ u odnosu na stanice divljeg tipa [179]. Zapravo, oni su tim pokusom komplementirali mutaciju $\Delta htpG$. Međutim, njihovi rezultati nisu usporedivi s mojima jer su koristili stanice uzgojene do logaritamske faze rasta te inducirali ekspresiju proteina Cas3 s plazmida, a ne s kromosoma. Nadalje, za normalizaciju intenziteta signala kemiluminiscencije koristio sam konstitutivno eksprimirani protein GAPDH, dok oni nisu.

Kako sam naveo, jedini veći porast količine proteina Cas3 nakon ekspresije šaperona HtpG na 30 °C primijetio sam u soju divljeg tipa (Slika 22C). Zanimljivo, sličan porast količine proteina Cas3 uočio sam u soju s mutacijom Δhns i praznim vektorom, a ekspresija šaperona HtpG nije dodatno utjecala na količine proteina Cas3 (Slika 22C). Kako je transkripcija gena *cas3* u sojevima koje sam koristio bila podjednaka i neovisna o mutaciji Δhns [212], ovaj rezultat sugerira da bi protein H-NS mogao regulirati količine proteina Cas3 na razini post-transkripcije ili post-translacije. U bakteriji *E. coli*, takav učinak proteina H-NS već je opisan za određene gene [213,214]. Mogući utjecaj mutacije u genu *hns* na količinu proteina Cas3 sam pokušao istražiti u sojevima s nativnim promotorom za gen *cas3*. Nažalost, u tim sojevima nisam uspio detektirati protein Cas3 na membrani, čak ni kad sam koristio specifična anti-Cas3 antitijela. Mogući razlog je da su endogene količine proteina Cas3 preniske za detekciju metodom *Western blot*, te bi se mogle pokušati odrediti osjetljivijom metodom, kao što je masena spektrometrija [215].

Budući da je šaperon HtpG nužan za obranu od infekcije fagom λvir na 37 °C [91], a nije povećao količine proteina Cas3 na toj temperaturi (Slika 22D), to je ukazalo na mogućnost

da na drugi način utječe na aktivnost proteina Cas3. Jedan od načina je održavanje konformacije proteina Cas3 za pravilnu interakciju s kompleksom Cascade (vidi poglavlje 5.6.). Primjerice, pokazalo se kako je u *in vitro* pokusima, u kojima je količina proteina Cas3 u reakciji stalna, dodatak šaperona HtpG mogao pojačati nukleaznu aktivnost proteina Cas3 na 37 °C [216].

Točan mehanizam interakcije šaperona HtpG s proteinom Cas3 nije poznat, a zanimljivo je što je potreba za šaperonom tipa Hsp90 (HtpG kod bakterija) u aktivnosti sustava CRISPR-Cas uočena jedino u bakteriji *E. coli* [162]. U svim ostalim bakterijama, šaperoni klase Hsp90 zaduženi su za druge aktivnosti poput adaptacije na visoke i niske temperature, otpornosti na oksidativni stres, stvaranje biofilma i održavanje virulencije [162,172–174,176]. Dodatno sam ulogu šaperona HtpG istražio inaktiviranjem dviju funkcija šaperona HtpG i odredio njihov utjecaj na aktivnost sustava CRISPR-Cas. Izabrao sam točkaste mutacije za koje je pokazano da imaju utjecaja na hidrolizu ATP-a (HtpG^{E34A}) i vezanje proteinskih supstrata (HtpG^{W467R}) [166,167], jer sam pretpostavio da bi neka od ovih aktivnosti mogla biti važna u interakciji s proteinom Cas3. Međutim, nijedna od ovih dviju mutacija nije imala negativan učinak na aktivnost sustava CRISPR-Cas (Tablica 15). Budući da u šaperonu HtpG postoji velik broj drugih bočnih ogranaka koji su bitni za vezanje proteinskih supstrata [167], moguće je da neki od njih sudjeluje u interakciji s proteinom Cas3, gdje je važna njegova uloga kao holdaze. Također je moguće da je unatoč mutacijama, aktivnost šaperona HtpG na 30 °C dovoljno očuvana i da zato nisam primijetio razlike u fenotipu.

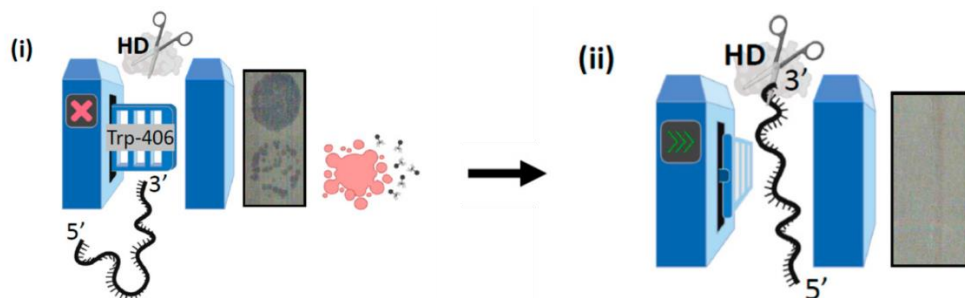
5.6. Utjecaj promjene konformacije na aktivnost proteina Cas3

Svi dosadašnji rezultati su pokazali da zaštita od infekcije fagom *λvir* u mutantu Δhns s anti-lambda razmaknicama nije potpuna i da ovisi o temperaturi inkubacije. Budući da nisam pokazao da su količine proteina Cas3 na 37 °C smanjene u odnosu na 30 °C (Slika 21), pretpostavio sam da bi inhibicija aktivnosti sustava CRISPR-Cas mogla biti posljedica promijenjene aktivnosti proteina Cas3 koja ovisi o temperaturi.

Istraživanja molekularnog mehanizma učinka temperature na aktivnost proteina Cas3 napravljena su u suradnji s nekoliko kolega i laboratorija, a rezultati su objavljeni prošle godine [182]. Dobiveni rezultati su pokazali da se nukleazna, a ne helikazna (ATP-azna), aktivnost divljeg tipa proteina Cas3 značajno smanjila porastom temperature na 37 °C, što je u skladu s prethodnim genetičkim istraživanjima [91]. Pronađena su dva važna triptofana, W230 i W406, koja se nalaze u dijelu proteina Cas3 između helikazne RecA1 i nukleazne HD domene i koja

tvore tunel kroz koji prolazi ssDNA na putu do nukleaznog centra (Slika 26). Biokemijska istraživanja su pokazala da je nukleazna aktivnost točkastog mutanta Cas3^{W406A} bila slična divljem tipu na 30 °C (izražena i snažna), dok je na 37 °C bila povećana (hiperaktivna nukleaza) u odnosu na divlji tip, što je sugeriralo kako bi temperatura mogla regulirati nukleaznu aktivnost divljeg tipa proteina Cas3 preko Trp-406 [182]. Rezultati simulacija molekularne dinamike su to potvrdili i dali objašnjenje. Naime, Trp-406 nalazi se u interakciji s Trp-230 na 30 °C pokraj tunela kroz koji prolazi ssDNA [22]. Povišenjem temperature na 37 °C dolazi do pomicanja Trp-406 i pozicioniranja unutar tunela gdje se stabilizira novim hidrofobnim interakcijama i blokira prolaz ssDNA [182]. Odnosno, promjenom položaja Trp-406 mijenja se i nukleazna aktivnost proteina Cas3 i samo o njemu ovisi može li ssDNA proći kroz tunel do nukleaznog centra ili ne (Slika 26).

Ovaj pomak Trp-406 objašnjava smanjenu nukleaznu aktivnost divljeg tipa proteina Cas3 na 37 °C u usporedbi s 30 °C, i posljedično osjetljivost mutanta Δhns na infekciju fagom λvir na 37 °C. Zamjenom Trp-406 s alaninom omogućio bi se slobodan prolaz ssDNA do aktivnog mjesta nukleazne domene, čime je objašnjena hiperaktivna nukleazna aktivnost točkastog mutanta Cas3^{W406A} na 37 °C. Na temelju ovih rezultata predložili smo model konformacijske kontrole nukleazne aktivnosti proteina Cas3 prema kojem Trp-406 djeluje kao molekularna "vrata" koja mogu propustiti ili blokirati prolazak ssDNA prema aktivnom mjestu nukleazne domene (Slika 28).



Slika 28. Model molekularnih "vrata", prema kojem Trp-406 kontrolira nukleaznu aktivnost proteina Cas3. **i)** Kad je Trp-406 pozicioniran unutar tunela kroz koji prolazi ssDNA, "vrata" su zatvorena i razgradnja strane DNA putem sustava CRISPR-Cas je inhibirana, što se očituje pojavom virusnih plakova nakon infekcije. **ii)** Usljed konformacijske promjene proteina Cas3, Trp-406 se pomiče prema Trp-230 i otvara "vrata" za prolazak ssDNA, koja se zatim razgrađuje, što omogućuje obranu od infekcije (nema plakova). Preuzeto i prilagođeno iz [182].

Alosteričkom kontrolom nukleazne aktivnosti proteina Cas3 osigurala bi se razgradnja samo odgovarajućih supstrata u određeno vrijeme. Pretpostavljamo da se alosteričkom kontrolom nukleazne aktivnosti proteina Cas3 osigurava da cijepanje DNA nastupi nakon prepoznavanja strane DNA pomoću kompleksa Cascade [24,120], nakon što je stvorio stabilnu R-omču između crRNA i ciljne DNA. Moguće je da *in vivo* šaperon HtpG vezanjem (odnosno "držanjem" poput holdaze) za protein Cas3 inhibira njegovu nukleaznu aktivnost, sve dok ne stupi u interakciju s kompleksom Cascade. Odvajanje proteina Cas3 od šaperona HtpG i vezanje za podjedinicu CasA (Cse1) kompleksa Cascade moglo bi dovesti do promjene položaja Trp-406, na isti način kao i promjena temperature s 37 °C na 30 °C, što bi omogućilo razgradnju strane DNA. Naši rezultati nisu sasvim u skladu s literaturom [21,24,113], gdje se smatra da je protein Cas3 iz bakterije *E. coli* odmah aktivan kad se veže na pravilno pozicioniran kompleks Cascade na R-omči, što naši rezultati negiraju i upućuju na alosteričku promjenu kao alternativni mehanizam regulacije. To smo pokazali u pokusu interferencije *in vitro* gdje dodatak ATP-a u reakcijsku smjesu nije stimulirao procesivno cijepanje DNA s divljim tipom proteina Cas3, dok jest s mutantom Cas3^{W406A} [182]. Štoviše, umjesto da je mutant Cas3^{W406A} omogućio stanicama zaštitu od infekcije fagom λ vir na 37 °C jer je efikasnija nukleaza, to se nije dogodilo i zapravo su stanice postale osjetljive na infekciju fagom λ vir i na 30 °C (Tablice 16 i 17). Ovi rezultati sugeriraju da je za alosteričku aktivaciju proteina Cas3 potreban i signal od kompleksa Cascade nakon što kompleks zauzme pravilnu konformaciju na R-omči. Ako je ta komunikacija prekinuta, neće doći do procesivnog cijepanja strane DNA, iako je nukleaza aktivna na 37 °C.

U prilog našim rezultatima govori otkriće da je u sustavu CRISPR-Cas tipa I-A iz arheje *Pyrococcus furiosus*, nukleazna aktivnost proteina Cas3 inhibirana i pod konformacijskom kontrolom kompleksa Cascade unutar većeg efekorskog kompleksa. Nukleazna aktivnost se alosterički aktivira tek nakon prepoznavanja supstrata i formiranja R-omče, čime dolazi do konformacijskih promjena koje aktiviraju nukleaznu aktivnost proteina Cas3 [217]. Sličnu alosteričku regulaciju vjerojatno ima i tip I-D gdje je protein Cas3 spojen s podjedinicom Cas8d kompleksa Cascade, a tu se djelomice uklapa i tip I-E iz bakterije *E. coli* [4].

Mikroskopijom atomskih sila visoke brzine nedavno je pokazano da nakon što kompleks Cascade privuče protein Cas3 oni ostaju povezani, te namotavaju (engl. *reels*) i razgrađuju ciljnu molekulu DNA, tako što se prvo cijepa istisnuti lanac DNA *in cis*, a ciljni lanac nespecifičnom (engl. *collateral*) nukleaznom aktivnošću *in trans* [115]. Moguće je da točkasti mutant Cas3^{W406A}, koji je izgubio mogućnost pravilne komunikacije s kompleksom

Cascade, ne može stanicama omogućiti zaštitu od infekcije fagom λ vir (Tablice 16 i 17), vjerojatno jer cijepa DNA samo nespecifičnom nukleaznom aktivnošću.

Iako sam ovim istraživanjima uspio pokazati nove načine regulacije sustava CRISPR-Cas, ostaje nekoliko neodgovorenih pitanja. Zašto se aktivnost proteina Cas3 u bakteriji *E. coli* regulira na toliko načina i ima li transkript *antiCas* ulogu *in vivo*? Kad se protein Cas3 eksprimira u stanicama u suvišku, nije uočeno da dolazi do značajnog smanjenja vijabilnosti. Poznato je da protein Cas3 može neovisno o sustavu CRISPR-Cas potaknuti nekontroliranu replikaciju plazmida tipa ColE1 [218], što možda može biti nepovoljno za stanicu u određenim uvjetima. Ako transkript *antiCas in vivo* inhibira nukleaznu aktivnost proteina Cas3, koji je molekularni mehanizam posrijedi i zašto transkript mora biti prisutan u suvišku? Ima li to fiziološki značaj? Moguće je da i transkript *antiCas* može "ući" unutar tunela kroz koji prolazi ssDNA i tamo prekinuti prolaz ssDNA do nukleaznog centra ili možda njegovo vezanje na protein Cas3 smeta interakciju sa šaperonom HtpG dok čeka signal od kompleksa Cascade. Bilo bi jako zanimljivo istražiti te mogućnosti simulacijama molekularne dinamike i biokemijskim istraživanjima s pročišćenim proteinima Cas3, HtpG i transkriptom *antiCas*.

Zbog prisutnosti samo jednog efekorskog proteina, sustavi CRISPR-Cas klase 2, posebice sustav CRISPR-Cas9, su jedan od najpoznatijih alata za uređivanje genoma uvođenjem ciljanih lomova u molekuli DNA [51,52]. Ovaj multi-efektorski protein također prolazi mnoge konformacijske promjene prilikom prepoznavanja i cijepanja DNA. Zanimljivo, za protein Cas9 je pokazano da mu je enzimatska aktivnost veća na višoj temperaturi, što čini uređivanje genoma efikasnijim (suprotno od našeg primjera). To je naročito važno kad se želi manipulirati biljkama gdje temperatura inkubacije može imati negativan utjecaj na rast biljaka i biljnog tkiva, a pokusi na niskoj temperaturi rezultiraju premalom stopom unesenih mutacija [219–222]. U posljednjih nekoliko godina sve češće se u svrhu uređivanja genoma koriste i multi-efektorski sustavi klase 1, kao što su kombinacija proteina Cas3 i kompleksa Cascade iz sustava tipa I-E [73–75]. U ovakvom sustavu kompleks Cascade prepoznaje ciljnu sekvencu, dok nukleazna aktivnost proteina Cas3 omogućuje velike genomske delecije (od 1-100 kb) [223]. Otkriće točkastog mutanta Cas3^{W406A} s hiperaktivnom nukleaznom aktivnošću moglo bi koristiti u ovakvim sustavima i omogućiti efikasnije uređivanje genoma, posebice ako bi se mogao uspješno navoditi do mete pomoću kompleksa Cascade, ali bez da mu kompleks Cascade regulira nukleaznu aktivnost.

5.7. Utjecaj delecije gena *hns* na transkriptom bakterije *E. coli*

S obzirom da je protein H-NS, uz to što reprimira sustav CRISPR-Cas, također i globalni transkripcijski regulator u bakteriji *E. coli* [88], istražio sam kako delecija gena *hns* utječe na transkriptom bakterije *E. coli* koristeći metodu RNAseq. Za usporedbu sam koristio mutanta Δhns i divlji tip uzgojene do stacionarne faze rasta na 30 °C i 37 °C. Analizom podataka između mutanta Δhns i divljeg tipa utvrđeno je čak 1166 gena sa značajnim promjenama u ekspresiji na 30 °C, te 976 gena na 37 °C. Prijašnja istraživanja utjecaja delecije gena *hns* na ekspresiju većeg broja gena koji su pod njegovom regulacijom fokusirala su se na stanice uzgojene do logaritamske faze rasta na samo jednoj temperaturi [189,224,225]. Moje istraživanje je stoga generiralo potpuno novu bazu podataka o utjecaju delecije gena *hns* i razlika u temperaturi inkubacije na transkriptom stanica bakterije *E. coli* u stacionarnoj fazi rasta. Ta baza omogućit će planiranje mnogih budućih istraživanja jer daje uvid o razinama ekspresije gena u različitim uvjetima rasta i mogućim interakcijama gena. Za daljnju analizu već je bilo odabrano nekoliko gena za koje je pretpostavljeno da bi mogli biti u interakciji s komponentama sustava CRISPR-Cas, ali to nije bila tema ove doktorske disertacije.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju rezultata ovog istraživanja mehanizama regulacije sustava CRISPR-Cas u bakteriji *E. coli* moguće je zaključiti sljedeće:

- Protein StpA djeluje na razini transkripcije kao dodatni represor promotora *Pcas8e* i anti-*Pcas* u nedostatku proteina H-NS (mutant Δhns).
- Transkript *antiCas* u suvišku negativno utječe na aktivnost proteina Cas3 što je uočljivo kroz povećanu infekciju fagom λvir i ugradnju novih razmaknica, a bez značajnog učinka na transkripciju i translaciju gena *cas3*.
- Pojačana ekspresija ili inaktivacija proteaze Lon u mutantu Δhns smanjuje transkripciju s promotora *Pcas8e* i omogućuje zaštitu od infekcije fagom λvir (koja ovisi o mutaciji Δhns i temperaturi inkubacije (30 °C), ali je neovisna o sustavu CRISPR-Cas).
- Količine proteina Cas3 podjednake su na 30 °C i 37 °C, a ekspresija šaperona HtpG s plazmida značajno povećava količine proteina Cas3 samo u divljem tipu na 30 °C.
- Represor H-NS utječe na količine proteina Cas3 na post-transkripcijskoj ili post-translacijskoj razini obzirom da je mutacija u genu *hns* povećala količine proteina Cas3 u odnosu na divlji tip kad je transkripcija gena *cas3* neovisna o proteinu H-NS.
- Točkaste mutacije HtpG^{E34A} i HtpG^{W467R} ne utječu na interakciju s proteinom Cas3 u kontekstu obrane od infekcije fagom λvir .
- Mutant Δhns s anti-lambda razmaknicama osjetljiv je na infekciju fagom λvir na 37 °C zbog smanjene nukleazne aktivnosti proteina Cas3 uzrokovane pomakom Trp-406 unutar tunela, čime se blokira prolaz ssDNA prema nukleaznom centru.
- Točkasti mutant Cas3^{W406A} ne može stanicama omogućiti zaštitu od infekcije fagom λvir unatoč hiperaktivnoj nukleaznoj aktivnosti *in vitro*, vjerojatno zato što je izgubio mogućnost pravilne komunikacije s kompleksom Cascade.
- Mutacija u genu *hns* dovela je do značajnih promjena u ekspresiji 1166 gena na 30 °C, i 976 gena na 37 °C.

7. LITERATURA

- [1] R. Barrangou, C. Fremaux, H. Deveau, M. Richards, P. Boyaval, S. Moineau, D.A. Romero, P. Horvath, CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science*. 315 (2007) 1709–1712. <https://doi.org/10.1126/science.1138140>.
- [2] S.J.J. Brouns, M.M. Jore, M. Lundgren, E.R. Westra, R.J.H. Slijkhuis, A.P.L. Snijders, M.J. Dickman, K.S. Makarova, E. V. Koonin, J. van der Oost, Small CRISPR RNAs Guide Antiviral Defense in Prokaryotes, *Science*. 321 (2008) 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.
- [3] L.A. Marraffini, E.J. Sontheimer, CRISPR interference limits horizontal gene transfer in staphylococci by targeting DNA, *Science*. 322 (2008) 1843–1845. <https://doi.org/10.1126/science.1165771>.
- [4] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, J. Iranzo, S.A. Shmakov, O.S. Alkhnbashi, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D. Cheng, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, D. Scott, S.A. Shah, V. Siksnys, M.P. Terns, Č. Venclovas, M.F. White, A.F. Yakunin, W. Yan, F. Zhang, R.A. Garrett, R. Backofen, J. van der Oost, R. Barrangou, E. V. Koonin, Evolutionary classification of CRISPR–Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.* 18 (2020) 67–83. <https://doi.org/10.1038/s41579-019-0299-x>.
- [5] P. Pausch, B. Al-Shayeb, E. Bisom-Rapp, C.A. Tsuchida, Z. Li, B.F. Cress, G.J. Knott, S.E. Jacobsen, J.F. Banfield, J.A. Doudna, Crispr-cas Φ from huge phages is a hypercompact genome editor, *Science*. 369 (2020) 333–337. <https://doi.org/10.1126/science.abb1400>.
- [6] R. Pinilla-Redondo, D. Mayo-Muñoz, J. Russel, R.A. Garrett, L. Randau, S.J. Sørensen, S.A. Shah, Type IV CRISPR-Cas systems are highly diverse and involved in competition between plasmids, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 2000–2012. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1197>.
- [7] E. V Koonin, K.S. Makarova, F. Zhang, Diversity, classification and evolution of CRISPR-Cas systems, *Curr. Opin. Microbiol.* 37 (2017) 67–78. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2017.05.008>.
- [8] K. Pougach, E. Semenova, E. Bogdanova, K.A. Datsenko, M. Djordjevic, B.L. Wanner, K. Severinov, Transcription, processing and function of CRISPR cassettes in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 77 (2010) 1367–1379. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07265.x>.
- [9] F. Hille, H. Richter, S.P. Wong, M. Bratovič, S. Ressel, E. Charpentier, The Biology of CRISPR-Cas: Backward and Forward, *Cell*. 172 (2018) 1239–1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>.
- [10] C. Xue, D.G. Sashital, Mechanisms of Type I-E and I-F CRISPR-Cas Systems in Enterobacteriaceae, *EcoSal Plus*. 8 (2019) 1–38. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0008-2018>.
- [11] J.K. Nuñez, A.S.Y. Lee, A. Engelman, J.A. Doudna, Integrase-mediated spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nature*. 519 (2015) 193–198. <https://doi.org/10.1038/nature14237>.
- [12] J.K. Nuñez, P.J. Kranzusch, J. Noeske, A. V Wright, C.W. Davies, J.A. Doudna, Cas1–

- Cas2 complex formation mediates spacer acquisition during CRISPR–Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 528–534. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2820>.
- [13] I. Yosef, M.G. Goren, U. Qimron, Proteins and DNA elements essential for the CRISPR adaptation process in *Escherichia coli*, *Nucleic Acids Res.* 40 (2012) 5569–5576. <https://doi.org/10.1093/nar/gks216>.
- [14] D.C. Swarts, C. Mosterd, M.W.J. van Passel, S.J.J. Brouns, CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition, *PLoS One.* 7 (2012) 1–7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035888>.
- [15] K.A. Datsenko, K. Pougach, A. Tikhonov, B.L. Wanner, K. Severinov, E. Semenova, Molecular memory of prior infections activates the CRISPR/Cas adaptive bacterial immunity system, *Nat. Commun.* 3 (2012). <https://doi.org/10.1038/ncomms1937>.
- [16] D.G. Sashital, M. Jinek, J.A. Doudna, An RNA-induced conformational change required for CRISPR RNA cleavage by the endoribonuclease Cse3, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 680–687. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2043>.
- [17] M.M. Jore, M. Lundgren, E. Van Duijn, J.B. Bultema, E.R. Westra, S.P. Waghmare, B. Wiedenheft, Ü. Pul, R. Wurm, R. Wagner, M.R. Beijer, A. Barendregt, K. Zhou, A.P.L. Snijders, M.J. Dickman, J.A. Doudna, E.J. Boekema, A.J.R. Heck, J. Van Der Oost, S.J.J. Brouns, Structural basis for CRISPR RNA-guided DNA recognition by Cascade, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 529–536. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2019>.
- [18] S. Mulepati, A. Orr, S. Bailey, Crystal structure of the largest subunit of a bacterial RNA-guided immune complex and its role in DNA target binding, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 22445–22449. <https://doi.org/10.1074/jbc.C112.379503>.
- [19] T.W. Guo, A. Bartesaghi, H. Yang, V. Falconieri, P. Rao, A. Merk, E.T. Eng, A.M. Raczkowski, T. Fox, L.A. Earl, D.J. Patel, S. Subramaniam, Cryo-EM Structures Reveal Mechanism and Inhibition of DNA Targeting by a CRISPR-Cas Surveillance Complex, *Cell.* 171 (2017) 414-426.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.006>.
- [20] Y. Xiao, M. Luo, R.P. Hayes, J. Kim, S. Ng, F. Ding, M. Liao, A. Ke, Structure Basis for Directional R-loop Formation and Substrate Handover Mechanisms in Type I CRISPR-Cas System, *Cell.* 170 (2017) 48-60.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.06.012>.
- [21] T. Sinkunas, G. Gasiunas, C. Fremaux, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, Cas3 is a single-stranded DNA nuclease and ATP-dependent helicase in the CRISPR/Cas immune system, *EMBO J.* 30 (2011) 1335–1342. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.41>.
- [22] Y. Huo, K.H. Nam, F. Ding, H. Lee, L. Wu, Y. Xiao, M.D. Farchione, S. Zhou, K. Rajashankar, I. Kurinov, R. Zhang, A. Ke, Structures of CRISPR Cas3 offer mechanistic insights into Cascade-activated DNA unwinding and degradation, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 21 (2014) 771–777. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2875>.
- [23] B. Gong, M. Shin, J. Sun, C.H. Jung, E.L. Bolt, J. Van Der Oost, J.S. Kim, Molecular insights into DNA interference by CRISPR-associated nuclease-helicase Cas3, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 16359–16364. <https://doi.org/10.1073/pnas.1410806111>.

- [24] E.R. Westra, P.B.G. van Erp, T. Künne, S.P. Wong, R.H.J. Staals, C.L.C. Seegers, S. Bollen, M.M. Jore, E. Semenova, K. Severinov, W.M. de Vos, R.T. Dame, R. de Vries, S.J.J. Brouns, J. van der Oost, CRISPR Immunity Relies on the Consecutive Binding and Degradation of Negatively Supercoiled Invader DNA by Cascade and Cas3, *Mol. Cell.* 46 (2012) 595–605. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.018>.
- [25] Ü. Pul, R. Wurm, Z. Arslan, R. Geißen, N. Hofmann, R. Wagner, Identification and characterization of *E. coli* CRISPR-cas promoters and their silencing by H-NS, *Mol. Microbiol.* 75 (2010) 1495–1512. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07073.x>.
- [26] T. Oshima, S. Ishikawa, K. Kurokawa, H. Aiba, N. Ogasawara, Escherichia coli histone-like protein H-NS preferentially binds to horizontally acquired DNA in association with RNA polymerase, *DNA Res.* 13 (2006) 141–153. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsl009>.
- [27] J.M. Sonnenfield, C.M. Burns, C.F. Higgins, J.C.D. Hinton, The nucleoid-associated protein StpA binds curved DNA, has a greater DNA-binding affinity than H-NS and is present in significant levels in *hns* mutants, *Biochimie.* 83 (2001) 243–249. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(01\)01232-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(01)01232-9).
- [28] A. Zhang, S. Rimsky, M.E. Reaban, H. Buc, M. Belfort, Escherichia coli protein analogs StpA and H-NS: regulatory loops, similar and disparate effects on nucleic acid dynamics., *EMBO J.* 15 (1996) 1340–1349. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00476.x>.
- [29] B. Sondén, B.E. Uhlin, Coordinated and differential expression of histone-like proteins in Escherichia coli: Regulation and function of the H-NS analog StpA, *EMBO J.* 15 (1996) 4970–4980. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1996.tb00877.x>.
- [30] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakamura, Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isoenzyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 5429–5433. <https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.
- [31] A. Nakata, M. Amemura, K. Makino, Unusual nucleotide arrangement with repeated sequences in the Escherichia coli K-12 chromosome, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 3553–3556. <https://doi.org/10.1128/jb.171.6.3553-3556.1989>.
- [32] P.W.M. Hermans, D. Van Soolingen, E.M. Bik, P.E.W. De Haas, J.W. Dale, J.D.A. Van Embden, Insertion element IS987 from Mycobacterium bovis BCG is located in a hot-spot integration region for insertion elements in Mycobacterium tuberculosis complex strains, *Infect. Immun.* 59 (1991) 2695–2705. <https://doi.org/10.1128/iai.59.8.2695-2705.1991>.
- [33] P.M.A. Groenen, A.E. Bunschoten, D. van Soolingen, J.D.A. van Embden, Nature of DNA polymorphism in the direct repeat cluster of Mycobacterium tuberculosis; application for strain differentiation by a novel typing method, *Mol. Microbiol.* 10 (1993) 1057–1065. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb00976.x>.
- [34] F.J.M. Mojica, G. Juez, F. Rodríguez-Valera, Transcription at different salinities of Haloferax mediterranei sequences adjacent to partially modified PstI sites, *Mol. Microbiol.* 9 (1993) 613–621. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1993.tb01721.x>.
- [35] F.J.M. Mojica, C. Ferrer, G. Juez, F. Rodríguez-Valera, Long stretches of short tandem repeats are present in the largest replicons of the Archaea Haloferax mediterranei and

- Haloferax volcanii* and could be involved in replicon partitioning, *Mol. Microbiol.* 17 (1995) 85–93. https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.mmi_17010085.x.
- [36] Q. She, R.K. Singh, F. Confalonieri, Y. Zivanovic, G. Allard, M.J. Awayez, C.C.Y. Chan-Weiher, I.G. Clausen, B.A. Curtis, A. De Moors, G. Erauso, C. Fletcher, P.M.K. Gordon, I. Heikamp-de Jong, A.C. Jeffries, C.J. Kozera, N. Medina, X. Peng, H.P. Thi-Ngoc, P. Redder, M.E. Schenk, C. Theriault, N. Tolstrup, R.L. Charlebois, W.F. Doolittle, M. Duguet, T. Gaasterland, R.A. Garrett, M.A. Ragan, C.W. Sensen, J. Van Der Oost, The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 7835–7840. <https://doi.org/10.1073/pnas.141222098>.
- [37] Y. Ishino, M. Krupovic, P. Forterre, History of CRISPR-Cas from Encounter with a Mysterious, *J. Bacteriol.* 200 (2018) e00580-17.
- [38] F.J.M. Mojica, C. Díez-Villasenor, E. Soria, G. Juez, Biological significance of a family of regularly spaced repeats in the genomes of Archaea, Bacteria and mitochondria, *Mol. Microbiol.* 36 (2000) 244–246. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01838.x>.
- [39] R. Jansen, J.D.A. Van Embden, W. Gaastra, L.M. Schouls, Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Mol. Microbiol.* 43 (2002) 1565–1575. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.02839.x>.
- [40] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, S.J. Saunders, R. Barrangou, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, R.M. Terns, M.P. Terns, M.F. White, A.F. Yakunin, R.A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E. V. Koonin, An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- [41] F.J.M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, J. García-Martínez, E. Soria, Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements, *J. Mol. Evol.* 60 (2005) 174–182. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0046-3>.
- [42] C. Pourcel, G. Salvignol, G. Vergnaud, CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies, *Microbiology.* 151 (2005) 653–663. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27437-0>.
- [43] A. Bolotin, B. Quinquis, A. Sorokin, S. Dusko Ehrlich, Clustered regularly interspaced short palindrome repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin, *Microbiology.* 151 (2005) 2551–2561. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28048-0>.
- [44] K.S. Makarova, N. V. Grishin, S.A. Shabalina, Y.I. Wolf, E. V. Koonin, A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: Computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action, *Biol. Direct.* 1 (2006) 1–26. <https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-7>.
- [45] P. Horvath, R. Barrangou, CRISPR/Cas, the Immune System of Bacteria and Archaea, *Science.* 327 (2010) 167–170. <https://doi.org/10.1126/science.1179555>.
- [46] B. Wiedenheft, S.H. Sternberg, J.A. Doudna, RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea, *Nature.* 482 (2012) 331–338.

<https://doi.org/10.1038/nature10886>.

- [47] P. Mohanraju, K.S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E. V. Koonin, J. Van Der Oost, Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems, *Science*. 353 (2016). <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>.
- [48] Y. Zheng, J. Li, B. Wang, J. Han, Y. Hao, S. Wang, X. Ma, S. Yang, L. Ma, L. Yi, W. Peng, Endogenous Type I CRISPR-Cas: From Foreign DNA Defense to Prokaryotic Engineering, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 1–17. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00062>.
- [49] S. Shmakov, A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, K.S. Makarova, Y.I. Wolf, K. Severinov, F. Zhang, E. V. Koonin, Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems, *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017) 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>.
- [50] D. Burstein, L.B. Harrington, S.C. Strutt, A.J. Probst, K. Anantharaman, B.C. Thomas, J.A. Doudna, J.F. Banfield, New CRISPR-Cas systems from uncultivated microbes, *Nature*. 542 (2017) 237–241. <https://doi.org/10.1038/nature21059>.
- [51] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity, *Science*. 337 (2012) 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- [52] G. Gasiunas, R. Barrangou, P. Horvath, V. Siksnys, Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 2579–2586. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208507109>.
- [53] M. Jinek, A. East, A. Cheng, S. Lin, E. Ma, J. Doudna, RNA-programmed genome editing in human cells, *Elife*. 2013 (2013) 1–9. <https://doi.org/10.7554/eLife.00471>.
- [54] L. Cong, F.A. Ran, D. Cox, S. Lin, R. Barretto, N. Habib, P.D. Hsu, X. Wu, W. Jiang, L. a Marraffini, F. Zhang, Multiplex Genome Engineering Using CRISPR/Cas Systems, *Science*. 339 (2013) 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>.
- [55] P. Mali, L. Yang, K.M. Esvelt, J. Aach, M. Guell, J.E. DiCarlo, J.E. Norville, G.M. Church, RNA-guided human genome engineering via Cas9, *Science*. 339 (2013) 823–826. <https://doi.org/10.1126/science.1232033>.
- [56] J.A. Doudna, The promise and challenge of therapeutic genome editing, *Nature*. 578 (2020) 229–236. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-1978-5>.
- [57] H. Li, Y. Yang, W. Hong, M. Huang, M. Wu, X. Zhao, Applications of genome editing technology in the targeted therapy of human diseases: mechanisms, advances and prospects, *Signal Transduct. Target. Ther.* 5 (2020). <https://doi.org/10.1038/s41392-019-0089-y>.
- [58] D. Zhang, A. Hussain, H. Manghwar, K. Xie, S. Xie, S. Zhao, R.M. Larkin, P. Qing, S. Jin, F. Ding, Genome editing with the CRISPR-Cas system: an art, ethics and global regulatory perspective, *Plant Biotechnol. J.* 18 (2020) 1651–1669. <https://doi.org/10.1111/pbi.13383>.
- [59] D. Bikard, C. Euler, W. Jiang, P.M. Nussenzweig, G.G. W., X. Duportet, V.A. Fischetti, L.A. Marraffini, Development of sequence-specific antimicrobials based on programmable CRISPR-Cas nucleases, *Nat Biotechnol.* 32 (2014) 1146–1150.

<https://doi.org/10.1038/nbt.3043>.Development.

- [60] R.J. Citorik, M. Mimee, T.K. Lu, Sequence-specific antimicrobials using efficiently delivered RNA-guided nucleases, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 1141–1145. <https://doi.org/10.1038/nbt.3011>.
- [61] B. Chen, L.A. Gilbert, B.A. Cimini, J. Schnitzbauer, W. Zhang, G. Li, J. Park, E.H. Blackburn, J.S. Weissman, L.S. Qi, B. Huang, Dynamic Imaging of Genomic Loci in Living Human Cells by an Optimized CRISPR/Cas System, *Cell.* 155 (2013) 1479–1491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.12.001>.
- [62] D. Bikard, W. Jiang, P. Samai, A. Hochschild, F. Zhang, L.A. Marraffini, Programmable repression and activation of bacterial gene expression using an engineered CRISPR-Cas system, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 7429–7437. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt520>.
- [63] L.S. Qi, M.H. Larson, L.A. Gilbert, J.A. Doudna, J.S. Weissman, A.P. Arkin, W.A. Lim, Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression, *Cell.* 152 (2013) 1173–1183. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.022>.
- [64] L.A. Gilbert, M.H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G.A. Brar, S.E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E.H. Whitehead, J.A. Doudna, W.A. Lim, J.S. Weissman, L.S. Qi, CRISPR-Mediated Modular RNA-Guided Regulation of Transcription in Eukaryotes, *Cell.* 154 (2013) 442–451. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.06.044>.
- [65] J.P. Guilinger, D.B. Thompson, D.R. Liu, Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification, *Nat. Biotechnol.* 32 (2014) 577–582. <https://doi.org/10.1038/nbt.2909>.
- [66] S.Q. Tsai, N. Wyvekens, C. Khayter, J.A. Foden, V. Thapar, D. Reyon, M.J. Goodwin, M.J. Aryee, K. Joung, P. Unit, M.G. Hospital, M.G. Hospital, I. Biology, M.G. Hospital, Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing HHS Public Access Author manuscript, *Nat Biotechnol.* 32 (2014) 569–576. <https://doi.org/10.1038/nbt.2908>.Dimeric.
- [67] S. Havlicek, Y. Shen, Y. Alpagu, M.B. Bruntraeger, N.B.M. Zufir, Z.Y. Phuah, Z. Fu, N.R. Dunn, L.W. Stanton, Re-engineered RNA-Guided FokI-Nucleases for Improved Genome Editing in Human Cells, *Mol. Ther.* 25 (2017) 342–355. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2016.11.007>.
- [68] Z. Gao, M. Fan, A.T. Das, E. Herrera-Carrillo, B. Berkhout, Extinction of all infectious HIV in cell culture by the CRISPR-Cas12a system with only a single crRNA, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 5527–5539. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAA226>.
- [69] H. Kim, S.T. Kim, J. Ryu, B.C. Kang, J.S. Kim, S.G. Kim, CRISPR/Cpf1-mediated DNA-free plant genome editing, *Nat. Commun.* 8 (2017) 1–7. <https://doi.org/10.1038/ncomms14406>.
- [70] R. Aman, Z. Ali, H. Butt, A. Mahas, F. Aljedaani, M.Z. Khan, S. Ding, M. Mahfouz, RNA virus interference via CRISPR/Cas13a system in plants, *Genome Biol.* 19 (2018) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1381-1>.
- [71] C.H. Huang, K.C. Lee, J.A. Doudna, Applications of CRISPR-Cas Enzymes in Cancer Therapeutics and Detection, *Trends in Cancer.* 4 (2018) 499–512.

<https://doi.org/10.1016/j.trecan.2018.05.006>.

- [72] L.G.T. Morris, T.A. Chan, Therapeutic targeting of tumor suppressor genes, *Cancer*. 121 (2015) 1357–1368. <https://doi.org/10.1002/cncr.29140>.
- [73] P. Cameron, M.M. Coons, S.E. Klompe, A.M. Lied, S.C. Smith, B. Vidal, P.D. Donohoue, T. Rotstein, B.W. Kohrs, D.B. Nyer, R. Kennedy, L.M. Banh, C. Williams, M.S. Toh, M.J. Irby, L.S. Edwards, C.H. Lin, A.L.G. Owen, T. Künne, J. van der Oost, S.J.J. Brouns, E.M. Slorach, C.K. Fuller, S. Gradia, S.B. Kanner, A.P. May, S.H. Sternberg, Harnessing type I CRISPR–Cas systems for genome engineering in human cells, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 1471–1477. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0310-0>.
- [74] A.E. Dolan, Z. Hou, Y. Xiao, M.J. Gramelspacher, J. Heo, S.E. Howden, P.L. Freddolino, A. Ke, Y. Zhang, Introducing a Spectrum of Long-Range Genomic Deletions in Human Embryonic Stem Cells Using Type I CRISPR-Cas, *Mol. Cell*. 74 (2019) 936–950.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.03.014>.
- [75] H. Morisaka, K. Yoshimi, Y. Okuzaki, P. Gee, Y. Kunihiro, E. Sonpho, H. Xu, N. Sasakawa, Y. Naito, S. Nakada, T. Yamamoto, S. Sano, A. Hotta, J. Takeda, T. Mashimo, CRISPR-Cas3 induces broad and unidirectional genome editing in human cells, *Nat. Commun.* 10 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13226-x>.
- [76] Y. Jiang, B. Chen, C. Duan, B. Sun, J. Yang, S. Yang, Multigene editing in the *Escherichia coli* genome via the CRISPR-Cas9 system, *Appl. Environ. Microbiol.* 81 (2015) 2506–2514. <https://doi.org/10.1128/AEM.04023-14>.
- [77] U. Gophna, T. Allers, A. Marchfelder, Finally, Archaea Get Their CRISPR-Cas Toolbox, *Trends Microbiol.* 25 (2017) 430–432. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.009>.
- [78] I. Mougiakos, E.F. Bosma, W.M. de Vos, R. van Kranenburg, J. van der Oost, Next Generation Prokaryotic Engineering: The CRISPR-Cas Toolkit, *Trends Biotechnol.* 34 (2016) 575–587. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2016.02.004>.
- [79] J. Kamerbeek, L. Schouls, A. Kolk, M. Van Agterveld, D. Van Soolingen, S. Kuijper, A. Bunschoten, H. Molhuizen, R. Shaw, M. Goyal, J. Van Embden, Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology, *J. Clin. Microbiol.* 35 (1997) 907–914. <https://doi.org/10.1128/jcm.35.4.907-914.1997>.
- [80] Y. Cui, Y. Li, O. Gorgé, M.E. Platonov, Y. Yan, Z. Guo, C. Pourcel, S. V. Dentovskaya, S. V. Balakhonov, X. Wang, Y. Song, A.P. Anisimov, G. Vergnaud, R. Yang, Insight into microevolution of *Yersinia pestis* by clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *PLoS One*. 3 (2008) 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002652>.
- [81] F. Liu, S. Kariyawasam, B.M. Jayarao, R. Barrangou, P. Gerner-Smidt, E.M. Ribot, S.J. Knabel, E.G. Dudley, Subtyping *Salmonella enterica* serovar enteritidis isolates from different sources by using sequence typing based on virulence genes and clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs), *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 4520–4526. <https://doi.org/10.1128/AEM.00468-11>.
- [82] F. Liu, R. Barrangou, P. Gerner-Smidt, E.M. Ribot, S.J. Knabel, E.G. Dudley, Novel virulence gene and clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)

- multilocus sequence typing scheme for subtyping of the major serovars of *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, *Appl. Environ. Microbiol.* 77 (2011) 1946–1956. <https://doi.org/10.1128/AEM.02625-10>.
- [83] I. Mokrousov, O. Narvskaya, E. Limeschenko, A. Vyazovaya, Efficient discrimination within a *Corynebacterium diphtheriae* epidemic clonal group by a novel macroarray-based method, *J. Clin. Microbiol.* 43 (2005) 1662–1668. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.4.1662-1668.2005>.
- [84] C. Díez-Villaseñor, C. Almendros, J. García-Martínez, F.J.M. Mojica, Diversity of CRISPR loci in *Escherichia coli*, *Microbiology.* 156 (2010) 1351–1361. <https://doi.org/10.1099/mic.0.036046-0>.
- [85] C. Almendros, F.J.M. Mojica, C. Díez-Villaseñor, N.M. Guzmán, J. García-Martínez, CRISPR-cas functional module exchange in *Escherichia coli*, *MBio.* 5 (2014). <https://doi.org/10.1128/mBio.00767-13>.
- [86] E.R. Westra, Ü. Pul, N. Heidrich, M.M. Jore, M. Lundgren, T. Stratmann, R. Wurm, A. Raine, M. Mescher, L. Van Heereveld, M. Mastop, E.G.H. Wagner, K. Schnetz, J. Van Der Oost, R. Wagner, S.J.J. Brouns, H-NS-mediated repression of CRISPR-based immunity in *Escherichia coli* K12 can be relieved by the transcription activator LeuO, *Mol. Microbiol.* 77 (2010) 1380–1393. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07315.x>.
- [87] D. Markulin, D. Mitić, M. Radovčić, I. Ivančić-Baće, Crispr-cas in *Escherichia coli*: Regulation by h-ns, leuo and temperature, *Period. Biol.* 121–122 (2020) 155–160. <https://doi.org/10.18054/pb.v121-122i3-4.10994>.
- [88] O. Schröder, R. Wagner, The bacterial regulatory protein H-NS-A versatile modulator of nucleic acid structures, *Biol. Chem.* 383 (2002) 945–960. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.101>.
- [89] W.W. Navarre, S. Porwollik, Y. Wang, M. McClelland, H. Rosen, S.J. Libby, F.C. Fang, Selective silencing of foreign DNA with low GC content by the H-NS protein in *Salmonella*, *Science.* 313 (2006) 236–238. <https://doi.org/10.1126/science.1128794>.
- [90] Y. Liu, H. Chen, L.J. Kenney, J. Yan, A divalent switch drives H-NS/DNA-binding conformations between stiffening and bridging modes, *Genes Dev.* 24 (2010) 339–344. <https://doi.org/10.1101/gad.1883510>.
- [91] K. Majsec, E.L. Bolt, I. Ivančić-Baće, Cas3 is a limiting factor for CRISPR-Cas immunity in *Escherichia coli* cells lacking H-NS, *BMC Microbiol.* 16 (2016) 1–9. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0643-5>.
- [92] C.D. Yang, Y.H. Chen, H.Y. Huang, H. Da Huang, C.P. Tseng, CRP represses the CRISPR/Cas system in *Escherichia coli*: Evidence that endogenous CRISPR spacers impede phage P1 replication, *Mol. Microbiol.* 92 (2014) 1072–1091. <https://doi.org/10.1111/mmi.12614>.
- [93] D. Yang, Z. Wang, J. Ma, Q. Fu, L. Wu, H. Wang, S. Wang, Y. Yan, J. Sun, Glycine Cleavage System and cAMP Receptor Protein Co-Regulate CRISPR/cas3 Expression to Resist Bacteriophage, *Viruses.* 12 (2020) 90. <https://doi.org/10.3390/v12010090>.
- [94] D.M. Stoebel, A. Free, C.J. Dorman, Anti-silencing: Overcoming H-NS-mediated repression of transcription in Gram-negative enteric bacteria, *Microbiology.* 154 (2008)

2533–2545. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/020693-0>.

- [95] T. Shimada, A. Bridier, R. Briandet, A. Ishihama, Novel roles of LeuO in transcription regulation of *E. coli* genome: Antagonistic interplay with the universal silencer H-NS, *Mol. Microbiol.* 82 (2011) 378–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07818.x>.
- [96] C. Richter, R.L. Dy, R.E. McKenzie, B.N.J. Watson, C. Taylor, J.T. Chang, M.B. McNeil, R.H.J. Staals, P.C. Fineran, Priming in the Type I-F CRISPR-Cas system triggers strand-independent spacer acquisition, bi-directionally from the primed protospacer, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 8516–8526. <https://doi.org/10.1093/nar/gku527>.
- [97] D. Vorontsova, K.A. Datsenko, S. Medvedeva, J. Bondy-Denomy, E.E. Savitskaya, K. Pougach, M. Logacheva, B. Wiedenheft, A.R. Davidson, K. Severinov, E. Semenova, Foreign DNA acquisition by the I-F CRISPR-Cas system requires all components of the interference machinery, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 10848–10860. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1261>.
- [98] R.E. Haurwitz, M. Jinek, B. Wiedenheft, K. Zhou, J.A. Doudna, Sequence- and Structure-Specific RNA Processing by a CRISPR Endonuclease, *Science.* 329 (2010) 1355–1358. <https://doi.org/10.1126/science.1192272>.
- [99] E.M. Gesner, M.J. Schellenberg, E.L. Garside, M.M. George, A.M. MacMillan, Recognition and maturation of effector RNAs in a CRISPR interference pathway, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2011) 688–692. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2042>.
- [100] S.H. Sternberg, R.E. Haurwitz, J.A. Doudna, Mechanism of substrate selection by a highly specific CRISPR endonuclease, *Rna.* 18 (2012) 661–672. <https://doi.org/10.1261/rna.030882.111>.
- [101] B. Wiedenheft, G.C. Lander, K. Zhou, M.M. Jore, S.J.J. Brouns, J. Van Der Oost, J.A. Doudna, E. Nogales, Structures of the RNA-guided surveillance complex from a bacterial immune system, *Nature.* 477 (2011) 486–489. <https://doi.org/10.1038/nature10402>.
- [102] R.N. Jackson, S.M. Golden, P.B.G. van Erp, J. Carter, E.R. Westra, S.J.J. Brouns, J. van der Oost, T.C. Terwilliger, R.J. Read, B. Wiedenheft, Crystal structure of the CRISPR RNA-guided surveillance complex from *Escherichia coli*, *Science.* 345 (2014) 1473–1479. <https://doi.org/10.1126/science.1256328>.
- [103] H. Zhao, G. Sheng, J. Wang, M. Wang, G. Bunkoczi, W. Gong, Z. Wei, Y. Wang, Crystal structure of the RNA-guided immune surveillance Cascade complex in *Escherichia coli*, *Nature.* 515 (2014) 147–150. <https://doi.org/10.1038/nature13733>.
- [104] D.G. Sashital, B. Wiedenheft, J.A. Doudna, Mechanism of Foreign DNA Selection in a Bacterial Adaptive Immune System, *Mol. Cell.* 46 (2012) 606–615. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.03.020>.
- [105] S. Redding, S.H. Sternberg, M. Marshall, B. Gibb, P. Bhat, C.K. Guegler, B. Wiedenheft, J.A. Doudna, E.C. Greene, Surveillance and Processing of Foreign DNA by the *Escherichia coli* CRISPR-Cas System, *Cell.* 163 (2015) 854–865. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.003>.
- [106] E. Semenova, M.M. Jore, K.A. Datsenko, A. Semenova, E.R. Westra, B. Wanner, J.

- Van Der Oost, S.J.J. Brouns, K. Severinov, Interference by clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR) RNA is governed by a seed sequence, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 10098–10103. <https://doi.org/10.1073/pnas.1104144108>.
- [107] E.R. Westra, E. Semenova, K.A. Datsenko, R.N. Jackson, B. Wiedenheft, K. Severinov, S.J.J. Brouns, Type I-E CRISPR-Cas Systems Discriminate Target from Non-Target DNA through Base Pairing-Independent PAM Recognition, *PLoS Genet.* 9 (2013). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003742>.
- [108] C. Xue, A.S. Seetharam, O. Musharova, K. Severinov, S.J.J. Brouns, A.J. Severin, D.G. Sashital, CRISPR interference and priming varies with individual spacer sequences, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 10831–10847. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1259>.
- [109] R.T. Leenay, K.R. Maksimchuk, R.A. Slotkowski, R.N. Agrawal, A.A. Goma, A.E. Briner, R. Barrangou, C.L. Beisel, Identifying and Visualizing Functional PAM Diversity across CRISPR-Cas Systems, *Mol. Cell.* 62 (2016) 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.02.031>.
- [110] R.P. Hayes, Y. Xiao, F. Ding, P.B.G. van Erp, K. Rajashankar, S. Bailey, B. Wiedenheft, A. Ke, Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I-E Cascade from *E. coli*, *Nature.* 530 (2016) 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature16995>.
- [111] P.B.G. van Erp, A. Patterson, R. Kant, L. Berry, S.M. Golden, B.L. Forsman, J. Carter, R.N. Jackson, B. Bothner, B. Wiedenheft, Conformational Dynamics of DNA Binding and Cas3 Recruitment by the CRISPR RNA-Guided Cascade Complex, *ACS Chem. Biol.* 13 (2018) 481–490. <https://doi.org/10.1021/acscchembio.7b00649>.
- [112] C. Xue, N.R. Whitis, D.G. Sashital, Conformational Control of Cascade Interference and Priming Activities in CRISPR Immunity, *Mol. Cell.* 64 (2016) 826–834. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.09.033>.
- [113] Y. Xiao, M. Luo, A.E. Dolan, M. Liao, A. Ke, Structure basis for RNA-guided DNA degradation by Cascade and Cas3, *Science.* 361 (2018) 139–148. <https://doi.org/10.1126/science.aat0839>.
- [114] R.N. Jackson, M. Lavin, J. Carter, B. Wiedenheft, Fitting CRISPR-associated Cas3 into the Helicase Family Tree, *Curr. Opin. Struct. Biol.* 24 (2014) 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2014.01.001>.
- [115] K. Yoshimi, K. Takeshita, N. Kodera, S. Shibumura, Y. Yamauchi, M. Omatsu, K. Umeda, Y. Kunihiro, M. Yamamoto, T. Mashimo, Dynamic mechanisms of CRISPR interference by *Escherichia coli* CRISPR-Cas3, *Nat. Commun.* 13 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32618-0>.
- [116] K.S. Makarova, L. Aravind, N. V. Grishin, I.B. Rogozin, E. V. Koonin, A DNA repair system specific for thermophilic Archaea and bacteria predicted by genomic context analysis, *Nucleic Acids Res.* 30 (2002) 482–496. <https://doi.org/10.1093/nar/30.2.482>.
- [117] L. He, M. St. John James, M. Radovic, I. Ivancic-Bace, E.L. Bolt, Cas3 Protein—A Review of a Multi-Tasking Machine, *Genes (Basel).* 11 (2020) 208. <https://doi.org/10.3390/genes11020208>.

- [118] S. Mulepati, S. Bailey, Structural and biochemical analysis of nuclease domain of clustered regularly interspaced short palindromic repeat (CRISPR)-associated protein 3 (Cas3), *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 31896–31903. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.270017>.
- [119] L. Loeff, S.J.J. Brouns, C. Joo, Repetitive DNA Reeling by the Cascade-Cas3 Complex in Nucleotide Unwinding Steps, *Mol. Cell.* 70 (2018) 385–394.e3. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.03.031>.
- [120] M.L. Hochstrasser, D.W. Taylor, P. Bhat, C.K. Guegler, S.H. Sternberg, E. Nogales, J.A. Doudna, CasA mediates Cas3-catalyzed target degradation during CRISPR RNA-guided interference, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111 (2014) 6618–6623. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405079111>.
- [121] M.R. Singleton, M.S. Dillingham, D.B. Wigley, Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 23–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.76.052305.115300>.
- [122] K.E. Dillard, M.W. Brown, N. V Johnson, Y. Xiao, A. Dolan, E. Hernandez, S.D. Dahlhauser, Y. Kim, L.R. Myler, E. V Anslyn, A. Ke, I.J. Finkelstein, Assembly and Translocation of a CRISPR-Cas Primed Acquisition Complex, *Cell.* 175 (2018) 934–946.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.039>.
- [123] N. Beloglazova, P. Petit, R. Flick, G. Brown, A. Savchenko, A.F. Yakunin, Structure and activity of the Cas3 HD nuclease MJ0384, an effector enzyme of the CRISPR interference, *EMBO J.* 30 (2011) 4616–4627. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.377>.
- [124] A. Plagens, B. Tjaden, A. Hagemann, L. Randau, R. Hensel, Characterization of the CRISPR/Cas subtype I-A system of the hyperthermophilic crenarchaeon *Thermoproteus tenax*, *J. Bacteriol.* 194 (2012) 2491–2500. <https://doi.org/10.1128/JB.00206-12>.
- [125] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E. V. Koonin, Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?, *Cris. J.* 1 (2018) 325–336. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0033>.
- [126] M. Radovčić, A. Čulo, I. Ivančić-Baće, Cas3-stimulated runaway replication of modified ColE1 plasmids in *Escherichia coli* is temperature dependent, *FEMS Microbiol. Lett.* 366 (2019) 1–7. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnz106>.
- [127] A. Zhang, M. Belfort, Nucleotide sequence of a newly-identified *Escherichia coli* gene, *stpA*, encoding an H-NS-like protein, *Nucleic Acids Res.* 20 (1992) 6735–6735. <https://doi.org/10.1093/nar/20.24.6735>.
- [128] T. Wolf, W. Janzen, C. Blum, K. Schnetz, Differential dependence of StpA on H-NS in autoregulation of *stpA* and in regulation of *bgl*, *J. Bacteriol.* 188 (2006) 6728–6738. <https://doi.org/10.1128/JB.00586-06>.
- [129] A. Zhang, V. Derbyshire, J.L. Galloway Salvo, M. Belfort, *Escherichia coli* protein StpA stimulates self-splicing by promoting RNA assembly in vitro, *Rna.* 1 (1995) 783–793.
- [130] X. Shi, G.N. Bennett, Plasmids bearing *hfq* and the *hns*-like gene *stpA* complement *hns* mutants in modulating arginine decarboxylase gene expression in *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 176 (1994) 6769–6775. <https://doi.org/10.1128/jb.176.21.6769-6775.1994>.

- [131] E. Uyar, K. Kurokawa, M. Yoshimura, S. Ishikawa, N. Ogasawara, T. Oshima, Differential binding profiles of StpA in wild-type and hns mutant cells: A comparative analysis of cooperative partners by chromatin immunoprecipitation- microarray analysis, *J. Bacteriol.* 191 (2009) 2388–2391. <https://doi.org/10.1128/JB.01594-08>.
- [132] T. Stratmann, Ü. Pul, R. Wurm, R. Wagner, K. Schnetz, RcsB-BglJ activates the *Escherichia coli* leuO gene, encoding an H-NS antagonist and pleiotropic regulator of virulence determinants, *Mol. Microbiol.* 83 (2012) 1109–1123. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.07993.x>.
- [133] E. Klauck, J. Böhringer, R. Hengge-Aronis, The LysR-like regulator LeuO in *Escherichia coli* is involved in the translational regulation of rpoS by affecting the expression of the small regulatory DsrA-RNA, *Mol. Microbiol.* 25 (1997) 559–569. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.4911852.x>.
- [134] A. Free, C.J. Dorman, The *Escherichia coli* stpA gene is transiently expressed during growth in rich medium and is induced in minimal medium and by stress conditions, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 909–918. <https://doi.org/10.1128/jb.179.3.909-918.1997>.
- [135] L. Medina-Aparicio, J.E. Rebollar-Flores, A.L. Gallego-Hernández, A. Vázquez, L. Olvera, R.M. Gutiérrez-Ríos, E. Calva, I. Hernández-Lucas, The CRISPR/Cas Immune System Is an Operon Regulated by LeuO, H-NS, and Leucine-Responsive Regulatory Protein in *Salmonella enterica* Serovar Typhi, *J. Bacteriol.* 193 (2011) 2396–2407. <https://doi.org/10.1128/JB.01480-10>.
- [136] J. Johansson, B.E. Uhlin, Differential protease-mediated turnover of H-NS and StpA revealed by a mutation altering protein stability and stationary-phase survival of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 10776–10781. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.19.10776>.
- [137] A.Y. Amerik, V.K. Antonov, A.E. Gorbalenya, S.A. Kotova, T. V. Rotanova, E. V. Shimbarevich, Site-directed mutagenesis of La protease, *FEBS Lett.* 287 (1991) 211–214. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80053-6](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80053-6).
- [138] A.L. Goldberg, ATP-Dependent Protease La (Lon) from *Escherichia coli*, *Methods.* 244 (1994) 350–375.
- [139] T. Ogura, A.J. Wilkinson, AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function, *Genes to Cells.* 6 (2001) 575–597. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x>.
- [140] J.A. Maupin-Furlow, M.A. Gil, M.A. Humbard, P.A. Kirkland, W. Li, C.J. Reuter, A.J. Wright, Archaeal proteasomes and other regulatory proteases, *Curr. Opin. Microbiol.* 8 (2005) 720–728. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2005.10.005>.
- [141] E.B. Aksam, A. Koek, J.A.K.W. Kiel, S. Jourdan, M. Veenhuis, I.J. Van Der Klei, A peroxisomal Lon protease and peroxisome degradation by autophagy play key roles in vitality of *Hansenula polymorpha* cells, *Autophagy.* 3 (2007) 96–105. <https://doi.org/10.4161/auto.3534>.
- [142] H. Matsui, M. Suzuki, Y. Isshiki, C. Kodama, M. Eguchi, Y. Kikuchi, K. Motokawa, A. Takaya, T. Tomoyasu, T. Yamamoto, Oral immunization with ATP-dependent protease-deficient mutants protects mice against subsequent oral challenge with virulent *Salmonella enterica* serovar typhimurium, *Infect. Immun.* 71 (2003) 30–39. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.1.30-39.2003>.

- [143] I. Lee, C.K. Suzuki, Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease- lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates, *Biochim. Biophys. Acta - Proteins Proteomics*. 1784 (2008) 727–735.
<https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2008.02.010>.
- [144] T. V. Rotanova, I. Botos, E.E. Melnikov, F. Rasulova, A. Gustchina, M.R. Maurizi, A. Wlodawer, Slicing a protease: Structural features of the ATP-dependent Lon proteases gleaned from investigations of isolated domains, *Protein Sci.* 15 (2006) 1815–1828.
<https://doi.org/10.1110/ps.052069306>.
- [145] G.M. Heilek, R. Marusak, C.F. Meares, H.F. Noller, Directed hydroxyl radical probing of 16S rRNA using Fe(II) tethered to ribosomal protein S4, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 1113–1116. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.4.1113>.
- [146] A.F. Neuwald, L. Aravind, J.L. Spouge, E. V. Koonin, AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes, *Genome Res.* 9 (1999) 27–43. <https://doi.org/10.1101/gr.9.1.27>.
- [147] M.R. Maurizi, Proteases and protein degradation in *Escherichia coli*, *Experientia*. 48 (1992) 178–201. <https://doi.org/10.1007/BF01923511>.
- [148] S. Gottesman, Proteolysis in Bacterial Regulatory Circuits, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 19 (2003) 565–587. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.19.110701.153228>.
- [149] J.M. Schoemaker, R.C. Gayda, A. Markovitz, Regulation of cell division in *Escherichia coli*: SOS induction and cellular location of the Sula protein, a key to lon-associated filamentation and death, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 551–561.
<https://doi.org/10.1128/jb.158.2.551-561.1984>.
- [150] A.S. Torres-Cabassa, S. Gottesman, Capsule synthesis in *Escherichia coli* K-12 is regulated by proteolysis, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 981–989.
<https://doi.org/10.1128/jb.169.3.981-989.1987>.
- [151] A. Dopazo, A. Tormo, M. Aldea, M. Vicente, Structural inhibition and reactivation of *Escherichia coli* septation by elements of the SOS and TER pathways, *J. Bacteriol.* 169 (1987) 1772–1776. <https://doi.org/10.1128/jb.169.4.1772-1776.1987>.
- [152] R. Wright, C. Stephens, G. Zweiger, L. Shapiro, M.R.K. Alley, *Caulobacter* Lon protease has a critical role in cell-cycle control of DNA methylation, *Genes Dev.* 10 (1996) 1532–1542. <https://doi.org/10.1101/gad.10.12.1532>.
- [153] S. Dole, Y. Klingen, V. Nagarajavel, K. Schnetz, The Protease Lon and the RNA-Binding Protein Hfq Reduce Silencing of the *Escherichia coli* bgl Operon by H-NS, *J. Bacteriol.* 186 (2004) 2708–2716. <https://doi.org/10.1128/JB.186.9.2708-2716.2004>.
- [154] J. Heuveling, A. Possling, R. Hengge, A role for Lon protease in the control of the acid resistance genes of *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.* 69 (2008) 534–547.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06306.x>.
- [155] M.D. Brazas, E.B.M. Breidenstein, J. Overhage, R.E.W. Hancock, Role of Lon, an ATP-dependent protease homolog, in resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to ciprofloxacin, *Antimicrob. Agents Chemother.* 51 (2007) 4276–4283.
<https://doi.org/10.1128/AAC.00830-07>.
- [156] L. Fernandez, E.B.M. Breidenstein, P.K. Taylor, M. Bains, C. De La Fuente-Nunez, Y. Fang, L.J. Foster, R.E.W. Hancock, Interconnection of post-transcriptional regulation:

- The RNA-binding protein Hfq is a novel target of the Lon protease in *Pseudomonas aeruginosa*, *Sci. Rep.* 6 (2016) 1–11. <https://doi.org/10.1038/srep26811>.
- [157] M.F. Charette, G.W. Henderson, L.L. Doane, A. Markovitz, DNA-stimulated ATPase activity on the lon (CapR) protein, *J. Bacteriol.* 158 (1984) 195–201. <https://doi.org/10.1128/jb.158.1.195-201.1984>.
- [158] C.H. Chung, A.L. Goldberg, DNA stimulates ATP-dependent proteolysis and protein-dependent ATPase activity of protease La from *Escherichia coli*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 79 (1982) 795–799. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.3.795>.
- [159] G.K. Fu, M.J. Smith, D.M. Markovitz, Bacterial Protease Lon Is a Site-specific DNA-binding Protein, *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 534–538. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.1.534>.
- [160] M.L. Wohlever, T.A. Baker, R.T. Sauer, Roles of the N domain of the AAA+ Lon protease in substrate recognition, allosteric regulation and chaperone activity, *Mol. Microbiol.* 91 (2014) 66–78. <https://doi.org/10.1111/mmi.12444>.
- [161] J.C. Bardwell, E.A. Craig, Eukaryotic Mr 83,000 heat shock protein has a homologue in *Escherichia coli*., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 84 (1987) 5177–5181. <https://doi.org/10.1073/pnas.84.15.5177>.
- [162] O. Genest, S. Wickner, S.M. Doyle, Hsp90 and Hsp70 chaperones: Collaborators in protein remodeling, *J. Biol. Chem.* 294 (2019) 2109–2120. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV118.002806>.
- [163] J. Spence, C. Georgopoulos, Purification and properties of the *Escherichia coli* heat shock protein, HtpG, *J. Biol. Chem.* 264 (1989) 4398–4403. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(18\)83755-3](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(18)83755-3).
- [164] F.H. Schopf, M.M. Biebl, J. Buchner, The HSP90 chaperone machinery, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18 (2017) 345–360. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.20>.
- [165] M. Radli, S.G.D. Rüdiger, Dancing with the Diva: Hsp90–Client Interactions, *J. Mol. Biol.* 430 (2018) 3029–3040. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2018.05.026>.
- [166] A. Balasubramanian, M. Markovski, J.R. Hoskins, S.M. Doyle, S. Wickner, Hsp90 of *E. Coli* modulates assembly of FtsZ, the bacterial tubulin homolog, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116 (2019) 12285–12294. <https://doi.org/10.1073/pnas.1904014116>.
- [167] O. Genest, M. Reidy, T.O. Street, J.R. Hoskins, J.L. Camberg, D.A. Agard, D.C. Masison, S. Wickner, Uncovering a Region of Heat Shock Protein 90 Important for Client Binding in *E. coli* and Chaperone Function in Yeast, *Mol. Cell.* 49 (2013) 464–473. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.11.017>.
- [168] J.C. Bardwell, E.A. Craig, Ancient heat shock gene is dispensable., *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2977–2983. <https://doi.org/10.1128/jb.170.7.2977-2983.1988>.
- [169] J.G. Thomas, F. Baneyx, Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: Comparison with ClpA, ClpB, and HtpG in vivo, *J. Bacteriol.* 180 (1998) 5165–5172. <https://doi.org/10.1128/jb.180.19.5165-5172.1998>.
- [170] T. Inoue, R. Shingaki, S. Hirose, K. Waki, H. Mori, K. Fukui, Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.* 189

- (2007) 950–957. <https://doi.org/10.1128/JB.01294-06>.
- [171] A.M. Grudniak, K. Pawlak, K. Bartosik, K.I. Wolska, Physiological consequences of mutations in the *htpG* heat shock gene of *Escherichia coli*, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 745–746 (2013) 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2013.04.003>.
- [172] N. Tanaka, H. Nakamoto, HtpG is essential for the thermal stress management in cyanobacteria, *FEBS Lett.* 458 (1999) 117–123. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(99\)01134-5](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01134-5).
- [173] M. Hossain, H. Nakamoto, Role for the cyanobacterial HtpG in protection from oxidative stress, *Curr. Microbiol.* 46 (2003) 70–76. <https://doi.org/10.1007/s00284-002-3831-5>.
- [174] M. Hossain, H. Nakamoto, HtpG plays a role in cold acclimation in cyanobacteria, *Curr. Microbiol.* 44 (2002) 291–296. <https://doi.org/10.1007/s00284-001-0005-9>.
- [175] T. Sato, S. Minagawa, E. Kojima, N. Okamoto, H. Nakamoto, HtpG, the prokaryotic homologue of Hsp90, stabilizes a phycobilisome protein in the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942, *Mol. Microbiol.* 76 (2010) 576–589. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07139.x>.
- [176] E. Verbrugghe, A. Van Parys, B. Leyman, F. Boyen, F. Haesebrouck, F. Pasmans, HtpG contributes to *Salmonella* Typhimurium intestinal persistence in pigs, *Vet. Res.* 46 (2015) 1–5. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0261-5>.
- [177] W. Dang, Y. hua Hu, L. Sun, HtpG is involved in the pathogenesis of *Edwardsiella tarda*, *Vet. Microbiol.* 152 (2011) 394–400. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.030>.
- [178] A.M. Grudniak, B. Klecha, K.I. Wolska, Effects of null mutation of the heat-shock gene *htpG* on the production of virulence factors by *Pseudomonas aeruginosa*, *Future Microbiol.* 13 (2018) 69–80. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0111>.
- [179] I. Yosef, M.G. Goren, R. Kiro, R. Edgar, U. Qimron, High-temperature protein G is essential for activity of the *Escherichia coli* clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPR)/Cas system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108 (2011) 20136–20141. <https://doi.org/10.1073/pnas.1113519108>.
- [180] I. Ivančić-Baće, S.D. Cass, S.J. Wearne, E.L. Bolt, Different genome stability proteins underpin primed and naïve adaptation in *E. coli* CRISPR-Cas immunity, *Nucleic Acids Res.* 43 (2015) 10821–10830. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1213>.
- [181] D. Mitić, M. Radovčić, D. Markulin, I. Ivančić-Baće, StpA represses CRISPR-Cas immunity in H-NS deficient *Escherichia coli*, *Biochimie.* 174 (2020) 136–143. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.04.020>.
- [182] L. He, Z.J. Matošević, D. Mitić, D. Markulin, T. Killelea, M. Matković, B. Bertoša, I. Ivančić-Baće, E.L. Bolt, A tryptophan ‘gate’ in the *crispr-cas3* nuclease controls *ssDNA* entry into the nuclease site, that when removed results in nuclease hyperactivity, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms22062848>.
- [183] P.P. Cherepanov, W. Wackernagel, Gene disruption in *Escherichia coli*: TcR and KmR cassettes with the option of Flp-catalyzed excision of the antibiotic-resistance determinant, *Gene.* 158 (1995) 9–14. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00193-A](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00193-A).

- [184] A.J. Link, D. Phillips, G.M. Church, Methods for generating precise deletions and insertions in the genome of wild-type *Escherichia coli*: application to open reading frame characterization, *J. Bacteriol.* 179 (1997) 6228–6237. <https://doi.org/10.1128/jb.179.20.6228-6237.1997>.
- [185] T. Stratmann, S. Madhusudan, K. Schnetz, Regulation of the *yjjQ*-*bglJ* operon, encoding LuxR-type transcription factors, and the divergent *yjjP* gene by H-NS and LeuO, *J. Bacteriol.* 190 (2008) 926–935. <https://doi.org/10.1128/JB.01447-07>.
- [186] J.H. Miller, *Experiments in molecular genetics*, 1st ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 1992.
- [187] G.H. Putri, S. Anders, P.T. Pyl, J.E. Pimanda, F. Zanini, Analysing high-throughput sequencing data in Python with HTSeq 2.0, *Bioinformatics.* 38 (2022) 2943–2945. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btac166>.
- [188] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248–254. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).
- [189] R. Srinivasan, D. Chandraprakash, R. Krishnamurthi, P. Singh, V.F. Scolari, S. Krishna, A.S.N. Seshasayee, Genomic analysis reveals epistatic silencing of expensive genes in *Escherichia coli* K-12, *Mol. Biosyst.* 9 (2013) 2021–2033. <https://doi.org/10.1039/c3mb70035f>.
- [190] R. Spurio, M. Dürrenberger, M. Falconi, A. La Teana, C.L. Pon, C.O. Gualerzi, Lethal overproduction of the *Escherichia coli* nucleoid protein H-NS: ultramicroscopic and molecular autopsy, *Mol. Gen. Genet. MGG.* 231 (1992) 201–211. <https://doi.org/10.1007/BF00279792>.
- [191] C.C. Chen, M.Y. Chou, C.H. Huang, A. Majumder, H.Y. Wu, A cis-spreading nucleoprotein filament is responsible for the gene silencing activity found in the promoter relay mechanism, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 5101–5112. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411840200>.
- [192] E. Semenova, E. Savitskaya, O. Musharova, A. Strotskaya, D. Vorontsova, K.A. Datsenko, M.D. Logacheva, K. Severinov, Highly efficient primed spacer acquisition from targets destroyed by the *Escherichia coli* type I-E CRISPR-Cas interfering complex, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 7626–7631. <https://doi.org/10.1073/pnas.1602639113>.
- [193] T. Künne, S.N. Kieper, J.W. Bannenberg, A.I.M. Vogel, W.R. Miellet, M. Klein, M. Depken, M. Suarez-Diez, S.J.J. Brouns, Cas3-Derived Target DNA Degradation Fragments Fuel Primed CRISPR Adaptation, *Mol. Cell.* 63 (2016) 852–864. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.011>.
- [194] S. Gottesman, M. Gottesman, J.E. Shaw, M.L. Pearson, Protein degradation in *E. coli*: The ion mutation and bacteriophage lambda N and *cII* protein stability, *Cell.* 24 (1981) 225–233. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(81\)90518-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(81)90518-3).
- [195] K.R. Kukurba, S.B. Montgomery, RNA Sequencing and Analysis, Cold Spring Harb. Protoc. 2015 (2015) pdb.top084970. <https://doi.org/10.1101/pdb.top084970>.
- [196] J.N.A. Vink, K.J.A. Martens, M. Vlot, R.E. McKenzie, C. Almendros, B. Estrada Bonilla, D.J.W. Brocken, J. Hohlbein, S.J.J. Brouns, Direct Visualization of Native

- CRISPR Target Search in Live Bacteria Reveals Cascade DNA Surveillance Mechanism, *Mol. Cell.* 77 (2020) 39-50.e10. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.10.021>.
- [197] C.J. Dorman, N. Ní Bhriain, CRISPR-Cas, DNA Supercoiling, and Nucleoid-Associated Proteins, *Trends Microbiol.* 28 (2020) 19–27. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2019.08.004>.
- [198] A. Majumder, M. Fang, K.J. Tsai, C. Ueguchi, T. Mizuno, H.Y. Wu, LeuO Expression in Response to Starvation for Branched-chain Amino Acids, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 19046–19051. <https://doi.org/10.1074/jbc.M100945200>.
- [199] M. Fang, A. Majumder, K.J. Tsai, H.Y. Wu, ppGpp-dependent leuO expression in bacteria under stress, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 276 (2000) 64–70. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3440>.
- [200] B.J. Rauch, M.R. Silvis, J.F. Hultquist, C.S. Waters, M.J. McGregor, N.J. Krogan, J. Bondy-Denomy, Inhibition of CRISPR-Cas9 with Bacteriophage Proteins, *Cell.* 168 (2017) 150-158.e10. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.12.009>.
- [201] F. Jiang, J.-J. Liu, B.A. Osuna, M. Xu, J.D. Berry, B.J. Rauch, E. Nogales, J. Bondy-Denomy, J.A. Doudna, Temperature-Responsive Competitive Inhibition of CRISPR-Cas9, *Mol. Cell.* 73 (2019) 601-610.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.016>.
- [202] J.M. Andrade, C.M. Arraiano, PNPase is a key player in the regulation of small RNAs that control the expression of outer membrane proteins, *Rna.* 14 (2008) 543–551. <https://doi.org/10.1261/rna.683308>.
- [203] J.M. Andrade, V. Pobre, A.M. Matos, C.M. Arraiano, The crucial role of PNPase in the degradation of small RNAs that are not associated with Hfq, *Rna.* 18 (2012) 844–855. <https://doi.org/10.1261/rna.029413.111>.
- [204] B.K. Cho, K. Zengler, Y. Qiu, Y.S. Park, E.M. Knight, C.L. Barrett, Y. Gao, B.O. Palsson, The transcription unit architecture of the Escherichia coli genome, *Nat. Biotechnol.* 27 (2009) 1043–1049. <https://doi.org/10.1038/nbt.1582>.
- [205] A. Levy, M.G. Goren, I. Yosef, O. Auster, M. Manor, G. Amitai, R. Edgar, U. Qimron, R. Sorek, CRISPR adaptation biases explain preference for acquisition of foreign DNA, *Nature.* 520 (2015) 505–510. <https://doi.org/10.1038/nature14302>.
- [206] P. Deighan, C. Beloin, C.J. Dorman, Three-way interactions among the Sfh, StpA and H-NS nucleoid-structuring proteins of Shigella flexneri 2a strain 2457T, *Mol. Microbiol.* 48 (2003) 1401–1416. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03515.x>.
- [207] S.P. Ryder, M.I. Recht, J.R. Williamson, Quantitative analysis of protein-RNA interactions by gel mobility shift, *Methods Mol. Biol.* 488 (2008) 99–115. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-475-3_7.
- [208] K. Han, K.S. Kim, G. Bak, H. Park, Y. Lee, Recognition and discrimination of target mRNAs by Sib RNAs, a cis-encoded sRNA family, *Nucleic Acids Res.* 38 (2010) 5851–5866. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq292>.
- [209] F.W. Studier, B.A. Moffatt, Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes, *J. Mol. Biol.* 189 (1986) 113–130. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(86\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0022-2836(86)90385-2).

- [210] M.R. Maurizi, Degradation in vitro of bacteriophage lambda N protein by Lon protease from *Escherichia coli*., *J. Biol. Chem.* 262 (1987) 2696–703. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2950089>.
- [211] S. Langklotz, F. Narberhaus, The *Escherichia coli* replication inhibitor CspD is subject to growth-regulated degradation by the Lon protease, *Mol. Microbiol.* 80 (2011) 1313–1325. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07646.x>.
- [212] M. Macuka, Određivanje količine proteina Cas3 u mutantima Δ hns i Δ htpG bakterije *Escherichia coli* u različitim uvjetima rasta, Sveučilište u Zagreb. Prirodosl. Fak. (2019).
- [213] P. Deighan, A. Free, C.J. Dorman, A role for the *Escherichia coli* H-NS-like protein StpA in OmpF porin expression through modulation of micF RNA stability, *Mol. Microbiol.* 38 (2000) 126–139. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.02120.x>.
- [214] T. Yamashino, C. Ueguchi, T. Mizuno, Quantitative control of the stationary phase-specific sigma factor, σ (s), in *Escherichia coli*: Involvement of the nucleoid protein H-NS, *EMBO J.* 14 (1995) 594–602. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1995.tb07035.x>.
- [215] G. Zhang, B.M. Ueberheide, S. Waldemarson, S. Myung, K. Molloy, J. Eriksson, B.T. Chait, T.A. Neubert, D. Fenyö, Protein quantitation using mass spectrometry., *Methods Mol. Biol.* 673 (2010) 211–222. https://doi.org/10.1007/978-1-60761-842-3_13.
- [216] L. He, Cas3 nuclease activity is regulated by an iHDA1 region located at the interface between HD and RecA1 domain, *Univ. Nottingham.* (2022).
- [217] C. Hu, D. Ni, K.H. Nam, S. Majumdar, J. McLean, H. Stahlberg, M.P. Terns, A. Ke, Allosteric control of type I-A CRISPR-Cas3 complexes and establishment as effective nucleic acid detection and human genome editing tools, *Mol. Cell.* 82 (2022) 2754–2768.e5. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.06.007>.
- [218] I. Ivančić-Baće, M. Radovčić, L. Bočkor, J.L. Howard, E.L. Bolt, Cas3 stimulates runaway replication of a ColE1 plasmid in *Escherichia coli* and antagonises RNaseHI, *RNA Biol.* 10 (2013) 770–778. <https://doi.org/10.4161/rna.23876>.
- [219] G. Xiang, X. Zhang, C. An, C. Cheng, H. Wang, Temperature effect on CRISPR-Cas9 mediated genome editing, *J. Genet. Genomics.* 44 (2017) 199–205. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2017.03.004>.
- [220] A.A. Malzahn, X. Tang, K. Lee, Q. Ren, S. Sretenovic, Y. Zhang, H. Chen, M. Kang, Y. Bao, X. Zheng, K. Deng, T. Zhang, V. Salcedo, K. Wang, Y. Zhang, Y. Qi, Application of CRISPR-Cas12a temperature sensitivity for improved genome editing in rice, maize, and *Arabidopsis*, *BMC Biol.* 17 (2019) 1–14. <https://doi.org/10.1186/s12915-019-0629-5>.
- [221] M.J. Milner, M. Craze, M.S. Hope, E.J. Wallington, Turning Up the Temperature on CRISPR: Increased Temperature Can Improve the Editing Efficiency of Wheat Using CRISPR/Cas9, *Front. Plant Sci.* 11 (2020) 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.583374>.
- [222] J. Blomme, W. Develtere, A. Köse, J. Arraiza Ribera, C. Brugmans, J. Jaraba-Wallace, W. Decaestecker, D. Rombaut, A. Baekelandt, Á. Daniel Fernández Fernández, F. Van Breusegem, D. Inzé, T. Jacobs, The heat is on: a simple method to increase genome editing efficiency in plants, *BMC Plant Biol.* 22 (2022) 1–14.

<https://doi.org/10.1186/s12870-022-03519-7>.

- [223] Y. Hao, Q. Wang, J. Li, S. Yang, Y. Zheng, W. Peng, Double nicking by RNA-directed Cascade-nCas3 for high-efficiency large-scale genome engineering, *Open Biol.* 12 (2022) 210241. <https://doi.org/10.1098/rsob.210241>.
- [224] R.R. Chaparian, M.L.N. Tran, L.C. Miller Conrad, D.B. Rusch, J.C. Van Kessel, Global H-NS counter-silencing by LuxR activates quorum sensing gene expression, *Nucleic Acids Res.* 48 (2020) 171–183. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz1089>.
- [225] P. Gawade, G. Gunjal, A. Sharma, P. Ghosh, Reconstruction of transcriptional regulatory networks of Fis and H-NS in *Escherichia coli* from genome-wide data analysis, *Genomics.* 112 (2020) 1264–1272. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2019.07.013>.

8. ŽIVOTOPIS

Damjan Mitić rođen je 31. listopada 1991. godine u Zagrebu gdje je završio osnovnu i srednju školu (opću gimnaziju). Godine 2010. je upisao preddiplomski, a 2013. diplomski studij molekularne biologije Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (PMF) Sveučilišta u Zagrebu. Dobitnik je Erasmus stipendije za boravak u Njemačkoj gdje je izradio svoj diplomski rad. Diplomirao je u veljači 2016. na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a s temom " Utjecaj sustava izbacivanja emrBAR na simbiozu biljke *Medicago truncatula* i bakterije *Sinorhizobium meliloti*", pod mentorstvom dr. sc. Michaela Göttferta i sumentorstvom dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Nakon diplome radio je kao stručnjak za laboratorijsku dijagnostiku u firmi InovaGen d.o.o, a u listopadu 2018. se zaposlio na Zavodu za molekularnu biologiju PMF-a u Zagrebu kao asistent-doktorand i istovremeno upisao doktorski studij biologije.

Za vrijeme trajanja dokorskog studija radio je kao suradnik na projektu "Cas3 kao kontrolna točka obrane CRISPR-Cas: razjašnjenje njegove regulacije istraživanjem stabilnosti proteina i prepisivanja u bakteriji *Escherichia coli*" dr. sc. Ivane Ivančić Baće. Istovremeno je vodio laboratorijske vježbe iz kolegija Genetika i Molekularna genetika na preddiplomskom studiju molekularne biologije i diplomskom studiju kemije, te vodio studente na laboratorijskoj stručnoj praksi i pomagao studentima u izradi diplomskih radova kao neposredni voditelj i komentor.

Koautor je 3 znanstvena rada objavljena u časopisima s međunarodnom recenzijom. Sudjelovao je na 4 znanstvena skupa s posterskim ili usmenim priopćenjem. Član je Hrvatskog društva za biokemiju i molekularnu biologiju i Hrvatskog mikrobiološkog društva.

Ovaj rad je financirala Hrvatska zaklada za znanost projektom broj IP-2016-06-8861.